



HAL
open science

Caractérisation d'anticorps monoclonaux à différents niveaux à l'aide d'un couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse

Jérémie Giorgetti

► **To cite this version:**

Jérémie Giorgetti. Caractérisation d'anticorps monoclonaux à différents niveaux à l'aide d'un couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAF051 . tel-03009419

HAL Id: tel-03009419

<https://theses.hal.science/tel-03009419v1>

Submitted on 17 Nov 2020

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

THÈSE

présentée par :

Jérémie GIORGETTI

soutenue le : **28 Novembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

Caractérisation d'anticorps monoclonaux à différents niveaux à l'aide d'un couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse

THÈSE dirigée par :

D^r Emmanuelle LEIZE-WAGNER Directrice de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

P^r Isabelle FOURNIER
D^r Christophe MORIN

Rapporteur externe, Université de Lille
Rapporteur externe, Université de Rouen

AUTRES MEMBRES DU JURY :

D^r Sarah CIANFERANI
M. Yann HEBERT
D^r Yannis FRANCOIS

Présidente du jury, Université de Strasbourg
Membre invité, Bruker Daltonics
Co-encadrant, Université de Strasbourg

*A mes parents,
A ma famille*

« C'est en recherchant l'impossible que l'homme a toujours réalisé le possible. Ceux qui se sont sagement limités à ce qui leur semblait possible n'ont jamais avancé d'un pas. »

Mikhaïl Bakounine

Remerciements

Avant tout, je souhaite remercier mes rapporteurs, le Pr. Isabelle FOURNIER et le Dr. Christophe MORIN, ainsi que le Dr. Sarah CIANFERANI, Présidente du jury, M. Yann HEBERT et le Dr. Yannis FRANCOIS pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

Merci à la société Bruker et à la Région Grand Est pour m'avoir octroyé un financement afin de mener à bien cette thèse et ce, dans les meilleures conditions.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude au Dr. Emmanuelle LEIZE-WAGNER, directrice du Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes (LSMIS) pour son accueil et son altruisme. Merci pour ta confiance sans faille ainsi que ton investissement dans tous tes projets. Tu m'as beaucoup appris sur le plan scientifique mais également sur le plan personnel et je suis fier d'avoir pu avancer à tes côtés.

Je tiens également à remercier Yannis FRANCOIS pour son encadrement et son soutien à toute épreuve. Merci d'avoir cru en moi depuis le début et de m'avoir accompagné pendant cette aventure. Tu as toujours trouvé les mots pour m'aider à reprendre confiance, relativiser, et ça m'a vraiment aidé à mûrir. Trouver l'équilibre entre l'encadrement et la liberté d'action dont j'avais besoin n'était pas chose facile... Merci de m'avoir fait autant confiance et de m'avoir mis en avant spontanément à chaque fois que l'occasion s'est présentée. Tu es devenu un ami plus qu'un collègue et c'est aussi grâce à toi que j'ai autant progressé.

Le laboratoire est un peu comme une seconde maison... où l'on passe plus de temps que dans la première... Je souhaiterais remercier les personnes qui m'ont accueillies au LSMIS comme Armelle, Nathalie et Noelle, mais aussi les anciens thésards qui m'ont intégré et montré l'exemple à suivre. Merci à Marianne, Michael, Rabah, Cécile, Nha-Thi, Margaux et Nassur pour vos conseils, votre bonne humeur et votre soutien. Vous avez instauré une ambiance qui m'a convaincu de rester et ce fut un plaisir de partager des moments avec vous. J'espère avoir conservé cet environnement lors de l'arrivée des nouveaux membres de l'équipe.

La thèse m'a également permis de rencontrer Antony et Christophe, à qui j'ai envie de dire un grand MERCI. Les gars, vous avez assuré... Vous m'avez appris plein de trucs, supporté et même ri à mes jeux de mots les plus pourris... Rien que pour ça vous méritez le meilleur ! C'était vraiment top de bosser avec vous... Je vous souhaite que du bonheur pour la suite !!!

Je remercie également Stéphanie que j'ai eu l'honneur de côtoyer et qui m'a beaucoup apporté. Tu as fait preuve de beaucoup de patience et d'humour et je te remercie vraiment pour ta joie, ta bonne humeur et tout ce que tu m'as appris.

Merci à Gaël et Julien... On était dans la même situation et rester soudés nous a permis d'arriver au terme de cette aventure. C'était sympa de décompresser en fin de journée et de refaire le monde mais aussi d'échanger sur nos inquiétudes, ça fait moins peur quand on est à plusieurs !!!

Je souhaiterais remercier les étudiants en stage que j'ai eu l'occasion d'encadrer notamment Sarah, Stéphanie, Estelle, Elise, Marine, Özlem, Apolline, Sébastien, Maëva, Eminé mais aussi une pensée particulière pour Sangeetha, Josiane, Lucas, Marie, Valentin et Thomas. Vous m'avez permis de développer ma pédagogie, mon écoute, et parfois même mon vocabulaire alsacien ! Un gros Schmoutz à vous tous !!!

J'ai moi aussi été « stagiaire éphémère » à plusieurs reprises chez des personnes aussi chaleureuses que compétentes. Véritables puits de sciences, Philippe HAMMANN, Laurianne KUHN, et Johana CHICHER m'ont ouvert la porte de leur plateforme protéomique et appris énormément. Merci à vous trois, vous êtes des références pour moi et je vous souhaite également le meilleur.

Je profite de ce moment pour remercier Laura BOM, qui m'a dépanné de nombreuses fois et qui m'a croisé dans tous mes états, de la quasi-déprime à la joie. Tu m'as toujours épaulé et trouvé des solutions miracles à des moments cruciaux... Je ne suis pas certain que toutes ces tablettes de chocolat aient été suffisantes pour te remercier à la hauteur de ce que tu as fait pour moi...

Ces trois années de thèse n'auraient pas été réalisables sans la formidable équipe de Bruker. Je souhaiterais donc remercier chaleureusement Yann HEBERT, Pierre-Olivier SCHMIT, Jean-Charles ROCCA, Sabine JOURDAIN ainsi que Jean-Michel BILLMANN et Manuel CHAPELLE. Merci pour votre confiance, votre engagement ainsi que votre soutien. Votre gentillesse ainsi que les échanges que nous avons eu ont été très enrichissants, aussi bien professionnellement que personnellement.

Je voudrais à présent remercier mes amis proches, Sylv, Flodoudou, Max, Jerem et Stork ;) ... Vous êtes top les gars, peu importe la distance ou les conditions, vous avez toujours été dispo pour moi dans les moments importants...

Enfin, je voudrais remercier mes parents Jean-Marie et Chantal sans qui je ne serais jamais devenu qui je suis... Vous avez toujours cru en moi, aidé à aller de l'avant et encouragé... je n'oublierai jamais tout ce que vous avez fait pour moi... Merci 'Pa de m'avoir appris que tout est possible à partir du moment où s'en donne les moyens... Merci mère, pour m'avoir soutenu, depuis toujours et en

toutes circonstances... Je sais que la distance a été parfois difficile à endurer et le proverbe « loin des yeux, loin du cœur »... c'est complètement stupide ;) Je vous aime !!!

Pour conclure, je souhaiterais remercier Aurélie... Merci pour ton amour et ton énergie. Tu m'as soutenu, apaisé, réconforté (les lasagnes et le tiramisu ça compte :)), tu as supporté mes insomnies et même mon caractère parfois impatient (j'ai bien écrit PARFOIS). Merci pour tout ce que tu fais pour moi au quotidien.

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive et je remercie toutes celles et ceux qui m'ont encouragé et qui m'ont apporté un peu plus de bonheur...

Sommaire

Remerciements	5
Sommaire	8
Liste des abréviations	10
Liste des figures	12
Introduction générale.....	17
PARTIE I : Introduction et revue bibliographique.....	23
Chapitre I : L'origine des anticorps monoclonaux (mAbs) dans l'immunothérapie.....	24
1. Introduction.....	24
2. Théorie des anticorps et du système immunitaire.....	26
3. La production des anticorps monoclonaux	27
4. Structure classique d'un anticorps monoclonal	31
5. L'optimisation des mAbs	35
6. Arrivée des biosimilaires et bio-supérieurs.....	40
7. Développement des conjugués d'anticorps.....	43
8. Le développement des mAbs et leur marché	53
9. Conclusion	59
10. Références bibliographiques	60
Chapitre II : Méthodes électrophorétiques employées pour caractériser les mAbs	65
1. Introduction.....	65
2. Publication : Biopharmaceutical applications of capillary electromigration methods	67
3. Publication : Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016 - 2018	99
4. Conclusion	107
5. Références bibliographiques	109

PARTIE II – Validation de méthode CE-MS pour la caractérisation d’anticorps monoclonaux.....	113
Chapitre III : Validation du couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse pour l’identification et la quantification relative de N-glycosylations d’anticorps monoclonaux.....	114
1. Introduction.....	114
2. Publication : Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis – mass spectrometry : assessment and method validation	116
3. Conclusion	129
4. Références bibliographiques	131
PARTIE III – Etude des mAbs aux niveaux intact et middle-up.....	135
Chapitre IV : Développement de méthode CE-MS pour la séparation d’anticorps entiers en conditions dénaturantes	136
1. Introduction.....	136
2. Publication : Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry.....	137
3. Conclusion	151
Chapitre V : Caractérisation multi-niveaux d’anticorps monoclonaux par un couplage CE-ESI-MS.....	155
1. Introduction.....	155
2. Publication : Combination of intact, middle-up and bottom-up levels to characterize 7 therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis – mass spectrometry	156
Conclusion générale et perspectives.....	188
Annexes	192
Liste des communications scientifiques.....	192
Liste des présentations.....	193
Enseignements délivrés en tant que moniteur	194

Liste des abréviations

ADC : Anticorps lié à une molécule cytotoxique

ANTS : 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulfonate

APTS : 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic-acid

BFS : Capillaire en silice vierge

BGE : Electrolytes supports

bSaB : Anticorps bispécifique

CDR : Région déterminant la complémentarité

CE : Electrophorèse capillaire

CE-MS : Couplage d'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse

CGE : Electrophorèse capillaire en gel

CHO : Cellules d'ovaire de hamster chinois

CIEF : Electrophorèse capillaire à focus isoélectrique

CQA : Caractéristiques de qualité critiques

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DTT : Dithiothreitol

EMA : Agence européenne des médicaments

EOF : Flux électro-osmotique

Epo : erythropoietine

ESI : Ionisation par électrospray

Fab : Fragment de l'anticorps impliqué dans la liaison avec l'antigène

Fc : Fragment cristallisable de l'anticorps

FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FQ : 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde

HC : Chaîne lourde

HILIC-FD : Chromatographie liquide d'interactions hydrophile avec détection par fluorescence

HPC : Hydroxypropyl cellulose

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

ICH : Comité international d'harmonisation

icIEF : Imagerie par électrophorèse à focus isoélectrique

IEF : Electrophorèse à focus isoélectrique
Ig : Immunoglobulines
LC : Chaîne légère
LIF : Fluorescence induite par laser
LPA : Polyacrylamide linéaire
mAbs : Anticorps monoclonaux
MALDI : Ionisation/désorption laser assistée par matrice
ME : Electrophorèse sur micropuce
mIEF : Electrophorèse à focus isoélectrique sur puce
MS : Spectrométrie de masse
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
OKT : Anticorps orthoclone CD
OMS : Organisation mondiale de la santé
PA : Polyacrylamide
PEI : Polyethyleneimine
PD : Pharmacocinétique
PK : Pharmacodynamique
PTMs : Modifications post-traductionnelles
PVA : Poly vinyl alcohol
QC : Contrôle qualité
SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du dodecyl sulfate de sodium
TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine
YAC : Chromosome artificiel de levure

Liste des figures

Partie I : Introduction et revue bibliographique

Chapitre I : L'origine des anticorps monoclonaux (mAbs) dans l'immunothérapie

Figure 1.1 : Représentation schématique du processus de découverte de médicaments par les techniques de souris transgéniques et de phage display

Tableau 1.1 : Avantages et inconvénients des techniques utilisées pour la production de mAbs

Figure 1.2 : Représentation schématique de la structure d'un mAb et de ses différentes régions

Figure 1.3 : Représentation schématique du trastuzumab et des principales PTMs hot-spots portées par cet anticorps

Figure 1.4 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des N-glycanes chez les mammifères

Figure 1.5 : Illustration schématique des 4 types majeurs d'anticorps monoclonaux

Figure 1.6 : Schéma du génie génétique de souris Xenomouse pour la production d'anticorps humains en l'absence d'anticorps de souris

Tableau 1.2 : Nomenclature utilisée pour nommer un mAb

Tableau 1.3 : Exemples d'anticorps monoclonaux des différentes générations de mAbs, biosimilaires et biobetters

Tableau 1.4 : Comparaison entre les biosimilaires et les biobetters

Figure 1.7 : Représentation schématique de la structure d'un ADC

Figure 1.8 : Représentation schématique du gemtuzumab ozogamicin

Figure 1.9 : Représentation schématique de l'ado-trastuzumab emtansine et du brentuximab vedotin

Figure 1.10 : Représentation structurale des linkers utilisés dans la conjugaison de biotine à un mAb

Figure 1.11 : Représentations structurales des drugs majoritairement utilisées comme agents cytotoxiques

Figure 1.12 : Représentation schématique des différentes étapes de l'administration de l'ADC jusqu'à la libération de l'agent cytotoxique dans les cellules cancéreuses

Tableau 1.5 : Avantages et inconvénients des ADCs

Figure 1.13 : Représentation schématique de la structure d'un mAb et des constructions d'anticorps bispécifiques

Tableau 1.6 : Liste des mAbs approuvés par la FDA pour la mise sur le marché en 2009

Figure 1.14 : Répartition des catégories thérapeutiques des mAbs

Figure 1.15 : Nombre de mAbs et dérivés de mAbs autorisés à la mise sur le marché entre 1982 et 2014

Figure 1.16 : Histogramme représentant les ventes de produits pharmaceutiques par type

Figure 1.17 : Représentation des 6 meilleures ventes de mAbs et des 2 meilleures ventes de protéines recombinantes qui ne sont pas des mAbs

Figure 1.18 : Histogramme représentant les fonds investis pour la R&D de mAbs par an ainsi que les types de cibles thérapeutiques

Chapitre II : Méthodes électrophorétiques employées pour caractériser les mAbs

Figure 2.1 : Electrophérogrammes d'échantillons de mAb-A initiaux et dégradés analysés par CGE en conditions non réductrices et réductrices

Figure 2.2 : Séparation électrophorétique de N-glycanes marqués à l'APTS avec détection par FID

Figure 2.3 : Représentation schématique d'un gradient de pH dans un capillaire de cIEF

Figure 2.4 : Analyse de variants de charge de trastuzumab et de cetuximab par mIEF et cIEF

Figure 2.5 : Représentation schématique du système d'électrophorèse capillaire

Figure 2.6 : Représentation schématique du système de CE par micropuce couplé à l'ESI

Figure 2.7 : Analyse de variants de charge de l'avastine et de son biosimilaire par CZE

Figure 2.8 : Photographie du couplage CE-MS avec interface sheathless

Figure 2.9 : Représentations schématiques des différentes interfaces de couplage CE-ESI-MS

Figure 2.10 : Spectres de fragmentation du peptide HT29 du trastuzumab et de ses glycosylations obtenus par CE-ESI-MS/MS

Figure 2.11 : Aperçu de la caractérisation structurale du brentuximab vedotin par CE-ESI-MS

Figure 2.12 : Electrophérogramme d'extraction d'ion des peptides LT04 et LT06 du trastuzumab présentant des déamidations

Figure 2.13 : Analyse CE-MS d'une IgG 1 après digestion enzymatique à l'IdeS et réduction

Figure 2.14 : Spectres déconvolués d'un mAb intact et de ses glycosylations majoritaires

Partie II : Validation de méthode CE-MS pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux

Chapitre III : Validation du couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse pour l'identification et la quantification relative de N-glycosylations d'anticorps monoclonaux

Tableau 3.1 : Comparaison des profils de glycosylation de mAbs obtenus en HILIC (2-AB) et en CE-ESI-MS

Figure 3.1 : Electrophérogramme correspondant à un digest de natalizumab étudié en CE-ESI-MS/MS

Figure 3.2 : Electrophérogramme d'ion extrait du pic correspondant au peptide portant le site de glycosylation et quantification relative des N-glycanes du natalizumab

Tableau 3.2 : Aperçu des masses de 2-AB N-glycanes d'anticorps monoclonal

Figure 3.3 : Comparaison des profils de glycosylation d'infliximab remicade et d'infliximab remsima par nanoLC-MS et CE-ESI-MS

Tableau 3.S1 : Aperçu des masses des glycopeptides du natalizumab

Partie III : Etude des mAbs aux niveaux intact et middle-up

Chapitre IV : Développement de méthode CE-MS pour la séparation d'anticorps entier en conditions dénaturantes

Figure 4.1 : Effets de la concentration en acide acétique sur la séparation de variants de charge du trastuzumab

Figure 4.2 : Effets de la concentration en méthanol sur la séparation de variants de charge du trastuzumab

Figure 4.3 : Comparaison entre les séparations de mAbs entiers entre CZE-UV et CZE-ESI-MS après optimisation des paramètres

Figure 4.4 : Séparations de trastuzumab, rituximab et palivizumab intacts après optimisation des paramètres en CE-ESI-MS

Chapitre V : Caractérisation multi-niveaux d'anticorps monoclonaux par un couplage CE-ESI-MS

Figure 5.1 : Séparation des 7 mAbs en CZE-ESI-MS au niveau molécule intacte, middle-up et middle-up réduit

Figure 5.2 : Séparation de l'adalimumab intact en CZE-ESI-MS et spectres de masse déconvolués correspondants

Figure 5.3 : Séparation du digest IdeS de l'adalimumab en CZE-ESI-MS et spectres de masse déconvolués correspondants

Figure 5.4 : Séparation du digest IdeS réduit de l'adalimumab en CZE-ESI-MS et spectres de masse déconvolués correspondants

Figure 5.5 : Analyse semi-quantitative des glycoformes (A) et occurrence des autres PTMs (B) de l'adalimumab obtenus en CE-ESI-MS.

Tableau 5.1 : Identification des PTMs identifiées pour l'adalimumab au niveau de la molécule intacte

Tableau 5.2 : Identification des PTMs identifiées pour l'adalimumab au niveau de la molécule partiellement digérée

Tableau 5.3 : Identification des PTMs identifiées pour l'adalimumab au niveau de la molécule partiellement digérée et réduite

Tableau 5 S1 : Identification des PTMs identifiées sur 7 mAbs à chaque niveau d'étude

Figure 5 S1 : Représentation schématique des principales glycoformes

Figure 5 S2 : Quantification relative des N-glycosylations (A) et d'autres PTMs (B) pour natalizumab, nivolumab, palivizumab, infliximab, rituximab and trastuzumab

Introduction générale

Depuis leur découverte au début du 20^{ème} siècle, les anticorps monoclonaux (mAbs) ont connu un développement sans égal jusqu'à s'imposer comme une nouvelle classe de biomolécules thérapeutiques. L'identification croissante de cibles thérapeutiques ainsi que les diverses applications de ces mAbs expliquent leur émergence dans l'immunothérapie afin de lutter contre bon nombre de cancers, de maladies auto-immunes ou encore afin d'éviter tout rejet de greffon. En effet, ces protéines allient une forte spécificité vis-à-vis d'antigènes particuliers, ainsi qu'une grande efficacité cytotoxique envers les cellules ciblées, le tout en limitant les effets d'immunogénicité aux patients.

Les premiers traitements utilisant des protéines thérapeutiques n'étant pas très efficaces, ces molécules ont connu plusieurs étapes d'optimisation. Historiquement, ces molécules étaient produites à l'aide de lignées cellulaires murines, ce qui les rendait fortement immunogènes pour les patients. En premier lieu, les améliorations des mAbs ont donc consisté à les rendre moins néfastes afin d'éviter tout déclenchement du système immunitaire contre le traitement. Pour cela, les anticorps ont été peu à peu humanisés en utilisant différentes techniques de génomique jusqu'à obtenir une immunogénicité faible voire nulle. La seconde étape de perfectionnement a résidé dans l'orientation des protéines thérapeutiques vers des cibles précises. Les molécules ont été progressivement modifiées afin de les rendre plus spécifiques vis-à-vis d'épitopes exprimés uniquement par les cellules tumorales. C'est le cas notamment des anticorps monoclonaux bispécifiques, qui augmentent la spécificité des mAbs en identifiant plusieurs épitopes grâce à leurs deux sites de reconnaissance distincts. Enfin, le pouvoir cytotoxique des protéines thérapeutiques a été retravaillé afin de les rendre plus puissantes dans l'élimination des cellules cancéreuses. La proposition la plus prometteuse a été de dériver les mAbs à l'aide d'une petite molécule cytotoxique pour obtenir des Antibody-Drug Conjugates (ADCs). Les mAbs utilisés en immunothérapie, en remplacement ou en complément de chimiothérapie, se sont développés jusqu'à intégrer le marché florissant des biomolécules thérapeutiques. Ces dernières années, les ventes de plusieurs mAbs ou dérivés de mAbs ont atteint le top 10 sur le marché des biomolécules pharmaceutiques.

La diversité des molécules thérapeutiques ainsi que leur mode de production par culture cellulaire induit inéluctablement des modifications qui peuvent avoir une incidence majeure sur l'efficacité de la molécule. Ces modifications post-traductionnelles (PTMs) peuvent intervenir durant les étapes de maturation de la protéine, et sont dépendantes des conditions de stockage et de conservation des mAbs. Les mAbs étant des protéines complexes et de haut poids moléculaire (environ 150 kDa), elles peuvent porter de nombreuses PTMs et par conséquent, former une multitude de

micro-hétérogénéités. Le nombre de PTMs ainsi que leur nature peut justifier le manque d'efficacité totale de ces traitements sur les patients. En parallèle des PTMs de faible masse communément observées, d'autres PTMs beaucoup plus imposantes et notamment les glycosylations peuvent être caractérisées et quantifiées. Ces glycosylations sont des enchaînements de petites structures glucidiques qui ont été indexées comme attributs de qualité contrôle (CQA) par les agences des médicaments pour leur impact sur l'efficacité d'une molécule. Plus concrètement, une mauvaise glycosylation peut modifier la structure 3D de la protéine et mener à une inefficacité totale de celle-ci puisqu'elle sera incapable d'interagir avec l'antigène cible. La recherche de nouvelles molécules toujours plus efficaces dans un marché en constante croissance explique le très grand nombre de candidats aux essais cliniques ainsi que la nécessité de techniques analytiques puissantes afin de caractériser les molécules de manière précise, fiable et à haut-débit.

Ces dernières décennies, la spectrométrie de masse (MS) s'est révélée comme étant une puissante technique analytique. Le développement de différentes sources ainsi que le couplage de la MS avec des techniques séparatives a permis de faire progresser les outils permettant de caractériser des molécules dans des échantillons complexes. Outre le couplage de référence de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec la MS, des couplages de techniques électrophorétiques ont été employés. Parmi ces couplages, celui de l'électrophorèse capillaire (CE) à la MS a été étudié en développant de nouvelles interfaces afin de permettre une analyse directe des composés séparés. La CE permet une séparation des molécules sous un champ électrique dans un système miniature, afin d'obtenir une puissante efficacité de séparation en un temps réduit et avec une consommation d'échantillon minimale. La séparation de molécules chargées en CE est régie par deux phénomènes propres à cette technique que sont la mobilité électrophorétique (μ_{ep}) et la mobilité électroosmotique (μ_{eo}). μ_{ep} est définie par l'attraction due aux forces électriques d'un ion vers le pôle de charge opposée. Quant à μ_{eo} , elle est induite par l'écoulement de l'électrolyte support sous l'effet d'un champ électrique et dépendant de la charge de surface du capillaire. La combinaison de ces phénomènes permet une séparation des molécules suivant leur charge et leur rayon hydrodynamique. Au vu des propriétés intrinsèques de la CE, la majorité des développements du couplage CE-MS a porté sur la mise en place d'interfaces compatibles avec une source par électro-nébulisation (CE-ESI-MS).

Historiquement, la première interface couplant la CE à la MS nécessitait l'utilisation d'un liquide additionnel (sheath-liquid) afin de conserver le champ électrique impliquant la séparation. Cependant, ce type d'instrumentation produisait un effet de dilution des analytes en sortie de capillaire, ce qui nuisait à l'efficacité de séparation des composés. Plus récemment, un autre concept n'utilisant pas de liquide additionnel a été étudié. Cette interface appelée sheathless fonctionne avec un capillaire rendu poreux à son extrémité afin d'être perméable aux électrons et aux petits ions dans

le but de conserver un champ électrique. Cette interface sheathless permet alors de limiter la dilution des analytes et ainsi augmenter l'efficacité de séparation et la détection des composés en MS.

La CE a longtemps souffert de son manque de robustesse et de répétabilité mais les avancées technologiques récentes et le développement de systèmes de plus en plus fiables ont permis un renouveau de cette technique notamment au travers du couplage avec la MS. L'utilisation de ce système a démontré un intérêt considérable pour la caractérisation fine des biomolécules thérapeutiques et notamment des mAbs. Les premières analyses basées sur une digestion enzymatique puis leur analyse en CE-ESI-MS ont démontré la possibilité de retrouver la séquence complète en acides aminés ainsi que les modifications présentes sur des protéines en une seule injection.

Il existe 3 niveaux pour caractériser les biomolécules thérapeutiques qui permettent d'obtenir des informations complémentaires sur la composition des mAbs, leur structure, les PTMs présentes ainsi que leur localisation sur la chaîne protéique.

Le niveau d'étude le mieux maîtrisé est le niveau « bottom-up ». Il s'agit de passer par une digestion enzymatique de l'échantillon afin d'obtenir un mélange peptidique qui sera analysé et qui permettra de remonter à la structure primaire de la molécule. Ce niveau permet d'obtenir la séquence en acides aminés qui compose la molécule, les différentes modifications ainsi que leur localisation. Il est également possible de quantifier ces PTMs afin d'avoir une illustration de la répartition des différentes PTMs sur les variants de mAbs.

Le second niveau est un niveau intermédiaire qui nécessite l'utilisation d'une enzyme spécifique qui va cliver en 2 ou 3 fragments le mAb. Ce niveau d'étude appelée « middle-up » est un peu plus complexe et permet de schématiser les différentes combinaisons de PTMs qui peuvent s'appliquer sur les mAbs. On aura alors la possibilité de séparer les variants dépendant de ces micro-hétérogénéités et une localisation partielle de ces PTMs.

Enfin, le niveau d'étude le plus complexe qui est la glycoprotéine intacte. L'objectif est d'avoir une représentation la plus fidèle possible de ce qui est présent dans le traitement administré au patient. Pour cela, les échantillons doivent subir le moins de modifications possibles et donc une préparation d'échantillon minimaliste. La difficulté majeure de l'analyse et la caractérisation de biomolécule réside dans l'imposante taille donc la masse conséquente des protéines.

Le premier objectif de ma thèse était de valider la méthode CE-ESI-MS en bottom-up pour la caractérisation et la quantification relative des différentes glycoformes présentes sur les mAbs.

L'autre objectif a été de développer des méthodes de séparation et d'analyse sur ce même couplage pour la caractérisation des mAbs aux niveaux middle-up et intacte.

Ces travaux de thèses se sont donc portés sur l'analyse à ces différents niveaux d'anticorps monoclonaux et sont divisés en trois parties :

- La première partie concerne l'introduction et la revue bibliographique. Elle contient une présentation des mAbs, de leur découverte jusqu'à leur utilisation dans les traitements ainsi que leur développement sur le marché des molécules biopharmaceutiques. Une liste non exhaustive des méthodes permettant de les analyser sont issues de la bibliographie et permettent de comprendre les travaux en termes de caractérisation de biomolécules.
- La seconde partie concerne la validation d'une méthode CE-ESI-MS au niveau bottom-up pour la caractérisation et la quantification relative des glycosylations présentes sur les mAbs.
- La dernière partie concerne l'étude des mAbs aux niveaux intact et middle-up par le couplage CE-ESI-MS. Tout d'abord, la mise au point des conditions de séparation ainsi que les méthodes d'analyse des mAbs seront décrites. Ensuite, les résultats de séparation de micro-variants à l'aide des paramètres précédemment décrits seront présentés.

PARTIE I : Introduction et revue bibliographique

Chapitre I : L'origine des anticorps monoclonaux (mAbs) dans l'immunothérapie

1. Introduction

Souvent cataloguées sur la liste des maladies du siècle, les cancers et les maladies auto-immunes sont devenues un véritable phénomène de société. Dans un rapport daté de janvier 2019, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a répertorié ces maladies parmi les 10 menaces sur la santé publique mondiale. N'épargnant aucune population, elles ont la plus forte incidence de mortalité dans les pays industrialisés et suscitent une attention particulière afin de trouver des solutions préventives et curatives. Les premiers traitements contre ces maladies ont été fondés sur l'administration de petites molécules constituant la chimiothérapie. Cependant, devant la lourdeur du traitement et l'efficacité aléatoire de la chimiothérapie, de nouvelles solutions ont été recherchées afin d'accroître le taux de survie ainsi que d'alléger les soucis logistiques liés à un traitement. Des pistes alternatives telles que l'immunothérapie, basée sur l'administration d'anticorps monoclonaux (mAbs), ont été développées. Les premiers tests cliniques ont démontré une efficacité de ces traitements contre de nombreuses maladies, notamment les cancers. La stratégie de guérison a été modifiée, afin de pouvoir augmenter l'efficacité des traitements et limiter les effets secondaires infligés aux patients.

Contrairement à la chimiothérapie, qui cherche à détruire directement les tumeurs, l'immunothérapie va orienter le système immunitaire vers la reconnaissance des cellules tumorales afin de les éliminer. Pour cela, il a fallu identifier les empreintes antigéniques uniquement exprimées par les cellules tumorales afin de produire des anticorps spécifiques de ces antigènes. Le concept développé depuis les années 1980 est basé sur la très forte spécificité des anticorps notamment les mAbs à se lier à un antigène particulier.

Les mAbs sont des protéines présentes dans toutes les cellules vivantes et constituent une partie du système immunitaire de chaque individu. Dans le cas des cancers, les cellules tumorales détournent le système immunitaire afin de pouvoir se développer sans être éliminées. L'immunothérapie a pour but d'administrer des mAbs spécifiques d'antigènes tumoraux afin de faire réagir le système immunitaire et ainsi détruire uniquement les cellules tumorales et ce, dès leur détection.

Les mAbs peuvent être produits par les êtres vivants et ont donc pu être développés par le biais de cultures *in vitro* de lignées cellulaires. Les premiers mAbs ont été produits par des lignées murines, cependant les anticorps murins impliquaient une forte immunogénicité chez les humains, poussant ainsi leur système immunitaire à se défendre contre les traitements. Les manipulations des

génomés grâce au génie génétique ont permis l'amélioration des traitements étape par étape jusqu'à obtenir des anticorps monoclonaux humanisés ou même humains qui n'alerteront pas le système immunitaire du patient.

Les cibles thérapeutiques de ces mAbs continuent d'être identifiées, renforçant leur développement ainsi que la commercialisation d'autres molécules « copies » des mAbs originaux. Parmi elles, les biosimilaires sont des molécules basées sur les mAbs dont les brevets sont arrivés à leur terme et ne sont donc plus protégées commercialement. Le développement de ces biosimilaires reste très encadré et doit respecter bon nombre de lignes directrices imposées par les organisations de santé et de médicaments.

Le marché de ces nouveaux traitements basés sur des molécules biopharmaceutiques a connu un essor des plus remarquables jusqu'à classer plusieurs mAbs ou dérivés dans le top 10 des ventes annuelles de médicaments. En tenant compte du nombre de molécules candidates aux essais cliniques ainsi que du nombre de médicaments autorisés à la mise sur le marché à l'échelle annuelle, les prédictions s'orientent vers une augmentation continue des ventes de mAbs et dérivés jusqu'à, peut-être, constituer le top 10 des ventes de biomolécules thérapeutiques.

2. Théorie des anticorps et du système immunitaire

Les mAbs et leur importance dans le système immunitaire ont été découverts à la fin du XIX^{ème} siècle à la suite de travaux sur les toxines. Dès 1890, Emil Von Behring a montré que la résistance à la toxine diphtérique exprimée chez un animal peut être transférée à un autre animal par transfert de sérum [1]. Il en conclut que le sérum contient certaines antitoxines que l'on appellera plus tard anticorps. Les travaux sur les toxines ont été poursuivis et l'utilité de molécules désignées par le terme anticorps monoclonaux a été mise en valeur dans de nombreux cas, notamment contre la ricine ou encore l'abrine [2]. L'hypothèse d'Ehrlich était fondée sur le concept que les lymphocytes exprimaient tous les antigènes possibles. Etant donné la multitude de récepteurs et leur nombre supérieur par rapport au génome humain (10^6 gènes), la théorie a été réfutée mais ses avancées sur les interactions antigène-anticorps dans le domaine de l'immunité lui ont valu de recevoir le prix Nobel de médecine en 1908.

En 1956, une autre théorie va être proposée par Niels Jerne. Cette théorie est basée sur le fait que les immunoglobulines (Ig) portent des marqueurs idiotypiques (parties variables du mAb) qui correspondent au site de fixation antigène-anticorps. La théorie suppose que les différents idiotypes exprimés induisent la formation d'anti-anticorps ressemblant au motif de l'antigène. On pourrait alors avoir une image de l'empreinte moléculaire nécessaire pour la formation d'un complexe antigène-anticorps [3]. Dès 1974, Frank Burnet améliora la théorie des réseaux idiotypiques de Jerne en supposant que les lymphocytes portent sur leur surface des immunoglobulines spécifiques qui seraient ensuite multipliées une fois l'antigène correspondant fixé sur l'Ig. L'antigène unique correspondrait alors à l'élément déclencheur de la prolifération des cellules portant l'anticorps spécifique à l'antigène. Il y a alors génération de clones exprimant un seul anticorps spécifique, c'est la définition actuelle de l'anticorps monoclonal [4]. Cette théorie leur permit de recevoir le prix Nobel de médecine en 1984.

Les travaux sur le système immunitaire ont permis de découvrir son activation après infection par une toxine ou un virus. On comprend alors que certains types de cellules comme les leucocytes et notamment les cellules T jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement du système immunitaire lors d'une attaque par un individu étranger tels que les virus ou encore les bactéries. En 1980, Reinherz *et al.* ont mis en évidence la régulation des sous-populations de cellules T responsables du système immunitaire. Ils démontrent que l'immunodéficiency d'un individu dépend de la perte de gènes

activateurs des cellules T ou de la surexpression de gènes répresseurs des cellules T. Ils développent alors l'idée d'orienter les mAbs afin de lutter contre ces déséquilibres biologiques [5]. De nombreuses équipes de recherche ont travaillé sur les anticorps OKT [6] et beaucoup ont prouvé l'efficacité de ces molécules pour éviter les rejets de greffon lors de greffe d'organe [7]. Le développement de ces molécules et leur étude plus vaste permettra de comprendre leur potentiel sur de nombreuses maladies telles que différents cancers ainsi que des maladies auto-immunes.

3. La production des anticorps monoclonaux

Deux techniques majeures ont été développées puis optimisées afin de produire des mAbs spécifiques, identiques et en quantité suffisante pour imaginer les commercialiser sous forme de traitements.

La première solution proposée a été la technique des hybridomes, qui consistait à utiliser des croisements génétiques entre deux types de cellules afin de combiner leurs propriétés. Les hybridomes sont des cellules résultant du croisement entre une cellule lymphoïde normale de mammifère et une cellule myélomateuse de tumeur maligne du système immunitaire. L'objectif de ce croisement est d'obtenir une cellule capable à la fois de produire des anticorps de manière spécifique comme le lymphocyte, mais aussi d'obtenir un caractère « d'immortalité » de la cellule cancéreuse. Une fois sélectionnés, les hybridomes donnent des lignées stables immortalisées productrices de mAbs.

Les avancées scientifiques dans le domaine du génie génétique ont permis d'obtenir près de 20 ans plus tard un autre moyen de produire les mAbs, plus rapide, plus facile à contrôler et sélectionner : le phage display. Le phage display consiste en l'utilisation de bactériophages dont on va modifier l'ADN pour qu'ils expriment des peptides ou des protéines d'intérêt notamment les mAbs. On va ensuite infecter des bactéries avec ce phage et utiliser leur machinerie de développement pour qu'elles expriment les gènes responsables des anticorps désirés comme s'ils faisaient partie de leur propre patrimoine génétique.

3.1. Technique des hybridomes – croisement de souris

La découverte de la production d'anticorps monoclonaux en 1975 par la technique des hybridomes a récompensé Georges Köhler et César Milstein du prix Nobel de médecine en 1984. Lors

de leurs travaux, ils ont mis au point une culture de cellules capable de sécréter des anticorps dont ils connaissaient la spécificité. L'anticorps MOPC 21 est une immunoglobuline G 1 (IgG1) créée à partir d'hybridomes et qui a été séquencée entièrement lors de sa caractérisation [8]. D'autres anticorps ont été développés à l'aide de cette technique notamment les anticorps orthoclones OKT 1, 3 et 4 afin de pouvoir cibler des cellules T exprimées chez l'humain. L'utilisation d'hybridomes a alors connu un véritable essor pour produire spécifiquement des mAbs désirés et de manière contrôlée (*Figure 1.1 chemin supérieur*) [9]. Les gènes codant pour les immunoglobulines humaines sont utilisés pour fournir l'information génétique en les incorporant au génome de la souris (*Figure 1.1 a*). Les souris transgéniques qui en résultent sont immunisées avec des antigènes cibles afin de stimuler la réponse immunitaire in vivo pour générer des cellules B secondaires (*Figure 1.1 b*). Ces cellules B secondaires sont clonées et sélectionnées (*Figure 1.1 c*) par technique des hybridomes afin de produire spécifiquement les mAbs. La caractérisation in vitro de ces mAbs candidats permettra la sélection des molécules à tester sur les patients humains (*Figure 1.1 d*). Le premier mAb autorisé à la mise en vente sur le marché par la Food and Drug Administration (FDA) a été l'orthoclone OKT 3 (muromonab-CD3) en 1986, utilisé comme immunosuppresseur pour éviter les rejets de greffe d'organes solides comme le rein.

Les hybridomes ont été largement utilisés notamment pour la production de mAbs chimériques murins/humains. Les mAbs spécifiquement produits sont variés : IgA, IgE, IgG1, IgG2, IgM afin de cibler des antigènes particuliers pour identifier et soigner diverses maladies. La création de mAbs chimériques par transfection de cellules issues de la lignée cellulaire S107 de myélome murin a permis d'obtenir différentes immunoglobulines comportant une partie variable murine et une partie constante humaine [10]. D'autres hybridomes ont été fabriqués pour obtenir à l'échelle protéique des régions variables d'IgM de souris couplées à des régions constantes humaines d'IgM afin de cibler l'antigène spécifique haptène trinitrophenyl (TNP) [11].

Afin de limiter les risques d'immunogénicité, des essais ont été réalisés en utilisant la technique des hybridomes à partir de cellules humaines. Des croisements ont été réalisés grâce à des lymphocytes, des lignées cellulaires du myélome ou encore en immortalisant des lymphocytes humains grâce au virus d'Epstein-Barr. Les résultats peu fiables, la quantité d'anticorps produite insuffisante ainsi que des questions d'éthique ont été soulevées dû au fait d'utiliser des lymphocytes de patients [12] et ont mené à un arrêt des recherches sur les cellules humaines.

L'évolution des techniques de génie génétique a permis d'imaginer d'autres solutions pour contourner les limites de l'hybridome. Les principaux obstacles identifiés étaient le temps de génération référencé comme long, l'identification incomplète d'épitopes mais aussi le besoin d'humaniser les mAbs pour diminuer l'immunogénicité des mAbs produits. La découverte de bactériophages et de leur potentielle utilisation comme vecteur d'expression de gènes codant pour des anticorps monoclonaux a offert de nouveaux outils.

[3.2. Technique phage display – construction de banques protéiques](#)

En 1990, McCafferty *et al.* utilisent une technique très récente de génie génétique pour insérer un gène dans un phage filamentueux afin qu'il produise le motif peptidique ou protéique correspondant et l'exprime à sa surface (*Figure 1.1 chemin inférieur*). Cette technique appelée phage display va permettre d'insérer un gène de région variable d'immunoglobuline dans un phage. Leurs résultats montrent qu'il est possible de faire exprimer une chaîne variable complète d'immunoglobuline par un phage et de le fixer spécifiquement à un antigène rare ($1/10^6$) par chromatographie d'affinité [13]. Pour la technique de phage display, l'information génétique humaine est récoltée grâce à la réorganisation des gènes présents dans les cellules B primaires et secondaires (*Figure 1.1 e*). Ces gènes peuvent être utilisés directement ou en combinaison avec des gènes de synthèse afin de fournir une plus grande diversité pour construire des banques de données. Les protéines ainsi fabriquées par les bactériophages seront des protéines de surface comprenant une diversité de domaines de liaison avec les anticorps (*Figure 1.1 f*). Les banques de données peuvent être filtrées pour sélectionner et isoler des séquences variables individuelles qui se lient spécifiquement à un antigène cible (*Figure 1.1 g*). Les séquences de régions variables clonées sont ensuite utilisées pour générer des anticorps entiers, ou des fragments d'anticorps, qui peuvent être caractérisés pour sélectionner un candidat principal (*Figure 1.1 h*).

L'idée d'utiliser des phages se développe et un phage appelé M13 qui infecte les bactéries *E. Coli* paraît particulièrement intéressant pour obtenir des bibliothèques d'anticorps combinatoires. Ce phage est encore très utilisé de nos jours car il ne lyse pas les cellules infectées et donc utilise la machinerie cellulaire afin de se multiplier sans tuer directement la cellule hôte. Il devient alors accessible de fusionner les gènes des fragments impliqués dans l'accroche avec l'antigène (Fab) avec la partie Carboxyle terminale des protéines du gène III du phage. Ces phages modifiés, appelés « phage displaying fab fragments » (Phabs), vont surexprimer ces fragments Fab entre 10³ et 10⁵ fois plus qu'un phage normal. C'est le début d'une nouvelle technique de clonage d'anticorps monoclonaux et de la fabrication de banque de séquences de fragments d'anticorps [14]. Il est possible d'insérer de

nombreux gènes qui permettront de synthétiser les protéines correspondantes et notamment une large gamme d'immunoglobulines, donc d'anticorps monoclonaux. Des mAbs issus de phage display qui ont été optimisés sont toujours commercialisés de nos jours comme le Palivizumab qui est une IgG1 dirigée contre un épitope du site antigénique A de la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial (VRS) [15].

Des bibliothèques de gènes et de protéines correspondantes sont alors mises en place et les techniques de purification de ces mAbs exprimés permettront d'identifier les antigènes correspondants afin de produire et commercialiser des mAbs en vue de thérapies ciblées. La compréhension du code génétique et de la production de protéines à partir de gènes permet de fabriquer des séquences peptidiques et protéiques avec des propriétés biologiques particulières (affinité, accroche, spécificité, fonction effectrice...) à la fois *in vitro* et *in vivo* [16]. La multiplicité de mAbs ainsi produits a traduit une augmentation exponentielle des molécules candidates aux essais cliniques [12].

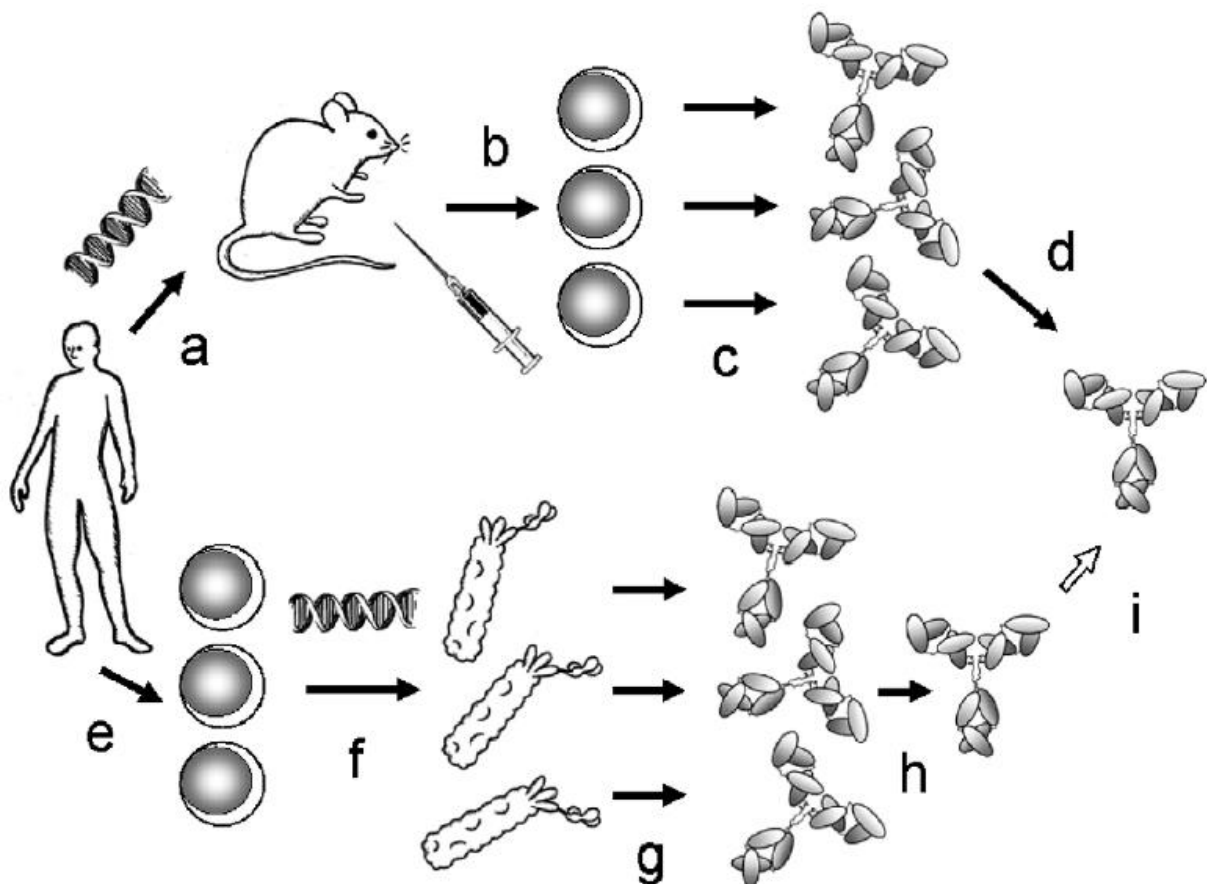


Figure 1.1: Représentation schématique du processus de découverte de médicaments par les techniques de souris transgéniques et de phage display. Extrait de [17]

Le *Tableau 1.1* ci-dessous répertorie les avantages et les inconvénients des deux techniques de production d'anticorps monoclonaux.

	Hybridome	Phage Display
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Production à grande échelle • Rendements élevés • Forte spécificité • Forte sensibilité des mAbs • Faible coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Production à grande échelle • Procédé rapide • Contrôle du procédé à chaque étape • Filtrage des clones facile • Screening de bibliothèques humaines • Screening des antigènes toxiques • Pas de problèmes d'immunogénicité • Pas de problèmes de viabilité des clones • Accès direct à la séquence • Pas d'utilisation d'animaux
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • Temps de génération long • Identification incomplète des épitopes • Humanisation des mAbs parfois nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût plus important • Affinité pouvant être biaisée • Techniquement plus compliquée

Tableau 1.1 : Avantages et inconvénients des techniques utilisées pour la production de mAbs.

4. Structure classique d'un anticorps monoclonal

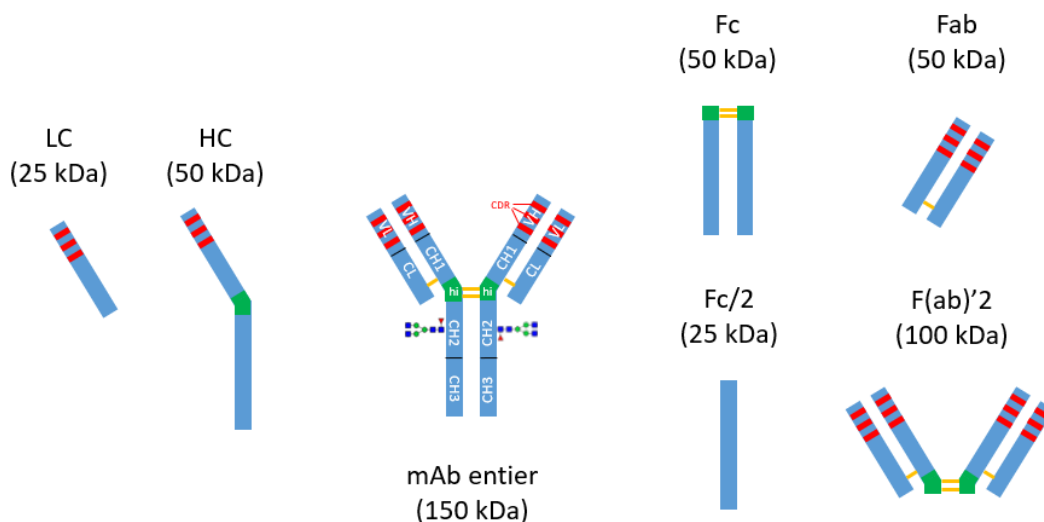


Figure 1.2 : Représentation schématique de la structure d'un mAb et de ses différentes régions. Au centre, le mAb entier en forme de Y, à gauche les chaînes qui le composent et à droite les fragments caractéristiques. Les masses approximatives sont inscrites pour chaque fragment.

Les techniques de production précédemment décrites permettent d'obtenir des mAbs utilisés dans les traitements biopharmaceutiques. Ces mAbs sont des glycoprotéines de type immunoglobulines qui ont une structure caractéristique en forme de Y et une masse d'environ 150 kDa. Cette structure présentée en [Figure 1.2](#) est composée de 2 chaînes lourdes (HC) et de 2 chaînes légères (LC) liées entre elles par des ponts disulfures au niveau de résidus cystéines et dont le nombre peut varier selon le type d'Ig.

Chacune de ces chaînes sont composées de 2 types de domaines :

- La région constante, propre aux familles d'anticorps et impliquée dans le système de reconnaissance avec le système immunitaire : C_H pour la HC et C_L pour la LC.
- La région variable qui est la partie structurale qui va être impliquée dans la reconnaissance avec l'épitope de l'antigène ciblé : V_H pour la HC et V_L pour la LC.

Chaque partie variable des mAbs contient des régions hypervariables appelées *complementarity determining regions* (CDR) qui confèrent la spécificité accrue de l'anticorps monoclonal pour un épitope particulier.

La partie supérieure d'un anticorps qui correspond à la partie de fixation à l'antigène est appelée F(ab) pour *fragment antigene binding* tandis que la partie inférieure également décrite sur la [Figure 1.2](#) est nommée Fc pour *fragment cristallizable*. Selon l'enzyme de coupure utilisée pour obtenir les fragments, le site exact de scission sera différent et pourra donner des fragments F(ab)'2 si la coupure a lieu juste en dessous de la région charnière et Fc/2 si les fragments Fc ne sont plus reliés par des ponts disulfures.

Au-delà de l'évolution des techniques de production et des recherches pour diminuer l'immunogénicité des mAbs, de nouveaux critères ont été identifiés afin d'atteindre l'innocuité maximale des traitements. Lors des étapes de production et de conditionnement des mAbs, certaines modifications chimiques peuvent intervenir et nuire à la qualité des traitements proposés. En leur qualité de protéine, les mAbs sont régulièrement impactés par des modifications post-traductionnelles (PTMs) qui vont modifier la structure nette de la molécule. Ces PTMs peuvent induire ou non des différences de masse et surtout avoir potentiellement une influence sur la conformation tridimensionnelle des mAbs et ainsi modifier l'activité fonctionnelle de ces derniers. Ces modifications sont qualifiées de CQA par les organismes de santé publique et ont permis d'instaurer des lignes directrices dans le processus de fabrication des traitements. Parmi ces CQA, on retrouve en plus de la séquence primaire en acide aminés des mAbs et certaines modifications post-traductionnelles (PTMs)

qui peuvent influencer les conditions physico-chimiques du mAb et le rendre inactif. D'autre part, des PTMs dont la nature et la position sont dépendantes du mAb étudié et interviennent sur les régions CDR sont qualifiées de *PTMs hot spots* car leur influence sera d'autant plus importante qu'il sera nécessaire de les contrôler afin d'assurer la stabilité de l'échantillon.

Parmi les PTMs d'intérêt, on trouve conventionnellement :

- La cyclisation de l'acide glutamique au niveau du N-terminal de la HC pour obtenir un acide pyroglutamique (pE) ($\Delta = - 17,03$ Da)
- La déamidation d'asparagine en acide aspartique (deaN) ($\Delta = + 0,98$ Da)
- L'isomérisation d'acide aspartique (isoD) ($\Delta = + 0,00$ Da)
- L'oxydation des résidus méthionine (oxyM) ($\Delta = + 15,99$ Da)
- Les formes de N-glycosylations

L'exemple illustré sur la [Figure 1.3](#) est le trastuzumab ainsi que les principales PTMs hot-spots identifiées et connues dans la littérature.

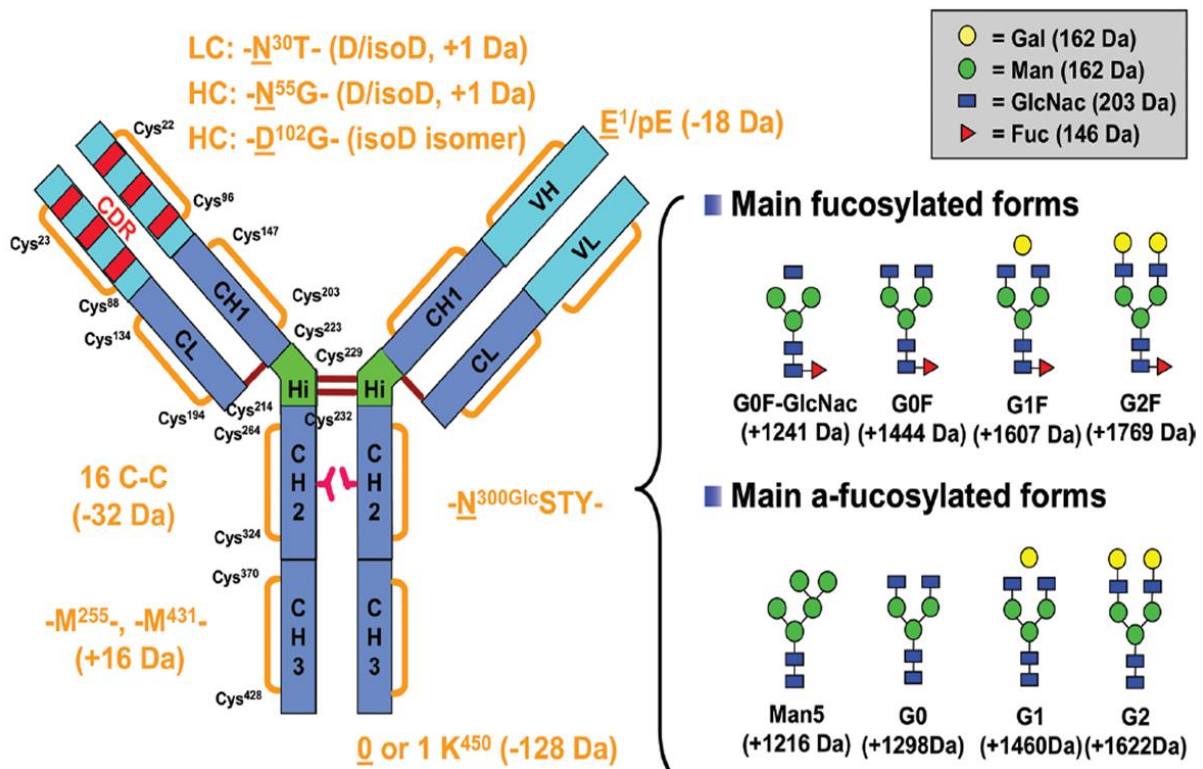


Figure 1.3 : Représentation schématique du trastuzumab et des principales PTMs hot-spots portées par cet anticorps. Les principales formes de glycosylation présentes sur le trastuzumab et leur masse sont associées. Extrait de [18]

Parmi ces PTMs, on retrouve les N-glycosylations, qui se sont révélées comme capitales dans la stabilité des protéines. La caractérisation de ces N-glycosylations a nécessité le développement de méthodes analytiques rapides et précises afin de mieux comprendre leur structure et incidence sur l'activité protéique des mAbs. Des technologies de production de mAbs ont été imaginées afin d'orienter la synthèse de ces N-glycosylations sur des sites particuliers et avec des structures précises afin d'accroître l'efficacité de ces molécules. Du fait de leur localisation ainsi que leur structure, la caractérisation des N-glycanes a suscité un grand intérêt pour les industries biopharmaceutiques afin d'optimiser la production de mAbs efficaces. Diverses méthodes analytiques s'appuyant sur une détection par fluorescence ou par le rapport masse sur charge des N-glycosylations ont été étudiées afin de mieux cerner les mécanismes de biosynthèse et de maturation des glycoprotéines [19]. La biosynthèse des N-glycanes commence dans le réticulum endoplasmique et se termine dans l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de 3 étapes majeures décrites dans la [Figure 1.4](#). L'enchaînement d'unités monosaccharidiques à partir d'un résidu asparagine sur le squelette protéique conduit à une multitude de combinaisons glycaniques qui vont conférer l'activité biologique des mAbs [20]. L'étude des structures glycaniques et leur influence sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des mAbs ont également été investiguées [20].

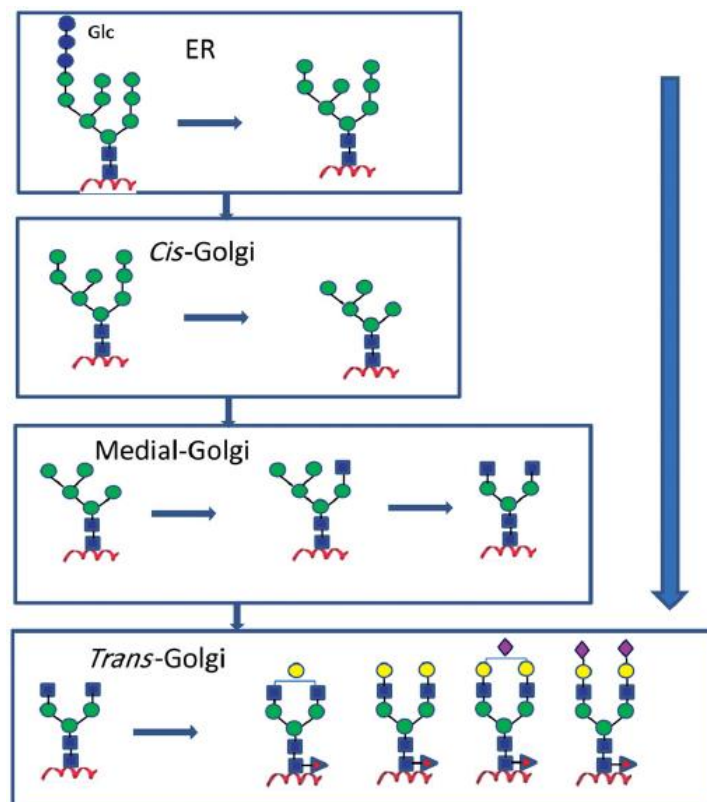


Figure 1.4 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des N-glycanes chez les mammifères. ER : Réticulum endoplasmique. Extrait de [20].

Les mAbs ne possédant pas de résidu fucose sont plus efficaces à des concentrations plus faibles que les mAbs fucosylés [21]. Le principe développé par Yamane-Ohnuki *et al.* a été d'orienter la synthèse des N-glycosylations afin d'éviter les fucosylations des mAbs. Pour cela, trois stratégies ont été décrites. La première songeait à exploiter les cascades de glycosylations sans fucosylation, la seconde était d'inactiver les voies enzymatiques des cellules de mammifères permettant la fucosylation et la dernière consistait à synthétiser *in vitro* les formes afucosylées ou modifier les N-glycanes de manière enzymatique afin de les défucosyler [21].

5. L'optimisation des mAbs

5.1. [Des anticorps murins aux chimères](#)

Les premiers traitements basés sur les anticorps monoclonaux ont révélé un problème majeur d'immunogénicité lors de l'administration aux patients [22]. En effet, ces traitements ont été produits à partir d'anticorps exprimés par des cellules de souris. Lors de leur administration aux patients, une réaction du système immunitaire humain était déclenchée, due à la détection de molécules étrangères à l'humain [22]. Cela s'explique par le fait que les chaînes protéiques formant les mAbs possédaient des séquences en acides aminés compatibles avec les antigènes cibles mais qui étaient reconnues comme faisant partie d'un individu étranger. Les différences de séquences protéiques entre les mAbs humains et les mAbs murins étant faibles, l'anticorps reconnaissait l'antigène cible mais ne se liait pas avec une parfaite complémentarité (*Figure 1.5*).

Les connaissances sur les manipulations des génomes de cellules de mammifère étant grandissantes, la piste d'une hybridation protéique entre une partie murine et une partie humaine est explorée afin de réduire considérablement les effets immunogènes des traitements. Le but de cette expérimentation est de continuer à faire produire les mAbs en grande quantité mais avec des domaines humains situés au site de fixation anticorps-antigène. La technique des hybridomes permet alors de développer des anticorps chimériques composés de partie constante humaine et de partie variable murine. Les premiers résultats montrent une chimère où des régions variables d'IgM de souris sont hybridées à une partie constante humaine d'IgM afin de cibler spécifiquement l'antigène haptène trinitrophenyl (TNP) [11]. S'en suivent alors des transfections de lignées cellulaires murines avec des génomes humains afin d'obtenir des anticorps chimériques et orienter les mAbs vers de nouvelles cibles exprimées dans le cas de maladies [10, 23, 24].

Durant les premières phases de test dans les années 1980, le potentiel des mAbs est démontré sur un grand nombre de pathologies telles que différents cancers ou encore des maladies auto-immunes [25]. Cependant, les suivis de patients montrent une faible élimination des cellules ciblées par les mAbs ainsi qu'une cytotoxicité induite, dépendante des anticorps administrés. De nouvelles solutions sont alors proposées afin d'améliorer l'efficacité des traitements et limiter les effets indésirables. L'objectif est d'augmenter le nombre de cellules effectrices, améliorer l'échéancier d'administration des mAbs, on imagine pouvoir ajouter des molécules cytotoxiques ou des radioisotopes liés directement aux mAbs [26].

5.2. [Des chimères aux mAbs humains](#)

L'utilisation des mAbs dans les traitements a suscité un grand intérêt et de nouvelles molécules propres à des pathologies ont été identifiées comme pouvant être ciblées par ces traitements. Des critères de qualité de traitement sont mis en avant telles que le choix de l'agent effecteur, la possibilité d'utiliser les mAbs directement comme effecteurs, la conjugaison de mAbs à des cytotoxines ou à des radioisotopes, la pharmacocinétique et la bio-distribution ou encore la faible immunogénicité [27, 28]. Ce dernier critère et l'arrivée de la technique de phage display permettent une optimisation rapide des mAbs grâce à la création des bibliothèques de gènes et de protéines générées [29]. Deux étapes d'amélioration des mAbs ont été réalisées successivement afin de rendre les mAbs les moins immunogènes possibles : les mAbs humanisés et les mAbs humains.

Les mAbs humanisés consistent en une amélioration des chimères murines en ne conservant que les parties hypervariables CDR (*Figure 1.5*). Ces mAbs humanisés élargissent les cibles thérapeutiques et ont montré une plus grande spécificité et efficacité vis-à-vis d'antigènes présents dans des cancers de colon [30] ou encore en sérothérapie. Une IgG 1 humaine a été remodelée en introduisant 6 CDR de chaînes lourdes (HC) et de chaînes légères (LC) d'anticorps de rat dirigés contre les lymphocytes humains. Les résultats ont montré la même efficacité pour les anticorps humanisés et pour les anticorps de rat mais une efficacité accrue pour la lyse avec médiation cellulaire [31]. La modification des sites CDR réduit voire annule les réactions immunitaires induites lors de la prise de traitement en réduisant l'activité des cellules T grâce à une différence des épitopes CD4+. Une modification de seulement deux acides aminés dans la séquence des CDR qui n'interviennent pas dans le site de liaison entre le mAb et l'épitope a montré une diminution de 11% des variants responsables de l'immunogénicité. Ce type de modifications induites a permis de mieux comprendre et de localiser les CDR présents sur plusieurs mAbs et ont montré une différence de réponse des cellules T lors de la

reconnaissance entre le mAb et l'épitope CD4+, permettant alors d'orienter une humanisation des mAbs [32].

Une technique alternative pour l'humanisation des mAbs a été développée à la fin des années 1980. La stratégie a été de plaquer des séquences humaines sur le site de reconnaissance du mAb avec l'antigène afin de cacher les séquences murines et limiter l'immunogénicité. Les deux séquences variables étant très proches chez l'Homme et la souris, le remplacement des acides aminés qui sont considérés sur le site de fixation ne va impacter que très peu la liaison anticorps-antigène mais diminuer fortement l'immunogénicité [33].

Il est possible de créer des bibliothèques de cellules, d'ADN et de mAbs par différents moyens :

- Expression par cellule de mammifère
- Vecteurs viraux pour exprimer les mAbs dans des cellules d'insecte
- Production de mAbs par les plantes
- Production dans des micro-organismes eucaryotiques
- Expression par les bactéries
- Expression par E. Coli via le « phage display »

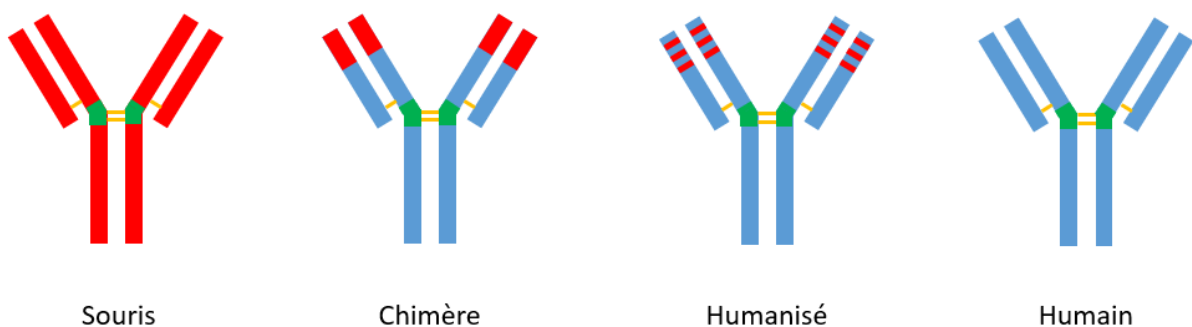


Figure 1.5 : Illustration schématique des 4 types majeurs d'anticorps monoclonaux. En rouge la partie murine et en bleu la partie humaine de l'anticorps.

En 1998, Green *et al.* développent et utilisent la XenoMouse pour la fabrication de mAbs humains (essentiellement des IgG ou IgH) chez la souris [28]. La fabrication d'Ig de souris est désactivée et complètement remplacée par la production de mAbs humains (Figure 1.6).

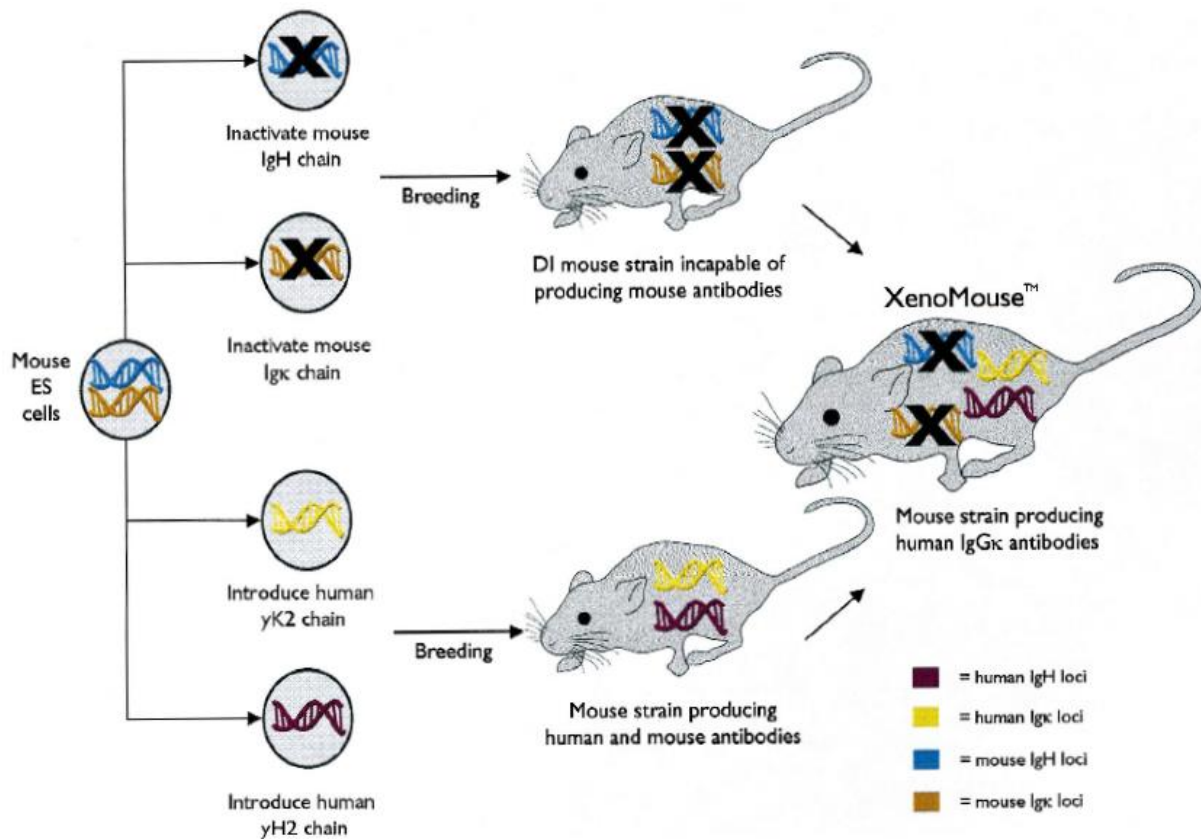


Figure 1.6 : Schéma du génie génétique de souris XenoMouse pour produire des anticorps entièrement humains en l'absence d'anticorps de souris. Extrait de [28].

Deux étapes sont nécessaires pour créer une XenoMouse :

- Une désactivation de la machinerie cellulaire responsable de la production des Ig de souris
- Puis une insertion des *loci* responsables des chaînes lourdes et légères des Ig humaines

Le patrimoine génétique de la XenoMouse est remodelé afin de produire des anticorps uniquement humains. Pour cela, les gènes *Igh* et *Igk* de la souris ont été inactivés séparément en utilisant la recombinaison homologe dans les cellules souches embryonnaires de souris. La transmission des gènes mutés ainsi qu'une succession de croisements ont produit la souche de souris DI, qui est homozygote pour les locus inactivés *Igh* et *Igk* et est incapable de générer des anticorps murins (Figure 1.6 chemin supérieur). Les gènes humains *Igh* et *Igk* contenu sur le $\gamma H2$ et le $\gamma K2$ Yacs ont été intégrés intacts dans le génome de la cellule ES, et utilisés pour générer des souris transgéniques. La descendance de l'entrecroisement des souris transgéniques $\gamma H2$ et $\gamma K2$ a produit des anticorps humains et souris (Figure 1.6 chemin inférieur). Les souris $\gamma H2$ et $\gamma K2$ ont été croisées avec des souris DI, puis rétrocroisées pour produire des souches de Xenomouse, des souches de souris présentant quatre altérations génétiques, intégration de $\gamma H2$ et $\gamma K2$ intacts dans le génome, et homozygotes pour les gènes murins inactivés *Igh* et *Igk*. La Xenomouse, possède des gènes *Igh* et *Igk*

humains fonctionnels mais ceux de la souris non fonctionnels. Cela permet de produire entièrement des mAbs humain IgHk sans contamination de mAbs murins. La difficulté de cette étape réside dans la taille des gènes à insérer qui peut aller jusqu'à plusieurs millions de bases. L'étape d'insertion des gènes responsables des IgG 1, 2 et 4 humaines est réalisée à l'aide d'un Yeast Artificial Chromosome (YAC) sur les cellules souches embryonnaires qui ne sont pas encore différenciées [28].

La technologie ainsi que les cibles utilisées pour concevoir les mAbs vont attribuer un préfixe, un radical et un suffixe qui orientera alors le nom du mAb produit (Tableau 1.2).

Préfixe	Cible		Source		Suffixe
variable	-o(s)-	os	-u-	humain	-mab
	-vi(r)-	virus	-o-	souris	
	-ba(c)-	bactérie	-a-	rat	
	-li(m)-	système immunitaire	-e-	hamster	
	-le(s)-	lésions infectieuses	-i-	primate	
	-ci(r)-	système cardiovasculaire	-xi-	chimérique	
	-mu(l)-	squelette musculaire	-zu-	humanisé	
	-ki(n)-	interleukine	-axo-	hybride rat/souris	
	-co(l)-	colon			
	-me(l)-	peau			
	-ma(r)-	sein			
	-go(t)-	testicule			
	-go(v)-	ovaire			
	-pr(o)-	prostate			
	-tu(m)-	diverses			
	-neu(r)-	système nerveux			
-tox(a)-	toxine				

Tableau 1.2 : Nomenclature utilisée pour nommer un mAb.

Les mAbs humains représentent donc une étape majeure dans le développement des médicaments en éliminant totalement les risques d'immunogénicité et assurent une innocuité limitée de l'immunothérapie.

6. Arrivée des biosimilaires et bio-supérieurs

L'efficacité grandissante des traitements a entraîné une croissance exceptionnelle du marché impliquant des mAbs comme traitement de nombreuses maladies. Ceci a mené des compagnies biopharmaceutiques à vouloir développer des molécules plus efficaces et compétitrices en termes de coût. Les biosimilaires sont des molécules produites à partir d'une source biologique, qui doit avoir la même composition qualitative et quantitative en substance active que le médicament de référence. Cependant, ils ne peuvent pas être qualifiés de médicaments génériques en raison des différences liées à la variabilité de la source biologique ou aux procédés de fabrication. Les molécules doivent respecter les lignes directrices mises en place dès 2009 par l'agence européenne du médicament (EMA) qui cadrent modèles animaux autorisés ainsi que les conditions de tests, des critères au niveau des études cliniques et non cliniques afin de s'assurer de l'innocuité des biosimilaires et bio-supérieurs (appelés également biobetters) [34].

1 st generation mAbs	Biosimilars	Biobetters	2 nd generation	3 rd generation	Alternative formats
CD20					
Rituximab (1997) chlgG1 (CHO) (Rituxan/Mabthera)	Reditux (2007, Dr. Reddy) chlgG1 (CHO)	"Rituximab" GS4:0 aFuc hzlgG1 (<i>Pichia pastoris</i>) Same epitope	Ofatumumab (2009) hlgG1 (CHO) Different epitope and mechanism of action (MOA) (Arzerra)	Obinutuzumab (PhIII) aFuc hlgG1 (CHO) Different epitope and MOA	TRU-015 (PhIIb) SMIP
	TL011 (PhI, Teva/Lonza) chlgG1 (CHO)		Ocrelizumab (PhIII) hzlgG1 (CHO) Same epitope		
TNFα					
Infliximab (1998) chlgG1 (SP2/0) (Remicade)	TNFmab (Pre-clin, LGLS)		Adalimumab (2002) hulgG1 (CHO) (Humira)		Certolizumab (2008) Fab-PEG (<i>E. coli</i>) (Cimzia)
	CT-P13 « infliximab » (PhIII, Celltrion)		Golimumab (2009) hulgG1 (CHO) s.c. every 4 wk (Simponi)		
Etanercept (1998) TNFR-Fc (CHO) (Enbrel)	TNFcept (PhI, LGLS)				
HER2					
Trastuzumab (1998) chlgG1 (CHO) (Herceptin)	CT-P6 « trastuzumab » (PhIII, Celltrion)	Trastuzumab s.c. for- mulation every 4 wk (PhIII)	Pertuzumab (PhIII) hulgG1 (CHO) Different epitope (targets HER2 and HER3)		Trastuzumab emtansine (PhIII) Antibody Drug Conjugate (targets HER2 and tubulin)
		"Trastuzumab" GF15:0 aFuc hzlgG1 (<i>Pichia pastoris</i>) Same epitope			2 in 1, bispecific (targets HER2 and VEGFA)
EGFR					
Cetuximab (2004) chlgG1 (SP2/0) (Erbixux)		CMAB009 (PhI) chlgG1 (CHO)	Necitumumab (PhIII) hulgG1 (CHO) Same epitope		
		Xtend EGFR, M428L/ N434S hzlgG1 (CHO) Fc-engineered (longer half life) Same epitope			
VEGF-A					
Bevacizumab (2004) hzlgG1 (CHO) (Avastin)		Xtend VEGF, M428L/ N434S hzlgG1 (CHO) Fc-engineered (longer half life) Same epitope			Ranibizumab Fab, affinity matu- rated (<i>E. coli</i>) (Lucentis)
VEGF-A					
Bevacizumab (2004) hzlgG1 (CHO) (Avastin)		Xtend VEGF, M428L/ N434S hzlgG1 (CHO) Fc-engineered (longer half life) Same epitope			Ranibizumab Fab, affinity matu- rated (<i>E. coli</i>) (Lucentis)
					2 in 1, bispecific (targets HER2 and VEGFA)
RSV—Prot F					
Palivizumab (1998) hzlgG1 (NS0) (Synagis)			Motavizumab (PhIII, stopped) hzlgG1 affinity matu- rated (NS0) (Numax)	Motavizumab- YTE, long-lasting Fc-engineered version (PhI)	

Tableau 1.3 : Exemples sélectionnés d'anticorps monoclonaux de 1ère, 2ème et 3ème génération ainsi que les biosimilaires et les bio-supérieurs. Issu de [34]

Un biosimilaire est une molécule produite par des techniques de biotechnologie dont le brevet original a expiré et qui présente une équivalence au médicament biologique en termes de qualité, sécurité et d'efficacité. Cette molécule doit être particulièrement proche de la molécule originale notamment en termes de pharmacocinétique (PK) et de pharmacodynamique (PD).

Un bio-supérieur quant à lui peut avoir une meilleure efficacité, une demi-vie plus longue, une fréquence d'administration plus lente, moins de risques de cytotoxicité ou encore une immunogénicité plus faible [35]. Pour des molécules telles que le cetuximab et le bevacizumab, les mutations obtenues chez les bio-supérieurs permettent l'allongement de la vie *in vivo* de la molécule jusqu'à 5 fois. Ceci engendre une amélioration flagrante du rapport coût/efficacité des traitements. On découpe les évolutions des mAbs, biosimilaires et bio-supérieurs en générations selon les étapes d'amélioration d'efficacité ou lors des changements de moyens de production ([Tableau 1.3](#)).

Les bio-supérieurs sont administrés plus rapidement aux patients et plus facilement tout en assurant une efficacité égale voire supérieure ([Tableau 1.4](#)). Si on prend l'exemple du trastuzumab, molécule visant les récepteurs HER2 dans le cadre d'un cancer du sein, la molécule originale est administrée au patient en injection intraveineuse à l'hôpital alors que son bio-supérieur est administrable par une injection sous-cutanée qu'il est possible de faire à son domicile en 5 minutes.

La mise en évidence de critères de qualité appelés « Critical Quality Attributes » (CQA) pour assurer une bonne efficacité et une innocuité du traitement a permis de développer les bio-supérieurs. Ces mAbs possèdent des N-glycosylations non fucosylées qui montrent une meilleure toxicité vis-à-vis des tumeurs que les mAbs avec des N-glycanes présentant un motif fucose [18].

Biosimilaires	Bio-supérieurs
Ont des limites quant à leur structure, L'activité des composés doit être proche de celle du produit de référence	N'ont pas de limites structurelles et peuvent inclure des molécules, des PTMs, et peuvent être considérés comme ayant une « activité » différente par rapport à l'original
Doivent avoir des profils d'innocuité et d'efficacité semblables	Doivent posséder les caractéristiques optimales d'innocuité et d'efficacité

Sont très proches du produit d'origine	Correspondent à des versions modifiées des mAbs originaux
Sont censés être approuvés après avoir démontré la similitude entre produit biosimilaire et de référence, c.-à-d. par des données de comparabilité	Sont comme de nouveaux médicaments et sont censés être utilisés dans le cadre d'une application complète de nouveaux médicaments ou de produits hybrides avec toutes les données d'essais cliniques/non cliniques nécessaires.
N'ont pas droit à la protection par brevet ni à l'exclusivité de données	Peuvent obtenir un brevet ou des exclusivités de données basées sur leur caractère innovant.

Tableau 1.4 : Comparaison entre les biosimilaires et les bio-supérieurs. Issu de [35].

Le 27 juin 2013, l'EMA a autorisé la mise sur le marché de deux biosimilaires de l'infliximab : Remsima™ et Inflectra™ [36]. Depuis cette date, plusieurs biosimilaires ont été développés et le marché n'a cessé de croître d'année en année avec des augmentations entre 7,2 et 18,3 %. En 2019, 11 biosimilaires sont sur le marché :

- 3 biosimilaires de l'adalimumab
- 3 biosimilaires de l'infliximab
- 2 biosimilaires du rituximab
- 2 biosimilaires de trastuzumab
- 1 biosimilaire de bevacizumab

En plus de ces molécules, 17 autres biosimilaires sont en cours d'approbation par la FDA et/ou l'EMA.

Pour contrer l'effet de mode du biosimilaire, les industries cherchent de nouvelles cibles pour les mAbs mais optimisent également les bio-manufactures : bio-processing continu, développement de nouvelles techniques de « drug discovery », screening à haut débit, sélection de clones uniques pour la culture en bioréacteurs plus petits. Les industries biopharmaceutiques cherchent également de nouvelles cibles thérapeutiques comme l'obésité, le diabète, Alzheimer, l'intolérance au gluten, les infections bactériennes ou encore les maladies de peau [37].

7. Développement des conjugués d'anticorps

La pression exercée par la concurrence et le marché des mAbs incite les entreprises biopharmaceutiques à développer des mAbs toujours plus efficaces. Après une amélioration

considérable de la qualité de production des mAbs, les recherches se sont concentrées sur l'aspect ciblage et cytotoxicité. Les glycoprotéines telles que les mAbs ont été redessinées afin d'accroître leur pouvoir cytotoxique de manière plus sélective que les mAbs des générations précédentes ainsi que des molécules employées en chimiothérapie. La stratégie la plus encourageante en tenant compte du potentiel et de la faisabilité s'est révélée être la conjugaison de petites molécules sur le mAb à l'aide d'un bras espaceur. Différents profils de conjugaison ont donc été expérimentés afin de cibler plus spécifiquement les cellules cibles tout en épargnant les cellules saines dès les années 1980.

Les anticorps monoclonaux et les biosimilaires sont apparus comme prometteurs pour lutter contre une grande variété de maladies. Cependant, malgré les efforts d'amélioration des traitements en vue de limiter les effets néfastes pour le patient (immunogénicité, efficacité variable, nécessité de dose élevée), certaines limitations restent présentes. Lors des phases d'essais cliniques, les chercheurs se sont rendu compte que les mAbs produits dans les souris étaient rendus inactifs car neutralisés par les systèmes immunitaires des patients. De ce fait, ils ont eu l'idée de délivrer des agents tumoricides très puissants via des injections plus rares [26].

Quatre conjugaisons avec des mAbs ont été imaginées pour cibler spécifiquement des tumeurs malignes :

- Des conjugués mAb – cytotoxine
- Des conjugués mAb – radionucléide
- Des conjugués mAb – petite molécule médicamenteuse
- Des conjugués mAb – enzyme

Cette dernière option nommée ADEPT (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy) a été vite abandonnée à cause de la forte immunogénicité provoquée par l'enzyme bactérienne ainsi que la trop faible demi-vie des conjugués.

[7.1. Les conjugués mAbs – cytotoxine \(immunotoxines\)](#)

Les immunotoxines ont été les premiers agents tumoricides (gelonine, ricine, arbrine) développés extraits de plantes ou de bactéries comme des exotoxines de *Pseudomonas* ou encore la toxine diphtérique. Malgré des premiers essais concluants, l'approche a connu un rapide déclin. L'immunogénicité provoquée par les mAbs murins, la demi-vie de circulation sanguine trop courte ainsi que la toxicité systémique induite et la faible pénétration au sein de la tumeur ont nui à leur utilisation courante [38].

Une seconde génération de ce type de conjugué sera développée grâce à l'utilisation de techniques recombinantes où l'on insère des séquences d'ADN correspondant au site de complémentarité anticorps-antigène aux séquences codant pour les toxines. Les molécules obtenues sont plus petites et plus homogènes mais l'immunogénicité est toujours présente et limite les doses d'injection de l'ordre de 0,05 mg/kg/semaine, ce qui est entre 40 et 200 fois inférieur aux doses de mAbs actuellement administrées.

7.2. Les conjugués mAb – radionucléide

Le principe de cette radiothérapie est de délivrer à la tumeur une quantité suffisante de radiation pour l'éradiquer tout en épargnant les cellules saines alentours.

Les bénéfices potentiels de la radio-immunothérapie étaient de délivrer plus précisément les radiations aux sites métastatiques, et affecter les tumeurs qui expriment des gènes de manière hétérogène.

Deux mAbs conjugués ^{131}I -tositunomab et ^{90}Y -irbitumomab ont été commercialisés. Ils ont eu un taux de réponse de 50 à 85 % pour la plupart des lymphomes. Cependant, les tumeurs solides sont peu radiosensibles et la dose de radiation délivrée par ces conjugués (1 à 20 Gy) était insuffisante pour éradiquer les tumeurs. Des études ont montré que l'éradication d'une tumeur est rendue possible par une dose de radiation d'un minimum de 60 Gy [39]. Par conséquent, cette technique de conjugués a été mise de côté due à son manque d'efficacité sur la plupart des maladies non radiosensibles.

7.3. Les conjugués mAb – petite molécule médicamenteuse (cytotoxine)

Ce type de conjugué a été étudié pour associer une petite molécule médicamenteuse (drug) à un mAb possédant une très forte spécificité envers un antigène exprimé par une cellule cancéreuse afin d'augmenter l'indice thérapeutique. Cette conjugaison est rendue possible par un bras espaceur appelé « linker » (*Figure 1.7*) [40].

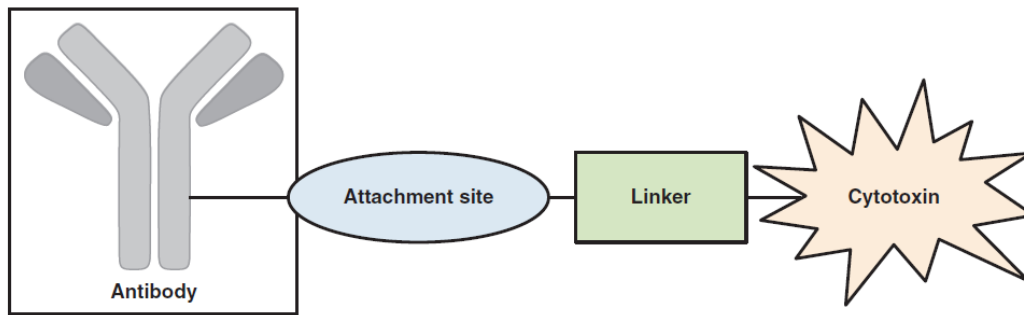


Figure 1.7 : Représentation schématique de la structure d'un ADC. Extrait de [40].

Les premiers « Antibody-Drug Conjugates » (ADCs) produits étaient composés de mAbs murins spécifiques aux antigènes tumoraux liés à une cytotoxine anticancéreuse comme la doxorubicine, la vinblastine ou encore le méthotrexate. Cependant, les essais cliniques ont démontré un manque de puissance, une immunogénicité ainsi qu'un manque de sélectivité entre les cellules cancéreuses et les cellules saines.

Une seconde génération d'ADCs a été développée en remplaçant les mAbs murins par des mAbs humanisés ou humains pour supprimer l'immunogénicité. La puissance des cytotoxines a été optimisée pour être multipliée par un facteur 100 à 1000 et la sélectivité a été largement améliorée afin de cibler uniquement les cellules cancéreuses [38].

Le gemtuzumab ozogamicin (Figure 1.8) a été le premier ADC approuvé par la FDA en 2000 comme médicament contre la leucémie myélogène. Il s'agissait d'un mAb conjugué à de la calichéamycine dirigé contre les CD33 et développé par l'entreprise pharmaceutique Wyeth. Il fut retiré du marché dix ans plus tard à la suite d'études post-approbation qui n'ont montré aucune amélioration du taux de survie en plus d'une forte toxicité de la molécule couplée à la chimiothérapie comparée à la chimiothérapie seule [41].

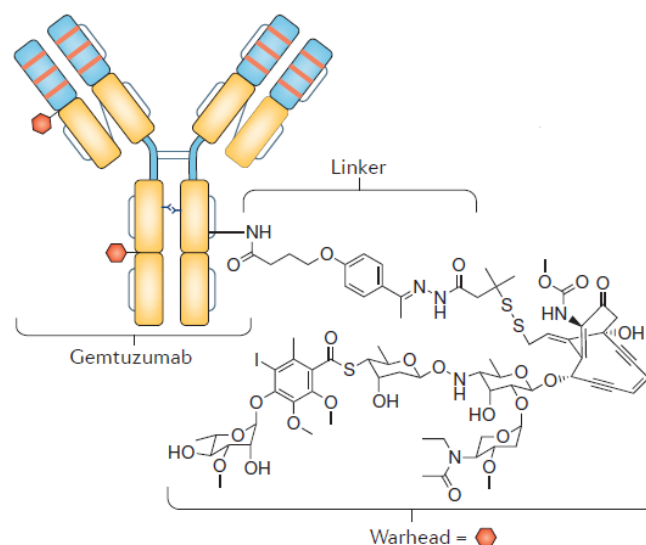
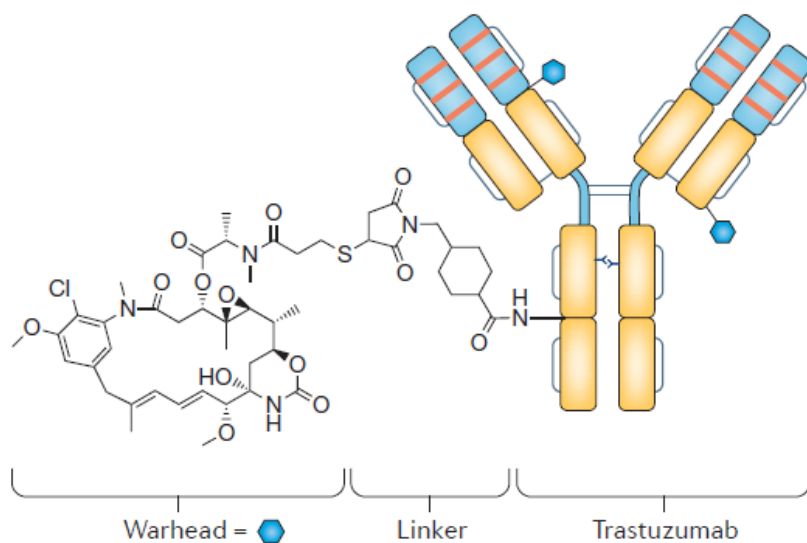


Figure 1.8 : Représentation schématique du gemtuzumab ozogamicin. Issu de [42].

À la suite de cela, 4 ADCs ont été approuvés par la FDA et l'EMA :

- L'ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) en 2013 dirigé contre les récepteurs HER2 composé d'un linker SMCC et d'un agent antimétabolite [42] (*Figure 1.9 a*)
- Le brentuximab vedotin (SGN-35) en 2011 dirigé contre les CD30, composé d'un groupement MMAE et d'une protéase cAC10 (*Figure 1.9 b*)
- Le polatuzumab vedotin (RG7596) en 2019 dirigé contre les CD79b, composé d'un linker valine-citrulline et d'un groupement MMAE
- L'inothuzumab ozogamicin en 2017 dirigé contre les CD22, composé d'un groupement calichéamycine

a)



b)

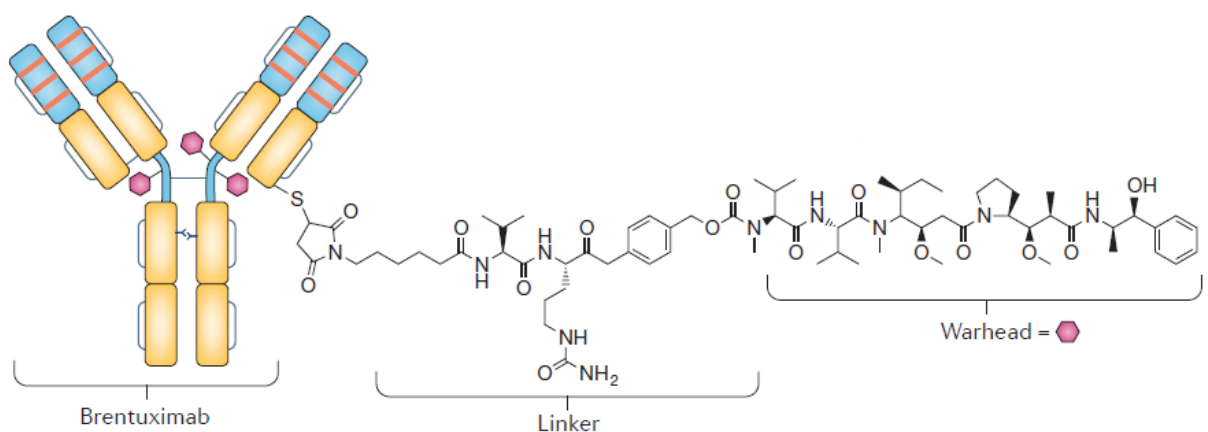


Figure 1.9 : Représentation schématique de l'ado-trastuzumab emtansine (a) et du brentuximab vedotin (b). Issu de [42].

Les ADCs apparaissent comme l'une des catégories de médicaments les plus prometteuses et continuent d'être développés à différents niveaux pour offrir des traitements toujours plus efficaces. Les trois principaux axes d'optimisation des ADCs sont les bras espaceurs, les molécules cytotoxiques et la sélection de l'antigène cible.

7.3.1. Optimisation des bras espaceurs « linkers »

Le linker joue un rôle capital dans la formulation de l'ADC et l'étude des propriétés physico-chimiques de ces intermédiaires a mis en évidence des critères importants de sélection. Le linker doit avoir une stabilité suffisante pour conserver la cytotoxine lors de la circulation de l'ADC dans le sang mais doit être capable de la larguer une fois la cellule cancéreuse atteinte. La taille du bras espaceur a été identifiée comme un paramètre majeur dans la sélection du linker. Il doit être suffisamment long afin d'avoir un encombrement stérique minimum pour assurer la stabilité mais il doit être suffisamment court pour éviter un largage prématuré de la cytotoxine (*Figure 1.10*). L'acide aminé du squelette protéique du mAb est déterminant dans la liaison afin d'assurer la conformation tridimensionnelle de l'ADC. Généralement, les sites de fixations sont des résidus basiques de type lysine ou arginine. Cependant, certains ADCs possèdent également des résidus cystéines modifiés, et les fixations peuvent induire une différence de conformation car elles peuvent modifier les ponts disulfures et donc perdre une partie du mAb, notamment la chaîne légère (LC) [43, 44].

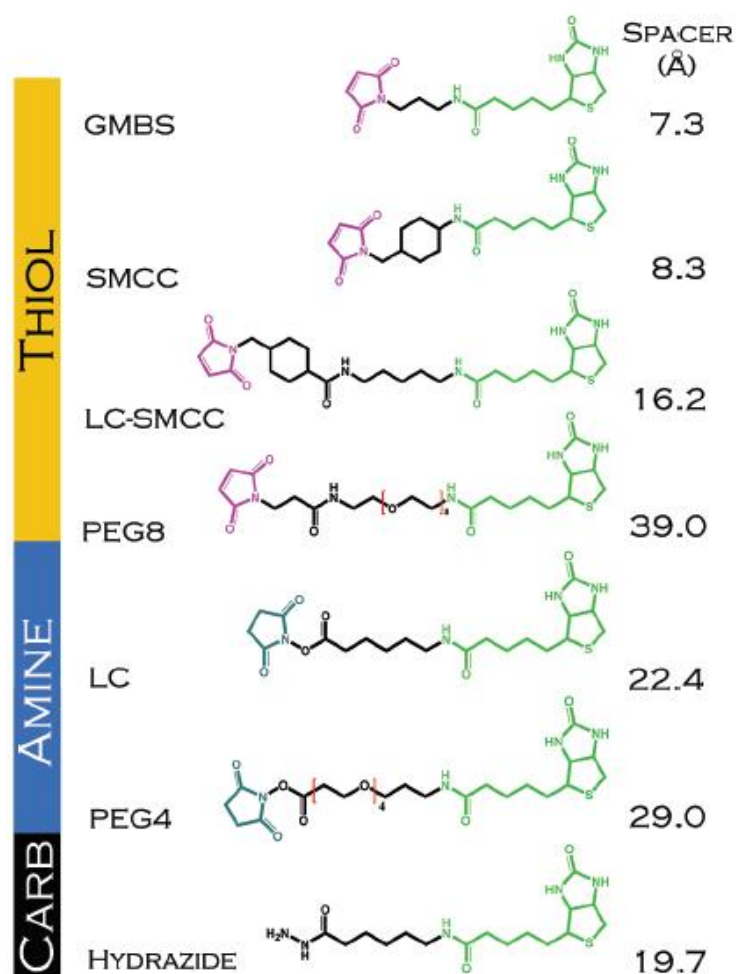


Figure 1.10 : Représentation structurale des linkers utilisés dans la conjugaison de biotine à un anticorps monoclonal. Les linkers peuvent être composés de N-hydroxysuccinimide (bleu), d'un bras espaceur (noir), de maléimide (violet), et de biotine (vert). Extrait de [44].

7.3.2. Optimisation des molécules cytotoxiques

Les molécules cytotoxiques associées aux mAbs ont été sujettes à des développements continus pour améliorer l'efficacité tumoricide tout en limitant la quantité administrée au patient. Pour les 2/3 des ADCs en essais cliniques, ces cytotoxines sont des molécules antimétaboliques : l'auristatine ou la maitansine. Les autres molécules cytotoxiques généralement retrouvées sont les tubulysines, des calichéamicines, des duocarmicines, des benzodiazépines... (Figure 1.11).

Des critères de conformité de ces molécules ont été répertoriés tels que la puissance cytotoxique, l'hydrophobicité relative ou encore le groupement permettant la liaison entre la cytotoxine et le bras espaceur. Il reste compliqué d'arranger tous ces paramètres simultanément, d'où l'échec de nombreux mAbs liés au méthotrexate, à la doxorubicine ou aux vinca-alcaloïdes [41].

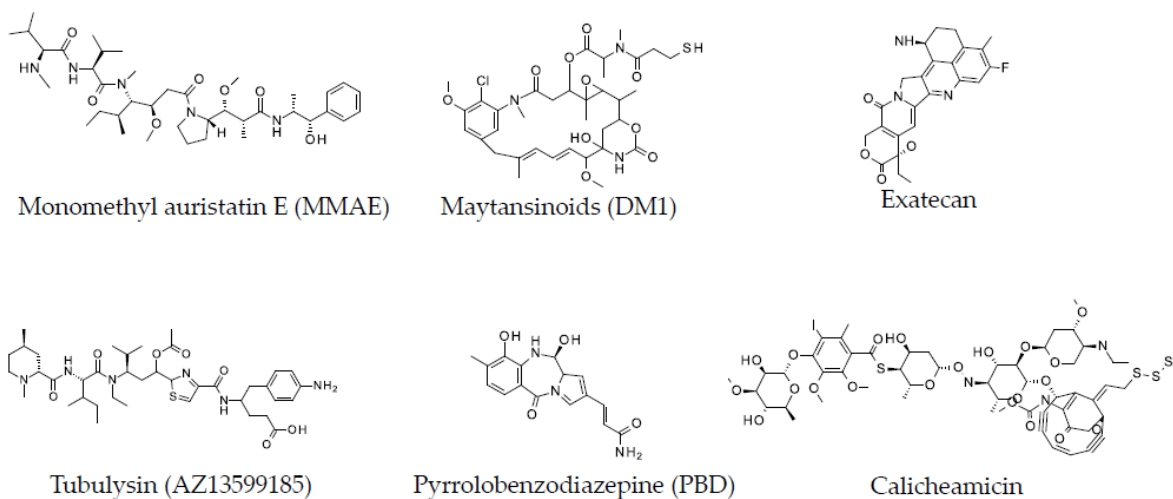


Figure 1.11: Représentations structurales des drugs majoritairement utilisées comme agents cytotoxiques. Extrait de [45].

7.3.3. Sélection de l'antigène cible

La sélection de l'antigène cible est capitale dans le développement des ADCs. En effet, il faut identifier l'antigène adéquat afin d'optimiser la sélectivité et la spécificité des cellules visées par l'ADC. L'antigène doit être très exprimé dans une cellule cancéreuse et peu exprimé dans une cellule saine. L'influence du micro-environnement tumoral est également à prendre en compte pour la reconnaissance anticorps-antigène.

La cible doit être présente à la surface de la cellule afin d'être en contact direct avec les mAbs circulants. Une fois le mAb lié à l'antigène cible, l'antigène doit être internalisé afin que l'ADC et surtout la toxine soit également internalisée via un lysosome pour agir directement à l'intérieur de la cellule tumorale. La toxine doit finalement être déposée au plus proche du noyau. L'efficacité finale du traitement est dépendante du taux de réussite de chacune de ces étapes. En considérant une efficacité de 50% à chacune des 6 étapes, seulement 1,56 % (0.50^6) de la dose administrée atteindra la cible (Figure 1.12).

En plus de la composition intrinsèque de l'ADC, d'autres conditions sont importantes pour le développement de ce type de molécules. Il faut pouvoir réduire la résistance du système immunitaire aux ADCs, augmenter le passage de la barrière tumorale, et dans l'idéal, combiner les ADC à des mAbs déjà produits par les patients.

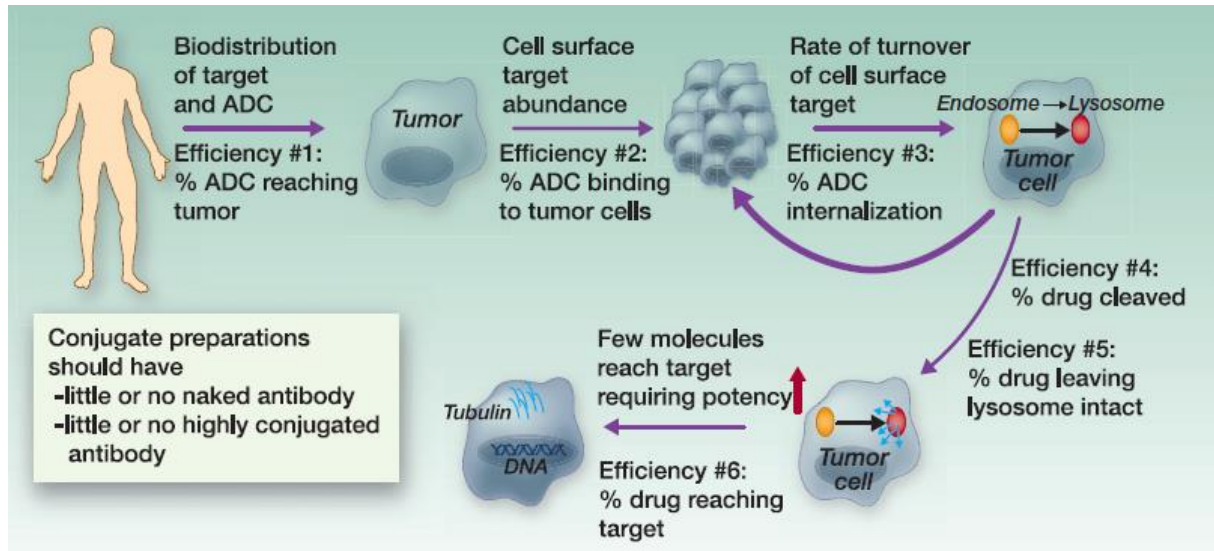


Figure 1.12 : Représentation schématique des différentes étapes de l'administration de l'ADC jusqu'à la libération de l'agent cytotoxique dans les cellules cancéreuses. Extrait de [38].

Avantages des ADCs	Inconvénients des ADCs
<ul style="list-style-type: none"> • Liaison spécifique à un antigène cible • Agents tumoraux délivrés de manière sélective • Large indice thérapeutique • Stabilité de l'ADC lors de la circulation • Demi-vie supérieure au mAb seul 	<ul style="list-style-type: none"> • Tests préalables pour identifier la cible • Possible expression de la cible dans les tissus sains • Possible relargage prématuré de la drug • Concentration insuffisante une fois la cible atteinte • Expression des antigènes cibles hétérogène

Tableau 1.5 : Avantages et inconvénients des ADCs.

En prenant en compte toutes les considérations, il devient alors possible d'établir une liste de propriétés d'un ADC optimal ([Tableau 1.5](#)).

- Au niveau du mAb, la reconnaissance de la cible ne doit pas être altérée selon le port ou non d'une cytotoxine
- Le linker doit être stable dans le plasma afin d'éviter tout relargage prématuré de la toxine. Il doit être labile une fois internalisé pour larguer la toxine sous sa forme active auprès de la cible
- La toxine doit avoir une puissance importante et un mécanisme d'action validé (inhibition de microtubules, endommager l'ADN...)
- L'antigène cible doit être exprimée de manière abondante et spécifique et pouvoir être internalisée entièrement

Des investigations sont en cours pour tenter de conjuguer d'autres molécules alternatives telles que des protéines, des peptides, des nanobodies ou encore des fragments variables d'une seule chaîne, des probodies... [41]. D'autre part, l'ingénierie des protéines se développant, des anticorps avec deux F(ab) différents ont pu voir le jour : ce sont les anticorps bispécifiques ([Figure 1.13](#)). Ces anticorps recombinants peuvent se lier à deux épitopes différents, amplifiant les possibilités de fixation sur les cellules cibles. Leur production est plus complexe, puisque ces anticorps hybrides n'existent pas à l'état naturel [46, 47].

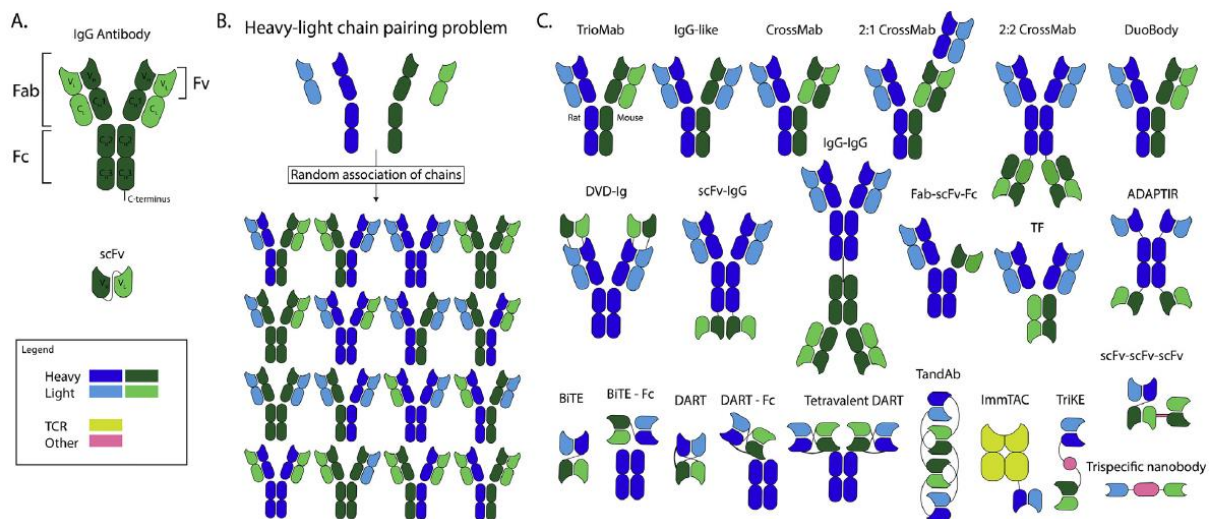


Figure 1.13 : Représentation schématique de la structure d'un mAb et des constructions d'anticorps bispécifiques. (A) représente les fractions constituant une IgG classique. (B) représente l'ensemble des combinaisons possibles d'appariement des chaînes lourdes et légères afin de construire un anticorps bispécifique. (C) représente les structures d'anticorps bispécifiques actuellement approuvées ou en phase d'essais cliniques.

La découverte constante de nouvelles cibles thérapeutiques combinée au développement exponentiel de molécules candidates ont conduit à créer un nouveau marché de molécules biothérapeutiques. L'optimisation de cette classe émergente de médicaments a incité les entreprises biopharmaceutiques à multiplier leurs efforts pour offrir des traitements abordables et ainsi s'imposer sur ce marché en plein essor.

8. Le développement des mAbs et leur marché

L'évolution des techniques de fabrication de mAbs a permis d'obtenir des molécules plus efficaces, moins coûteuses et moins dangereuses pour les patients. Le marché de ces molécules a connu une forte augmentation depuis les premiers mAbs humains commercialisés et ne cesse de s'étendre grâce au nombre de mAbs, biosimilaires, bio-supérieurs, anticorps bispécifiques et ADCs développés.

En 2002, l'adalimumab a été le premier mAb humain à être autorisé à la commercialisation par la FDA. Ce premier traitement à base de mAb humain a mené très rapidement à la commercialisation d'une série d'autres anticorps tels que le panitumumab, le golimumab, le canakinumab, l'ustekinumab, l'ofatumumab et le denosumab [12].

Cinq ans plus tard, 22 mAbs étaient commercialisés aux USA et presque la moitié était dans le top 20 des ventes de médicaments issus de biotechnologies thérapeutiques. 8 de ces produits avaient chacun un chiffre d'affaire supérieur à 1 milliard de dollar US [48]. Ces traitements étaient répartis de manière suivante :

- 3 dirigés contre des cancers : trastuzumab, bevacizumab et cetuximab
- 2 dirigés contre des maladies auto-immunes : infliximab et adalimumab
- 1 dirigé contre des cancers ou des maladies auto-immunes : rituximab
- 1 dirigé contre la DMLA : ranibizumab
- 1 dirigé contre le virus respiratoire chez l'enfant : palivizumab

Generic Name	Trade Name	Structure	Target	Approval (Year)	Sales	% Top 20
First Tier				(U.S. \$B)		
infliximab	Remicade®	Ch	TNF	4.6	5	9.84
rituximab	Rituxan®,	Ch	CD20	5.1	4.9	9.62
trastuzumab	Herceptin®	Hm	HER2	7.5	4.3	8.45
bevacizumab	Avastin®	Hm	VEGF	7.1	3.6	7.15
adalimumab	Humira®	Hu	TNF	3.7	3.1	6.04
cetuximab	Erbix®	Ch	EGFR	9.7	1.4	2.73
ranibizumab	Lucentis®	Hm	VEGF	6.8	1.2	2.39
palivizumab	Synagis®	Hm	RSV	3.6	1.1	2.25
Second Tier				(U.S. \$M)		
tositumomab	Bexxar®	Mu	CD20	13.7	10.3	0.02
alemtuzumab	Campath®	Hm	CD52	10.4	108	0.21
certolizumab pegol	Cimzia®	Hm	TNF	n/a	n/a	n/a
gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg®	Hm	CD33	6.5	60	0.12
muromonab-CD3	Orthoclone Okt3®	Mu	CD3	n/a	150	0.3
efalizumab	Raptçiva®	Hm	CD11a	10	163	0.32
abciximab	ReoPro®	Ch	GP IIB/IIIa	n/a	380	0.75
basiliximab	Simulect®	Ch	CD25	n/a	300	0.59
eculizumab	Soliris®	Hm	C5	n/a	230	0.45
natalizumab	Tysabri®	Hm	a-4 integrin	10.6	100	0.2
panitumumab	Vectibix®	Hu	EGFR	7.4	365	0.72
omalizumab	Xolair®	Hm	IgE	9.7	472	0.93
daclizumab	Zenapax®	Hm	CD25	n/a	60	0.12
ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	Mu	CD20	10.2	17	0.03

Tableau 1.6 : Liste des mAbs approuvés par la FDA pour la mise sur le marché en 2009. Abbreviations: Structure: Ch, chimeric; Hm, humanized; Hu, human; Mu, murine. Sources: 20 Compounds that defined biotech, Signals online magazine at www.signalsmag.com; ReCap database; Biopharmaceutical Products in the U.S. and European markets 6th edition, Ronald A. Rader, ed; Pharma Sales and BioPharmInsights databases; Reichert JM, Ph. D.; personal communications. Development times and sales estimates for some Second Tier mAbs are based on limited information. Extracted from [48].

Le développement de ces mAbs a été de 6 ans en moyenne, ce qui représente un temps relativement court pour la conception d'un médicament (*Tableau 1.6*). La *Figure 1.14* représente la répartition des catégories thérapeutiques des mAbs en 2015.

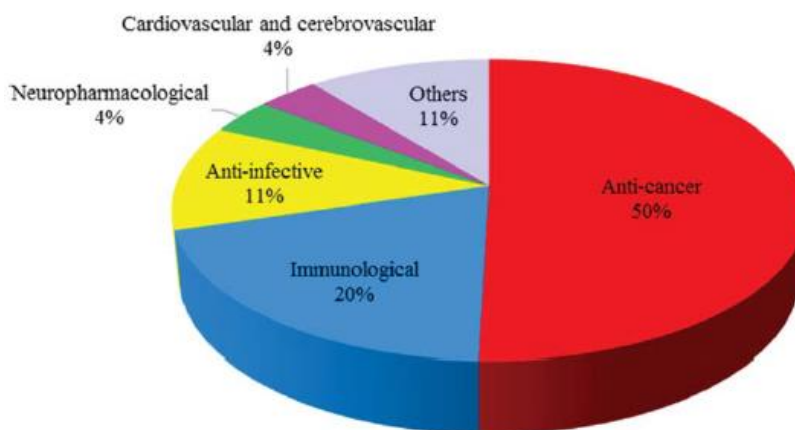


Figure 1.14 : Répartition des catégories thérapeutiques des mAbs. La catégorie « others » prend en compte les maladies des yeux, les maladies respiratoires, les maladies métaboliques... Extrait de [49].

En 2008, les ventes des traitements à base de mAbs avoisinaient les 39 milliards \$ et ont atteint les 75 milliards \$ en 2013 (soit une hausse de 90 % en 5 ans) ce qui représentait environ la moitié des ventes totales de produits pharmaceutiques. Durant la même période, les molécules thérapeutiques à base de protéines recombinantes ont augmenté de 26 %.

Le nombre de mAbs et de dérivés (ADCs, protéines recombinantes...) sur le marché ne cesse de croître (*Figure 1.15*). De plus, la caractérisation de plus en plus précise ainsi qu'une meilleure connaissance du fonctionnement de ces molécules explique une diminution des mAbs retirés du marché et donc l'offre croissante de ce type de médicaments.

En 2014, 47 mAbs étaient approuvés par la FDA et/ou l'EMA dont 18 dépassaient le milliard \$ et 6 la barre des 6 milliards \$. Le record des ventes est détenu par l'adalimumab avec des ventes de près de 11 milliards \$.

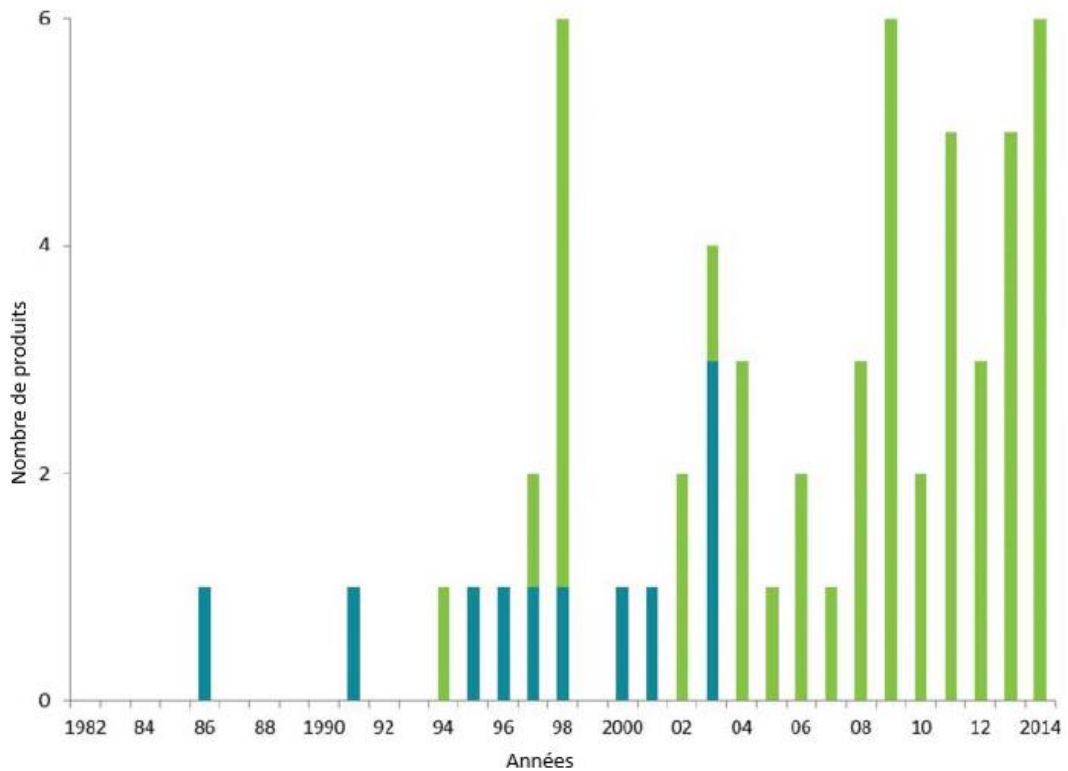


Figure 1.15 : Nombre de mAbs et dérivés de mAbs autorisés à la mise sur le marché entre 1982 et 2014. Les produits acceptés puis retirés du marché par la suite sont représentés en bleu. Les mAbs encore disponibles sur le marché sont en vert. Extrait de [50].

Comme l'illustre la Figure 1.16, la production ainsi que la vente des molécules apparentées aux anticorps monoclonaux ont augmenté quel que soit le type et le mode de production de ces molécules.

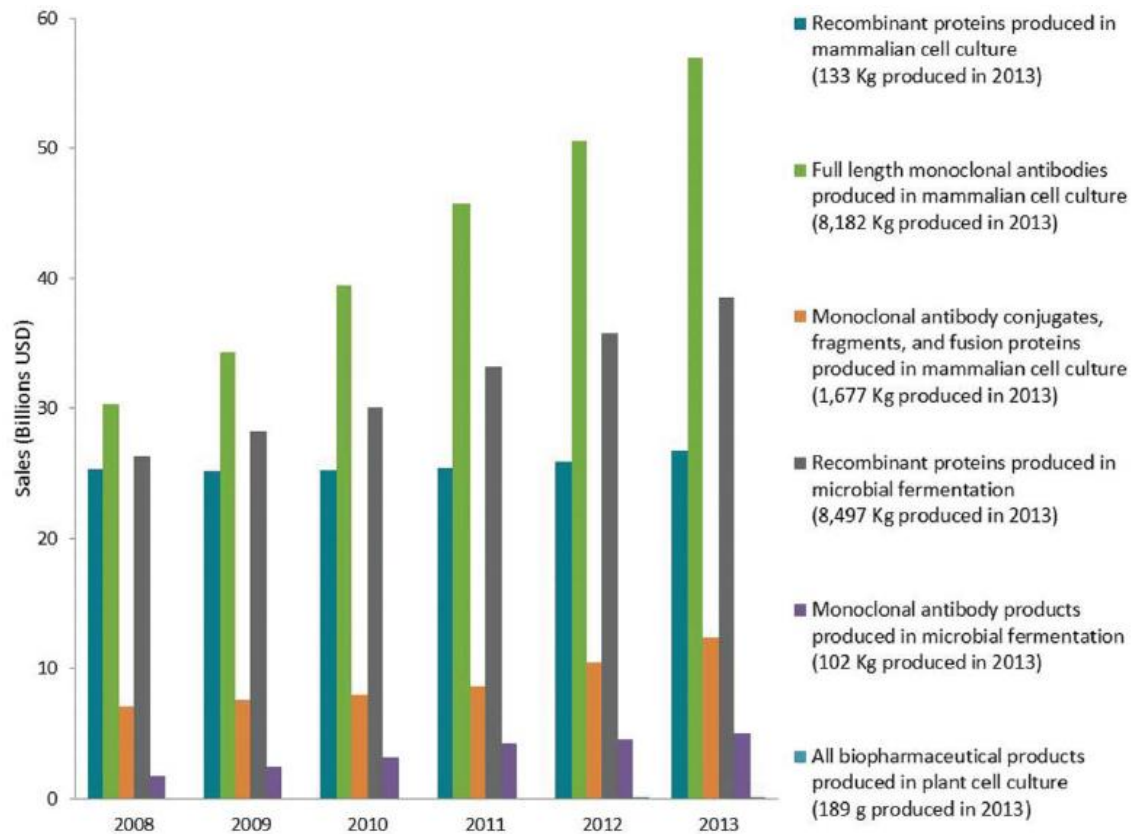


Figure 1.16 : Histogramme représentant les ventes de produits biopharmaceutiques par type. Issu de [50].

La comparaison des ventes des 6 anticorps issus de mAbs avec celles des 2 meilleures molécules biopharmaceutiques de type protéine recombinante montre clairement l'explosion du marché de ces nouvelles molécules thérapeutiques, traduisant également le nombre de maladies et de patients traités avec cette nouvelle classe de biomolécules (Figure 1.17).

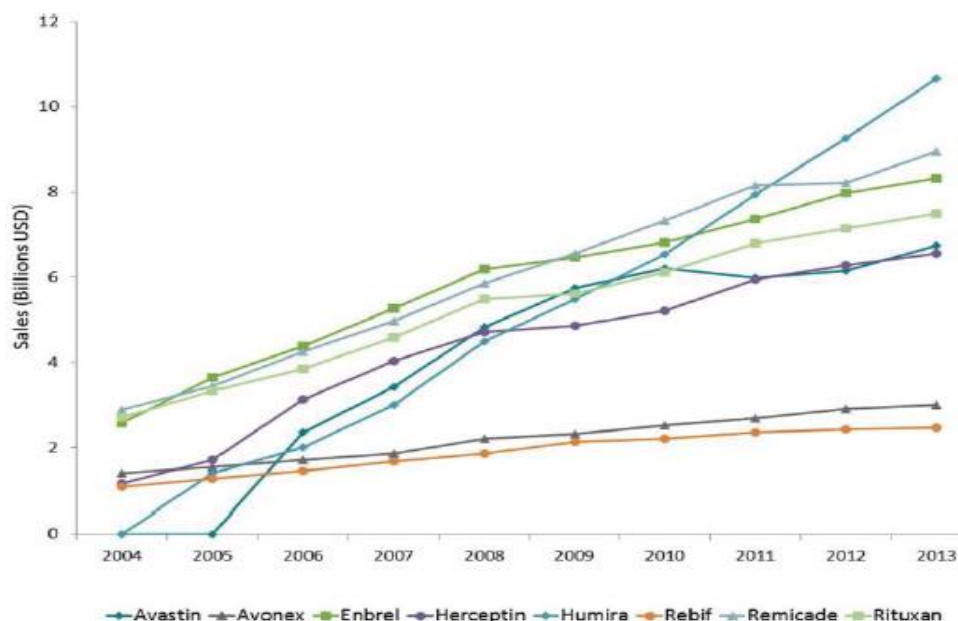


Figure 1.17 : Représentation des 6 meilleures ventes de mAbs et des 2 meilleures ventes de protéines recombinantes qui ne sont pas des mAbs. Extrait de [50]

A raison d’une évolution moyenne de 4 mAbs autorisés à la mise sur le marché par an, les attentes sont de 70 mAbs en 2020 pour un marché de 125 milliards \$. Les projets de recherche et développement sont distribués de manière homogène et sont en constante augmentation. Le marché des mAbs continue d’attirer les industries biopharmaceutiques comme l’illustre la Figure 1.18. La majorité des projets concerne des traitements anti-cancer (environ 50 %) suivi des traitements immunologiques (20 %).

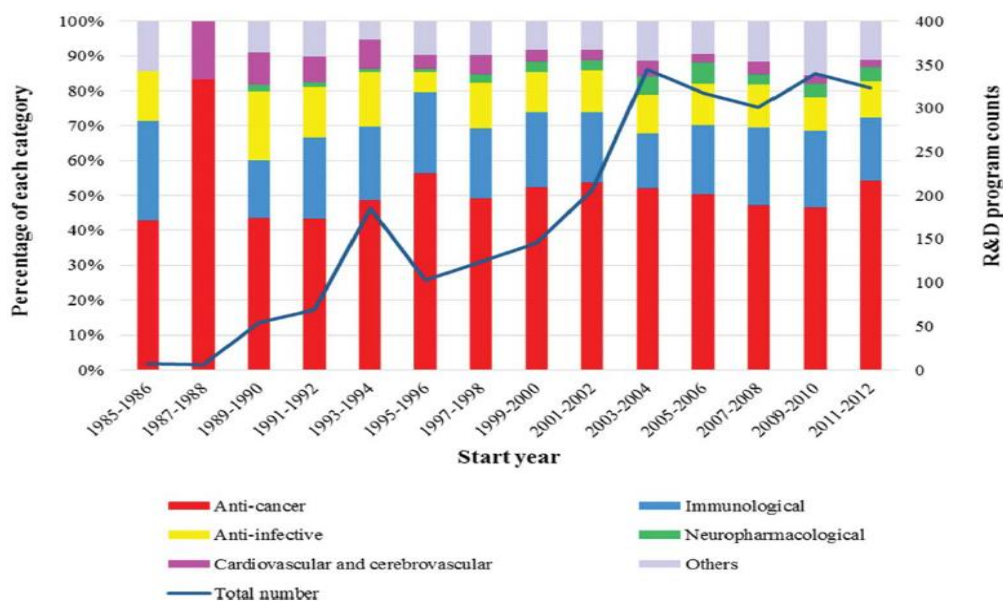


Figure 1.18 : Histogramme représentant les fonds investis pour la R&D de mAbs par an ainsi que les types de cibles thérapeutiques ciblées. Extrait de [49]

9. Conclusion

La découverte du potentiel des anticorps monoclonaux a révolutionné les traitements contre un large éventail de maladies en passant par les cancers, les maladies auto-immunes ou encore pour éviter les rejets de greffe. Depuis la découverte des molécules actives du système immunitaire, un développement considérable a été réalisé afin d'offrir des solutions alternatives à la chimiothérapie.

Malgré la forte immunogénicité induite par la première génération de mAbs, les premiers tests ont montré des résultats très encourageants en termes d'efficacité, de temps de réactivité ainsi que de cibles thérapeutiques. L'étude des pathologies a permis de mieux comprendre leur système d'action et ainsi déterminer des cibles exprimées uniquement en cas de maladie ou par des cellules tumorales. La stratégie employée par l'utilisation de biomolécules a été de traiter les maladies le plus tôt possible en amplifiant la réaction du système immunitaire vis-à-vis des cibles propres aux maladies.

La seconde génération de mAb a été confectionnée en modifiant les premiers mAbs murins pour les rendre moins alarmants pour le système immunitaire. Les travaux en génie génétique ont ouvert la voie à des molécules de plus en plus humanisées jusqu'à devenir humaines ainsi qu'à divers mode de production à grande échelle de ces biomolécules.

Les produits biopharmaceutiques sont des biomolécules (peptides, protéines) utilisées à des fins thérapeutiques. A ce jour, ces produits biopharmaceutiques incluent des biomolécules telles que des hormones, des facteurs de croissance, des interférons, des vaccins, ou encore des anticorps monoclonaux (mAbs) et leurs dérivés comme les protéines de fusion ou les *antibody-drug conjugates* (ADCs). Cette catégorie de produits thérapeutiques a émergé très rapidement et s'est imposée à la tête du marché des molécules pharmaceutiques grâce à plusieurs blockbusters. Ils sont principalement produits en utilisant les technologies d'ADN recombinant, qui permettent la production de protéines à grande échelle tout en minimisant la variabilité du produit. Les mAbs ont évolué de l'état de protéine 100 % murine à chimérique (30 % murine – 70 % humaine) puis humanisée (10 % murine – 90 % humaine) pour terminer par la production de mAb 100 % humains. Ces mAbs sont cultivés *in vitro* par des cellules murines (NSO ou SP/2) ou apparentées comme les souches CHO (Chinese Hamster Ovarian cells),

La tactique de rendre les mAbs le plus humains possible s'est avérée efficace puisque les systèmes immunitaires des patients ne considèrent plus les traitements comme étant du « non-soi » et autorise leur circulation dans le système sanguin du patient, sans les dégrader. Le développement de ces mAbs et dérivés tels que les ADCs ou encore les protéines de fusion a propulsé cette nouvelle classe de biomolécules thérapeutiques parmi les molécules les plus rentables du marché

biopharmaceutique. En effet, en 10 ans, les mAbs et dérivés se sont imposées comme molécules majeures sur le marché avec des ventes excédant plusieurs milliards de dollar US par an.

Compte tenu de l'identification continue de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que de l'extension des molécules candidates aux essais cliniques telles que les mAbs, protéines de fusion ou encore biosimilaires, les spécialistes planifient une croissance continue du marché de ces biomolécules au moins jusqu'en 2050.

Cette expansion de marché et de molécules candidates impose une amélioration des techniques de chimie analytiques afin de caractériser de manière très précise et à haut débit les biomolécules les plus prometteuses pour le traitement des diverses pathologies et éviter les erreurs de commercialisations de molécules adjugés trop tardivement comme néfastes. De plus, les techniques analytiques pourront également permettre d'orienter les synthèses de ces biomolécules afin d'avoir des produits biopharmaceutiques possédant une efficacité, une pharmacocinétique et une pharmacodynamique optimales.

10. Références bibliographiques

1. Nunes-Alves, C., "Blood is a very unusual fluid". *Nature Immunology*, 2016. **17**(S1): p. S5-S5.
2. Ehrlich, P., *Experimentelle untersuchungen immunitaet ricin*. Deutsche Medicinische Wochenschrift, 1891. **32**(1): p. 976-979.
3. Jerne, N.K., *Toward a network theory of the immune system*. *Annales d'Immunologie*, 1974. **125 C**.
4. Burnet, F.M., *A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection (Reprinted from Australian Journal of Science, vol 20, 1957)*. *Cancer Journal for Clinicians*, 1976. **26**(2): p. 119-121.
5. Reinherz, E.L. and S.F. Schlossman, *Regulation of the Immune Response — Inducer and Suppressor T-Lymphocyte Subsets in Human Beings*. *New England Journal of Medicine*, 1980. **303**(7): p. 370-373.
6. Hoffman, R.A., et al., *Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980. **77**(8): p. 4914-4917.
7. Cosimi, B., et al., *Use of mAbs to T cell subsets for immunologic monitoring*. *The New England Journal of Medicine*, 1981. **1**(1): p. 308-314.
8. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(1): p. 495-497.
9. Kung, P., et al., *Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens*. *Science*, 1979. **206**(4416): p. 347.
10. Morrison, S.L., et al., *Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984. **81**(21): p. 6851.
11. Boulianne, G.L., N. Hozumi, and M.J. Shulman, *Production of functional chimaeric mouse/human antibody*. *Nature*, 1984. **312**(5995): p. 643-646.

12. Nelson, A.L., E. Dhimolea, and J.M. Reichert, *Development trends for human monoclonal antibody therapeutics*. Nature Reviews Drug Discovery, 2010. **9**: p. 767.
13. McCafferty, J., et al., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. Nature, 1990. **348**(6301): p. 552-554.
14. Barbas, C.F., et al., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(18): p. 7978.
15. Clementi, N., et al., *Phage Display-based Strategies for Cloning and Optimization of Monoclonal Antibodies Directed against Human Pathogens*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**(7).
16. Hoogenboom, H.R., et al., *Antibody phage display technology and its applications*. Immunotechnology, 1998. **4**(1): p. 1-20.
17. Lonberg, N., *Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms*. Current Opinion in Immunology, 2008. **20**(4): p. 450-459.
18. Beck, A., S. Sanglier-Cianféroni, and A. Van Dorsselaer, *Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(11): p. 4637-4646.
19. Kornfeld, R. and S. Kornfeld, *Comparative Aspects of Glycoprotein Structure*. Annual Review of Biochemistry, 1976. **45**(1): p. 217-238.
20. Liu, L., *Antibody Glycosylation and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **104**(6): p. 1866-1884.
21. Yamane-Ohnuki, N. and M. Satoh, *Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation*. mAbs, 2009. **1**(3): p. 230-236.
22. Little, M., et al., *Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies*. Immunology Today, 2000. **21**(8): p. 364-370.
23. Neuberger, M.S., et al., *A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function*. Nature, 1985. **314**(6008): p. 268-270.
24. DeLand, F.H., et al., *Preliminary findings in the evaluation of hepatic malignancies by radioimmunodetection, X-ray computed tomography, and magnetic resonance imaging*. European Journal of Nuclear Medicine, 1986. **12**(9): p. 429-435.
25. Liu, A.Y., et al., *Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(10): p. 3439.
26. Levy, R. and R.A. Miller, *Biological and Clinical Implications of Lymphocyte Hybridomas: Tumor Therapy with Monoclonal Antibodies*. Annual Review of Medicine, 1983. **34**(1): p. 107-116.
27. Adair, J.R., *Engineering Antibodies for Therapy*. Immunological Reviews, 1992. **130**(1): p. 5-40.
28. Green, L.L., *Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies*. Journal of Immunological Methods, 1999. **231**(1-2): p. 11-23.
29. Williamson, R.A., et al., *Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(9): p. 4141.
30. Shaw, D.R., et al., *Characterization of a mouse/human chimeric monoclonal antibody (17-1A) to a colon cancer tumor-associated antigen*. The Journal of Immunology, 1987. **138**(12): p. 4534.
31. Lutz, H.U., et al., *Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(21): p. 7368.
32. Harding, F.A., et al., *The immunogenicity of humanized and fully human antibodies*. mAbs, 2010. **2**(3): p. 256-265.
33. Kipriyanov, S.M. and M. Little, *Generation of recombinant antibodies*. Molecular Biotechnology, 1999. **12**(2): p. 173.

34. Beck, A., *Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies*. mAbs, 2011. **3**(2): p. 107-110.
35. Sandeep, V., Parveen, J., Chauhan, P., *Biobetters; the better biologics and their regulatory overview*. International Journal of Drug Regulatory Affairs, 2016. **4**(1): p. 13-20.
36. Beck, A. and J.M. Reichert, *Approval of the first biosimilar antibodies in Europe A major landmark for the biopharmaceutical industry*. Mabs, 2013. **5**(5): p. 621-623.
37. Grilo, A.L. and A. Mantalaris, *The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market*. Trends in Biotechnology, 2019. **37**(1): p. 9-16.
38. Teicher, B.A. and R.V.J. Chari, *Antibody Conjugate Therapeutics: Challenges and Potential*. Clinical Cancer Research, 2011. **17**(20): p. 6389.
39. Vaughan, A.T.M., et al., *Limitations to the killing of tumours using radiolabelled antibodies*. The British Journal of Radiology, 1987. **60**(714): p. 567-572.
40. Perez, H.L., et al., *Antibody-drug conjugates: current status and future directions*. Drug Discovery Today, 2014. **19**(7): p. 869-881.
41. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates*. Nature Reviews Drug Discovery, 2017. **16**: p. 315.
42. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates*. Nat Rev Drug Discov, 2017.
43. Lambert, J.M. and R.V.J. Chari, *Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): An Antibody–Drug Conjugate (ADC) for HER2-Positive Breast Cancer*. Journal of Medicinal Chemistry, 2014. **57**(16): p. 6949-6964.
44. Acchione, M., et al., *Impact of linker and conjugation chemistry on antigen binding, Fc receptor binding and thermal stability of model antibody-drug conjugates*. mAbs, 2012. **4**(3): p. 362-372.
45. Mou, S., Y. Huang, and A.I. Rosenbaum, *ADME Considerations and Bioanalytical Strategies for Pharmacokinetic Assessments of Antibody-Drug Conjugates*. Antibodies, 2018. **7**(4).
46. Carter, P.J. and G.A. Lazar, *Next generation antibody drugs: pursuit of the ‘high-hanging fruit’*. Nature Reviews Drug Discovery, 2017. **17**: p. 197.
47. Suurs, F.V., et al., *A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges*. Pharmacology & Therapeutics, 2019. **201**: p. 103-119.
48. Scolnik, P.A., *mAbs a business perspective*. mAbs, 2009. **1**(2): p. 179-184.
49. Geng, X., et al., *Research and development of therapeutic mAbs: An analysis based on pipeline projects*. Human vaccines & immunotherapeutics, 2015. **11**(12): p. 2769-2776.
50. Ecker, D.M., S.D. Jones, and H.L. Levine, *The therapeutic monoclonal antibody market*. mAbs, 2015. **7**(1): p. 9-14.

Chapitre II : Méthodes électrophorétiques employées pour caractériser les mAbs

1. Introduction

Aujourd'hui, plus de 75 mAbs et ADCs sont approuvés comme produits thérapeutiques par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) et la Food and Drug Administration (FDA) [1]. Les mAbs occupent le premier rang des ventes de médicaments depuis dix ans [2, 3], ce qui en fait l'une des catégories de produits les plus populaires dans l'industrie pharmaceutique. En outre, l'approbation de 16 nouveaux mAbs au cours des deux dernières années suggère que l'expansion se poursuivra [4]. Les technologies actuelles de production de protéines recombinantes permettent de produire différents types de biomolécules dérivées du format mAbs, comme les conjugués anticorps-médicaments (ADC), les protéines de fusion, les anticorps bispécifiques (bsAbs) ou les biosimilaires [5-7]. Leur développement est actuellement motivé par le traitement de différentes maladies telles que divers cancers, infections ou encore en prévention des rejets de greffe.

En raison de leur nature protéique, ces composés sont des macromolécules très complexes d'une masse moléculaire moyenne d'environ 150 kDa. Toutefois, les mAbs peuvent subir plusieurs dégradations chimiques, modifications post-traductionnelles (PTMs) ou altérations de conformation 3D, qui peuvent entraîner l'inactivation du médicament ou dans certains cas, des réactions immunitaires [8, 9]. Ces modifications augmentent l'hétérogénéité et la complexité de la protéine. La caractérisation et le contrôle de la stabilité des protéines sont donc des aspects cruciaux au cours de chaque phase de développement des mAbs, depuis le début de la conception jusqu'à la production, le stockage et la livraison. Pour l'évaluation des mAbs et des ADCs, les organismes de réglementation ont introduit le concept d'attributs critiques de qualité (CQA) qui décrit pour chaque protéine thérapeutique, les PTMs potentiellement impliquées dans l'altération de la pharmacocinétique (PK) et les propriétés pharmacodynamiques (PD) des protéines [10, 11]. Ainsi, des méthodes d'analyse rigoureuses pour une caractérisation complète des biothérapeutiques sont nécessaires pour assurer la qualité de ce type de produits.

Par conséquent, un large éventail de techniques de séparation en phase liquide, comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou l'électrophorèse capillaire (CE), ont été mises au point pour le contrôle de la qualité des composés biopharmaceutiques [12-15]. Ces méthodes complémentaires permettent de séparer les principales isoformes de mAbs des variantes modifiées afin de fournir une caractérisation détaillée à différents niveaux, définissant la structure de la

protéine. À la fin des années 1980, la CE est apparue comme une technique puissante pour analyser les biomolécules, grâce au phénomène d'électromigration et à la possibilité d'utiliser des tampons aqueux qui préservent la structure des protéines à tous niveaux [16, 17].

Suite à l'introduction de mAbs dans les traitements, la CE s'est donc avérée être une technique de séparation pertinente pour la caractérisation et l'étude de la stabilité de cette catégorie de protéines, en particulier en raison de la sélectivité lors de la séparation électrophorétique [14, 18, 19]. Différents modes électrophorétiques, tels que l'électrophorèse en gel capillaire (CGE), la focalisation isoélectrique capillaire (cIEF) et l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), sont couramment utilisés pour évaluer les mAbs. Les expériences en CE sont généralement effectuées à l'aide d'un détecteur optique comme le détecteur UV ou le détecteur de fluorescence. Toutefois, afin de fournir des informations structurales, l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS) a été largement développée pour surmonter les limites des détections optiques. Nombre de développements de méthodes basés sur la CE-MS réalisés ces dernières années ont permis de caractériser plus précisément les molécules biopharmaceutiques. Différentes stratégies telles que l'analyse intacte, middle-up, middle-down et bottom-up ont été établies pour accéder à la séquence des acides aminés et aux principales PTMs présentes sur les mAbs [20-22]. En outre, la CE-MS a été reconnue comme un outil puissant pour l'étude des glycosylations tant au niveau de leur structure glycanique que de la quantification relative sur les immunoglobulines G (IgG).

En considérant le développement régulier de nouveaux mAbs parallèlement aux protéines thérapeutiques innovantes basées sur ce format, le besoin de développer des méthodologies analytiques plus adaptées reste d'actualité. Grâce aux caractéristiques qui lui sont propres, la CE a continué d'attiser l'intérêt de la communauté scientifique.

Le couplage de techniques électrophorétiques à ces modes de détection a connu un intérêt certain pour les entreprises biopharmaceutiques. Au sein du laboratoire, nous avons jugé intéressant de référencer les techniques employant une séparation électrophorétique pour la caractérisation fine des biomolécules sur la période 2003 – 2016. Ces travaux ont été publiés au début de ma thèse. Au cours de cette dernière, de nouvelles études et optimisations de méthodes ont été réalisées afin d'analyser plus précisément les mAbs et leurs dérivés. Une seconde revue bibliographique a donc été rédigée par notre équipe sur les évolutions des méthodes électrophorétiques pour l'analyse de molécules biopharmaceutiques sur la période 2016 – 2018.

2. Publication : Biopharmaceutical applications of capillary electromigration methods

Rabah Gahoual, Jérémie Giorgetti, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François.

Chapter 19: Biopharmaceutical applications of capillary electromigration methods, Handbooks in Separation Science, Capillary electromigration separation methods, Colin F. Poole, 2018, 453-480.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809375-7.00021-6>

2.1 Abstract

Biopharmaceuticals represent a category of therapeutic products with a remarkable potential and the number of approved products is increasing at a rapid rate. The characterization of biopharmaceutical products remains challenging because of their large size, structural complexity in addition to a propensity to exhibit a wide range of micro-heterogeneities. The properties of CE separation are particularly relevant for the analysis of biomolecules therefore it is quite interesting for the characterization of biopharmaceutical proteins on complementary levels. Capillary gel electrophoresis, capillary isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis are used in routine and demonstrated their reliability for the analysis of charge and size variants of therapeutic products. Recent developments have highlighted the potential of CE-MS for primary structure assessment and the characterization of post-translational modifications. The applications detailed in this chapter reveals the importance of CE methods in the panel of analytical techniques necessary to perform a comprehensive characterization of biopharmaceutical products.

2.2 Introduction - Biopharmaceutical products analysis

Biopharmaceuticals, also referred as biologics, are designating biomolecules (nucleic acids, peptides, proteins) used for therapeutic purpose. This category of therapeutic products has emerged at an exceptional pace and they are modifying the paradigm in the pharmaceutical industry with several blockbusters currently on the market. They are mainly produced using advanced recombinant technologies which enable the production of proteins on a large scale while minimizing the variability of the product [1]. Presently, biopharmaceutical products include different type of biomolecules, for instance hormones such as insulin or growth factors (Epo), interferons, interleukins (IL-2), vaccines, monoclonal antibodies (mAbs) and their associated formats (bispecific antibodies, fusion proteins, antibody-drugs conjugates).

Compared to small molecules employed as therapeutic treatments, biopharmaceutical products are significantly larger molecules with highly complex structures. In addition, similarly to biomolecules naturally present *in vivo*, they exhibit a large diversity of post-translational modifications (PTMs) like glycosylation for instance. These micro-heterogeneities may impact the physicochemical and/or the pharmacological properties of the product. The regulation agencies have introduced the concept of critical quality attributes to designate the PTMs responsible for a change of the properties of the biopharmaceutical product considered [23]. Therefore, each biopharmaceutical product requires a detailed characterization over the different structural levels in order to confirm the correct production of the desired protein, assess the occurrence of micro-heterogeneities and finally ensure the consistency of the production. As a consequence, an important activity of research has been reported recently in the analytical chemistry field with the objective to provide the analytical methodologies adapted to address the complexity emerging from the characterization of biopharmaceutical products. To achieve a detailed characterization, a combination of several analysis is performed in order to investigate the different structural aspects of the biomolecule. The analytical techniques used are commonly implementing a separation like capillary electrophoresis (CE) or liquid chromatography (LC) prior to the detection. It enables to separate the main isoform from lowly abundant variants or impurities which provide the optimal specificity and sensitivity. Since its introduction during the late 20th century, capillary electromigration techniques demonstrated to be particularly suitable for the separation of biomolecules. For this type of applications, the interests of CE lie in an excellent separation efficiency and the possibility to perform the separation in aqueous buffers that preserve the higher-order structure of proteins. Also, therapeutic peptides and proteins are commonly charged molecules. In many cases their modification induces a change of the net charge or the hydrodynamic radius due to a conformational change. Therefore, the electrokinetic separation delivered using CE based techniques appears particularly relevant for the separation of biopharmaceutical micro-variants. CE instrumentation can be coupled to a large panel of highly sensitive detection techniques including laser induced fluorescence (LIF) and mass spectrometry (MS). The latest has gradually prevailed as an essential tool for the structural characterization of biopharmaceutical products [15]. The characterization of biologics has been reported using every type of CE separation modes from capillary zone electrophoresis to imaging capillary isoelectric focusing as exposed in the rest of this chapter. The CE based methods are extensively used in the biopharmaceutical industry. CE can be used for routine analysis, for example it is the case to determine the glycosylation profile of therapeutic proteins. On another hand it may be also be used during research and development activities to investigate the presence of amino acid substitution or faint PTMs. This chapter describes the principal applications of CE based methods for the structural characterization of biopharmaceutical products. Each separation

mode is considered independently, and some relevant applications are emphasized with example reported in the literature.

[2.3 Capillary Gel Electrophoresis \(CGE\)](#)

2.3.1 Method description

The principle of capillary gel electrophoresis (CGE) is the separation of macromolecules according to their size. CGE employs the same separation mechanism as sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The charge homogeneity of SDS-protein complexes allows separation in a sieving medium under an electrical field based on their hydrodynamic radius. CGE adapts SDS-PAGE to a miniaturized format that reduces the known drawbacks of SDS-PAGE, such as a long separation time and limited reproducibility, limited possibilities to improve separation performance by automation, and simplifying sample treatment and increasing resolution. Shi *et al.* reported a comparison between SDS-PAGE and CGE for a mAb purity analysis [24]. Advantages of CGE include higher accuracy and resolution of size determination as well as quantitative performance.

Miniaturization of SDS-PAGE to a capillary format involved the replacement of the traditional slab gel by soluble polymers employed as a replaceable molecular sieve allowing the separation of the protein directly in the capillary. One major issue of this transfer of methodology concerns the nature of the capillary, which can produce high electroosmotic flow (EOF) depending on the background electrolyte (BGE) composition. In CGE, EOF must be suppressed to allow the separation based only on differences in the hydrodynamic radius. Several strategies have been described to remove EOF during CGE analysis. Some are based on the use of bare fused-silica capillaries with modifiers such as tris-borate in the BGE to suppress EOF. However, due to a possible adsorption of protein on the inner capillary wall, other solutions based on the chemical modification of the capillary wall by a dynamic or a permanent coating have been described.

Due to the need for total EOF suppression, neutral coatings are required. Several home-made solutions such as linear polyacrylamide (LPA) [25], hydroxypropyl cellulose (HPC) [26], polyvinyl alcohol (PVA) [27, 28], and some commercial solution [29-33] were developed. Concerning detection modes with CGE, UV, and fluorescence detection are the most common. Using UV detection, common wavelengths are 220 nm and more rarely 200, 214, and 280 nm. LIF offers improved sensitivity. Classically, a laser operating at 488 nm for fluorescence excitation with the resulting emission signal

monitored at 520 or 560 nm is used. For glycosylation analysis, CGE methods based on 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic-acid (APTS) derivatives allow fluorescence detection with the addition of three negative charges, and this appears to be a reference method [30, 31]. Indeed, with these modifications, electrophoretic separation can be obtained in less time, with a higher efficiency and sensitivity. APTS is not the only option. Other strategies have been developed to label N-glycan for mAbs analysis as a fluorescent product using 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (FQ) [34, 35] or 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulfonate (ANTS) [30]. All these methods had excellent precision and accuracy. Only differences were observed, particularly with regard to the detection and quantification of minor glycan species [30]. Since the end of the 80s, CGE methods have been developed for protein separations and characterization. In the field of biotherapeutics, CGE is known as a reference method for the size heterogeneity and glycan profiling of mAbs and related products. With the development of commercialized sieving kits by several companies, CGE has become a high-throughput method in the biopharmaceutical industry.

2.3.2. Applications

CGE is widely used for purity analysis of mAbs for lot release and stability studies, and to demonstrate product consistency and shelf life during the production and life cycle of the product. CGE applications are mainly focused on protein size heterogeneity and N-glycan profiling [14]. However, CGE is also used for profiling of ADC positional isomers [36], disulfide scrambled forms during the purification process of Fc-fusion protein [37], and Fc-fusion protein aggregation [32].

2.3.2.1. Size heterogeneity analysis

The size heterogeneity profile of proteins like mAbs is influenced by modifications such as PTMs or fragmentation. A shift of the profile toward acidic forms (deamidation, sialylation, glycation) or basic forms (succinimide formation, C-terminal lysine heterogeneity) [38, 39] can be observed and potentially impact the safety and potency of the product [40]. In 1999, Hunt *et al.* developed a CGE-LIF method using a labeling precolumn as part of the control system for the quality control (QC) release of mAbs [41]. The same group reported the optimization of a generic and quantitative CGE method for QC and stability monitoring of mAbs. The validation of this method under the guidelines of the International Committee on Harmonization (ICH) demonstrates that the assay quantitatively

determines the consistency of mAb manufacturing as it relates to size heterogeneity and product purity [42].

Han *et al.* also proposed an optimal CGE-LIF method for mAb separation based on multiusers experimental practices. Their method was transferred to the QC laboratory as a purity assay for lot release testing of therapeutic antibodies [43]. Several publications using CGE separations reported the efficacy of this approach in pharmaceutical laboratories [24, 44-48]. To date, the CGE method is considered a reference method for size heterogeneity testing of intact and reduced mAbs. Indeed, reduction of mAbs disulfide bonds using a reducing reagent like tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) or dithiothreitol (DTT) allows the separation of light chain (LC) and heavy chain (HC) isoforms in addition to several PTMs modifications. An application to the evaluation of the chemical integrity of mAbs during coupling to microparticle surfaces by tracking reduction fragments was reported [49].

To further improve the performance of CGE, Szekely *et al.* proposed a generally applicable multi capillary SDS-gel electrophoresis process for the analysis of mAbs for high-throughput QC. They adapted CGE methods for quality analysis with reducing conditions [47]. Gerster *et al.* established a high-throughput method for the determination of antibodies intra- and extracellular LC to HC polypeptide ratio using CGE in reducing conditions. The method demonstrated important information for optimizing the vector design leading to the selection of CHO cell lines with optimized antibody assembly and preferred product quality [50]. Li *et al.* [51] and Kubota *et al.* [52] demonstrated the identification of cleaved fragments of mAbs using orthogonal analytical methods including CGE (Figure 2.1). They confirmed the complementarity of CGE methods and structural identification methods (including top-down and bottom-up approaches) to identifying the fragment.

Technical progresses in CGE instrumentation to reduce separation times have focused on microchip electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (ME-SDS) tools. The intrinsic properties of microchips (separation channel of 14mm in length and 31 μ m in width) make ME-SDS a fast separation approach with separation times (<40s). Yagi *et al.* compared ME-SDS and CGE for the analysis of degradation species from heat-stressed mAbs and favored ME-SDS as an alternative method because of a significant reduction in problems often observed in CGE such as injection failure, occurrence of noise peaks and baseline shift [53]. However, mAbs analyzed by this technique sometimes exhibited different electrophoretic behavior.

Cai *et al.* reported the optimization of ME-SDS for mAbs product quality analysis for three IgG1 and five IgG4 under reducing conditions. The optimized method was further evaluated for specificity, linearity, precision, and limit of quantification, and compared with conventional CE-SDS. While ME-SDS has also been increasingly recognized as an attractive alternative to conventional CE-SDS for

protein purity analysis, there are still opportunities for improvement, for example, higher resolution to separate product variants of similar sizes without sacrificing signal response and higher sensitivity to accurately quantify low-expressing proteins [54].

Nonetheless, Smith *et al.* validated a ME-SDS method for purity analysis of therapeutic mAbs by separation and quantitation of size variants. Once defined through design of experiments studies, the method design space was validated according to ICH Q2 guidelines. The method is appropriate for use as a GMP release and stability assay including accelerated stability/forced degradation studies and may be used for routine upstream and downstream process support [55].

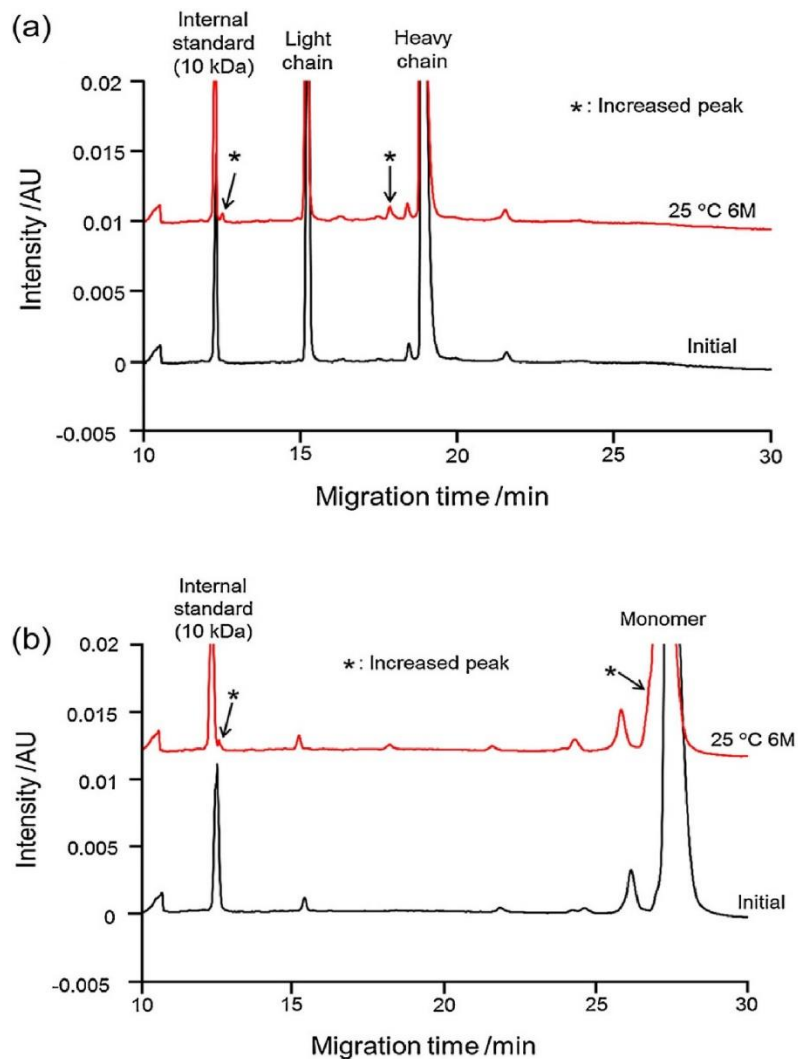


Figure 2.1 : Electropherograms of the mAb-A initial sample (lower trace) and degradation sample (upper trace) obtained by CGE (a) reduced and (b) non-reduced conditions. Analytical conditions: bare capillary, 50 μm i.d. (360 μm o.d.) \times 30.2 cm, 20 cm effective; separation voltage, -15 kV; detection, 220 nm; capillary temperature, 25°C; sample storage temperature, 25°C; injection, -5 kV for 20 s; running buffer, SDS gel buffer. Extracted from [52].

2.3.2.2. Glycosylation analysis

Biotherapeutics such as mAbs, ADCs, or Fc-fusion proteins are glycosylated proteins whose N-glycans are naturally incorporated in the protein during secretion into the extracellular environment. Extensive glycans characterization in terms of structure and relative abundance is of prime importance. CGE performed for glycosylation analysis of biotherapeutic proteins represents a reference method implemented in the QC laboratories of biopharmaceutical companies.

Mainly used as CGE-LIF of APTS labeled N-glycans, some alternatives were described using labeling by other fluorophore groups. Validation of CGE-LIF (APTS) methodology, in terms of reproducibility of sample preparation and N-glycan profiling, was described in an interlaboratory study performed by several biopharmaceutical companies, analytical contract laboratories, universities, and national authorities in the United States, Asia, and Europe [29]. Migration time, peak area, and peak area percent values were determined for all peaks with >1% peak areas. Low variability and high reproducibility, regardless of site, was demonstrated. These results allowed standardization and validation of the CGE-LIF (APTS) approach for mAbs glycosylation analysis. CGE was used for a lot-to-lot variability study of major oligosaccharide profiles [33] and to identify all major and most minor glycans in a mAbs produced in NS0 cells using glycan standards [28]. The group of Wuhrer proposed a comparison of separation-based methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles including CGE-LIF (APTS) (*Figure 2.2*) [56]. Hydrophilic interaction liquid chromatography of 2-aminobenzamide (2-AB)-labeled glycans was used as a reference method. A therapeutic antibody reference material was analyzed six times on two different days, and the methods were compared for precision, accuracy, throughput, and other features, with emphasis on the detection of sialic acid containing glycans. CGE-LIF (APTS) showed excellent precision and accuracy; some differences were observed, particularly with for the detection and quantification of minor glycan species, such as sialylated glycans [30]. The development of this last method was driven by the need for rapid and automated sample preparation methods for N-glycosylation analysis.

Szigeti *et al.* developed a rapid N-glycan release method based on an immobilized recombinant glutathione-S-transferase tagged PNGase F enzyme microcolumn [57]. This method resulted in efficient N-glycan removal in 10min from glycoproteins. The same group developed a triple-internal standard based glycan structural assignment method. Based on the migration times of the co injected standards of maltose, maltotriose, and maltopentadecaose, a data-processing approach was designed and developed to set up a virtual ladder that was used for glucose unit calculation. This approach readily supports high-throughput CE systems by significantly accelerating the processing time for glycan structural assignment [58].

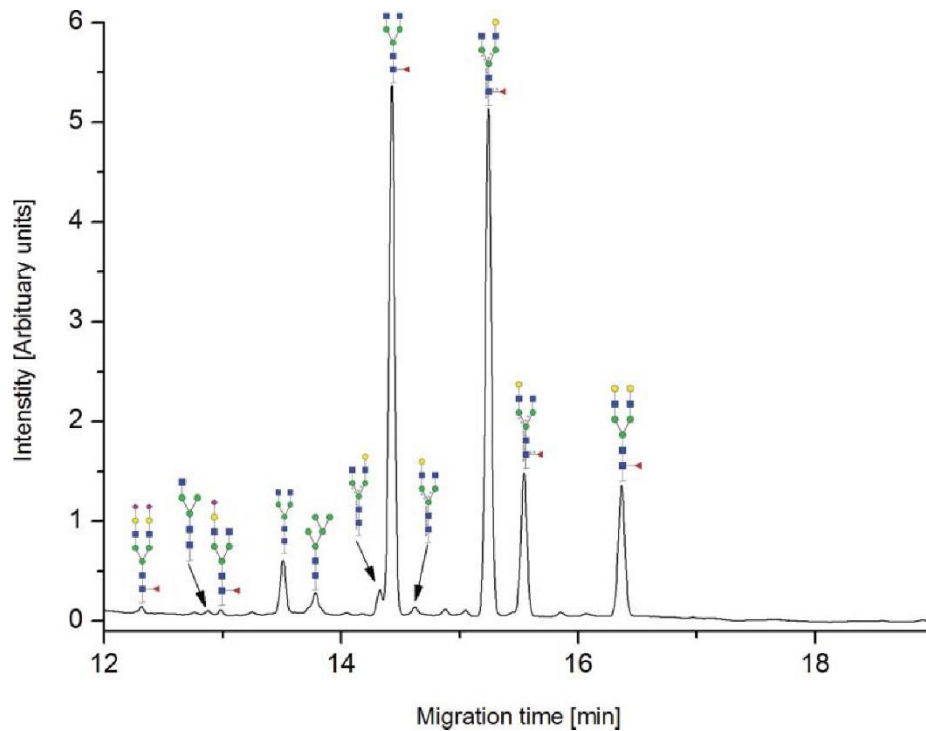
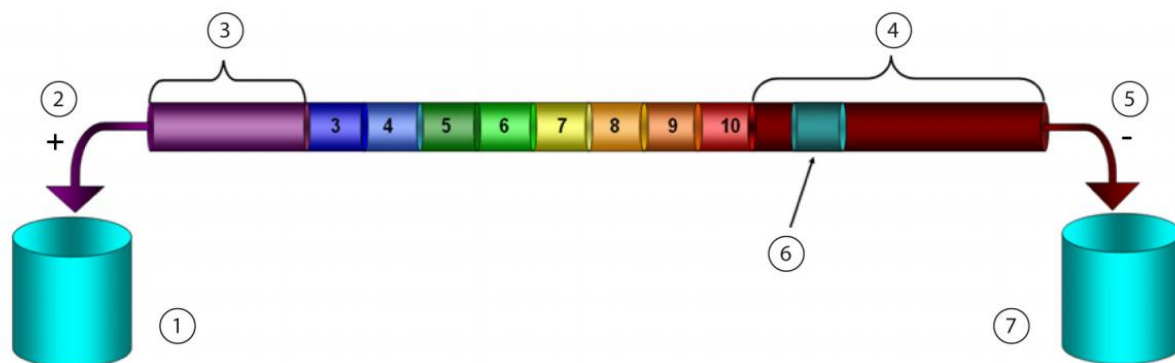


Figure 2.2 : Capillary electrophoresis separation of APTS-labeled N-glycans with laser-induced fluorescence detection. Extracted from [30].

2.4. Capillary isoelectric focusing (CIEF)

Capillary isoelectric electrophoretic focusing (CIEF) provides the highest resolution for the separation of proteins according to their isoelectric point (pI) (Figure 2.3) [59]. CIEF is based on the same mechanism as for IEF slab gel. CIEF methods are mainly developed for the analysis of charge heterogeneity of mAbs and related products [60-65]. A mixture of ampholytes and sample fills the whole capillary. A basic catholyte, generally sodium hydroxide, placed at the cathode end and an acidic anolyte, generally phosphoric acid, is placed at the anode end. Due to the ampholytes properties, a pH gradient is established in the capillary under an electrical field. Proteins are focused along the pH gradient until the region where the local pH and the pI of the protein are equal is reached. At this point, the apparent charge of the protein is zero, thus canceling its electrophoretic mobility. In a second step, sample is forced to migrate toward the detector by electrophoretic or hydrodynamic mobilization. Indeed, in CIEF, the position of the detector at the capillary exit makes the mobilization step mandatory, which may involve negative effects on the migration time and on the resolution due to possible peak broadening.



- | | |
|------------------------|---------------------|
| 1. Analyte, pH 1.4 | 5. Cathode |
| 2. Anode | 6. Detection Window |
| 3. Anodic Stabilizer | 7. Catholyte, pH 13 |
| 4. Cathodic Stabilizer | |

Figure 2.3 : Schematic representation of a pH gradient inside the capillary of cIEF. (extracted from Sciex cIEF system user guide)

To address these difficulties, whole-column imaging CIEF (iCIEF) was developed to facilitate faster separations with higher resolution, better reproducibility, and reduced sample volume. iCIEF based on the use of a short capillary length (5cm) with CCD camera detection allows real-time monitoring of the focusing process. No mobilization step is necessary in iCIEF to detect proteins. Moreover, miniaturization of the capillary length permits shorter separation times in routine analyses. During the focalization step in CIEF and iCIEF, EOF must be suppressed and hydrodynamic pressure is prohibited. Similar to EOF suppression strategies described for CGE, neutral capillaries using dynamic or permanent coatings have been used. In CIEF, same coating as described in CGE were used as LPA [62, 63, 66-68], hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) [64, 69], and PVA [61, 70]. For iCIEF, the use of a fluorocarbon capillary is virtually universal due to the manufacturer's near monopoly (Proteinsimple) of the instrumentation [44, 48, 60, 67, 71].

Concerning detection modes coupled with CIEF and iCIEF, UV detection at 280nm represents almost all applications described to date. This is due to the favorable absorption of proteins at this wavelength and the large cut-off observed at lower wavelengths because of the strong absorbance of the ampholytes. Other detection modes are described to improve the performance of CIEF and iCIEF in terms of sensitivity and structural characterization. A multiplexed iCIEF immunoassay with chemiluminescence detection for mAbs characterization requiring different approaches to immobilization and conjugation allows the detection of product impurities even in the presence of excess host cell protein lysate [60]. For structural information, MS detection coupled with CIEF allowed

identification based on pI and m/z ratio [72]. Nonetheless, CIEF-MS coupling is limited by technical issues such as the presence of salts and ampholytes. Presently, CIEF and iCIEF represent a reference method for the characterization of biotherapeutics. Like CGE, with the development of commercial kits and instruments, CIEF and iCIEF have become high-throughput methods in the biopharmaceutical industry.

2.4.1. Charge heterogeneity analysis

Charge heterogeneity profiles can be influenced by modifications such as PTMs or fragmentation. Therefore, charge heterogeneity analysis is important for the QC testing of protein-based pharmaceuticals. CIEF and iCIEF are fully implemented in QC laboratories and have become reference methods for the characterization of charge heterogeneity in biopharmaceutical companies. Identification of intact and reduced therapeutics and PTMs can be realized using this electrophoretic mode.

Numerous sources cite the efficacy of CIEF and iCIEF as useful tools in the process development of biotherapeutics [14, 15, 73-78]. To illustrate the power of these methods, Cao *et al.* optimized the focusing time and temperature to obtain a robust method to analyze trastuzumab biosimilar charge variants profiles [79]. They reported that this method can be applied to evaluate stability, lot consistency, and purity assessment, and concluded that CIEF was a useful tool for the routine analysis of therapeutic mAbs. Suba *et al.* validated a CIEF method for identification testing of mAb drug products with a pI between 7.0 and 9.0 [62]. The CIEF method provided a good pH gradient for internal calibration ($R^2 > 0.99$) and good resolution between all isoforms ($R = 2$), as well as minimizing the time and complexity for sample preparation. The method is reproducible and is suitable for validation following ICH Q2 and method transfer to any QC laboratory. These authors also found CIEF to be an accurate routine analytical method to confirm protein identity in QC and release tests in the biopharmaceutical industry, especially with the use of commercial standardized kits [62]. CIEF and iCIEF methods are also suitable for the characterization of mAbs-related products. Wu *et al.* measured the pI of a deglycosylated Fc-protein named conbercept using a CIEF method as a part of a complete structural characterization strategy by different analytical methods [80]. A year earlier, Anderson *et al.* reported the charge heterogeneity of a heavily sialylated Fc-fusion protein for biosimilar development using iCIEF [81]. Other applications of ADCs charge heterogeneity by CIEF and iCIEF were reported in the last 10 years [65, 71, 82].

To validate the accuracy of CIEF and iCIEF method as references for biotherapeutic charge variants characterization, Salas-Solano *et al.* organized two interlaboratory studies based on the same design [63, 66]. An international consortium of 12 laboratories from 11 biopharmaceutical companies in North America and Europe was formed to evaluate the precision and robustness of CIEF and iCIEF to determine the charge heterogeneity of mAbs. These interlaboratory studies endorse the application of CIEF and iCIEF methodologies both in process development and QC of biopharmaceutical companies. It was concluded that these methods could also facilitate increased regulatory and industrial acceptance of CE during the development of protein therapeutics [66].

Technical progresses of IEF instruments to further improve performances in terms of separation time resulted in the development of microchip CIEF (mIEF) tools. Kinoshita *et al.* reported a comparison between mIEF and conventional CIEF methods for the evaluation of mAbs charge heterogeneity (Figure 2.4) [64]. Despite the decrease by 10-fold in separation time and the excellent correlation of calculated pI values and the relative amounts of each charge variants, these authors admitted the lack of automation as a problem. However, this strategy appears as a promising method and the need for improvements in functionalization will certainly be realized in the future.

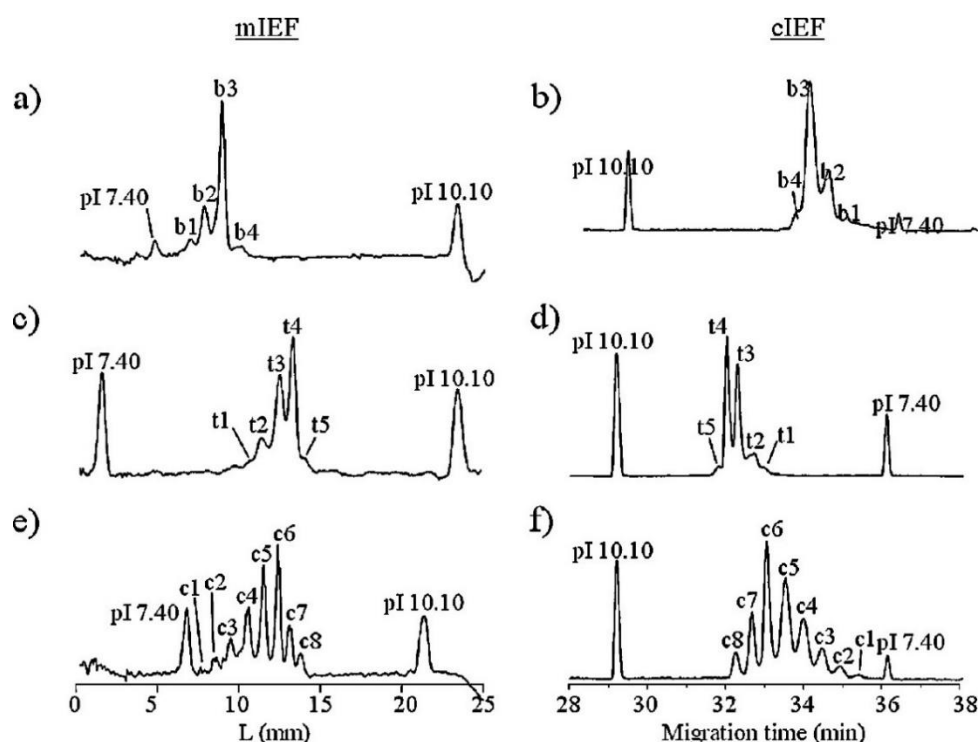


Figure 2.4 : Analysis of charge variants of bevacizumab, trastuzumab, and cetuximab by mIEF (left column) and CIEF (right column). Peaks observed in each sample were labeled with numbers depending on their detection positions. Peak 1 means the most acidic-end peak in the sample, but they were not identical charge variants among the tested samples. Bevacizumab (a and b), trastuzumab (c and d) and cetuximab (e and f). Extracted from [64].

2.5. Capillary Electrophoresis

2.5.1. Method description

Not considered as a reference method so far, recent improvements in robustness and validation of CE methods are promising for the characterization of biotherapeutics. Separations by CE are based on differences in electrophoretic migration of analytes in a conductive solution in an electrical field following their charge-to-size ratio [16]. CE methods are used mainly for the characterization of charge heterogeneity of mAbs [39, 44, 83-87]. The capillary is rinsed and filled with BGE, the sample introduced by hydrodynamic injection, and the analytes separated by application of an electric field according to their electrophoretic migration. Detection is typically by fixed wavelength absorbance at 200nm or 214nm. Unlike CGE or CIEF, CE is more compatible with MS detection, affording higher sensitivity and the possibility of obtaining structural information for biologics (Figure 2.5).

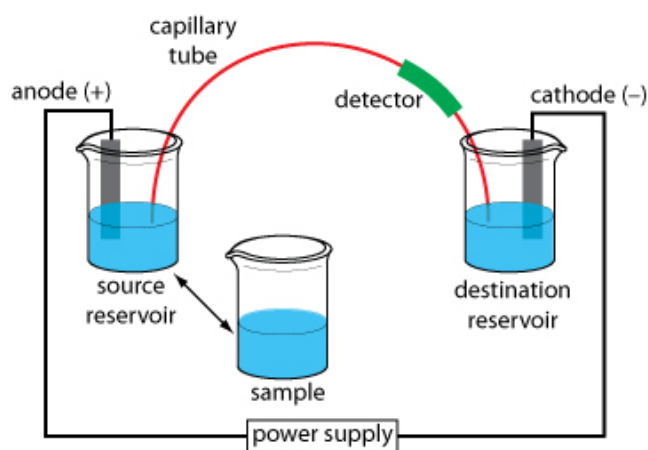


Figure 2.5 : Schematic representation of the capillary electrophoresis (CE) system

Positively charged proteins impose no or a reverse EOF for mAbs charge heterogeneity analysis. Indeed, due to negatively charged surface silanol groups, coulombic interactions induce protein adsorption phenomena at the inner capillary wall. Peak broadening and a dramatic decrease in resolution are possible consequences. Modification of the inner surface of capillary wall with a dynamic or a permanent coating is the most described strategy to eradicate these phenomena [88-92]. Due to simplicity dynamic coating of the capillary with a solution containing a polymer as a buffer additive, such as HPMC or polybrene, are commonly used for the characterization of mAb charge variants [83-85]. Polymers adsorb on the capillary wall minimizing the adsorption phenomena between mAbs and silanols, but the dynamic process can imply possible release requiring regeneration steps.

This strategy is designed for spectrophotometric detection but is generally not compatible with MS detection. As an alternative, modification of the capillary wall by covalent bonding of neutral or charged polymers is a good option. Although modified capillary columns are commercially available, numerous coating procedures are described in the literature [93].

For the analysis of mAbs charge heterogeneity, major trends were observed, for example: (i) for a positively charged coating, EOF and the mAb effective mobility need to be relatively close and (ii) for neutral coatings, EOF has to be near zero to obtain the highest resolution [85]. Moreover, due to other types of interaction, such as hydrophobic interactions, no coating eliminates entirely protein adsorption at the capillary wall. To enhance these phenomena, some publication reported the addition of a surfactant, such as triethylenetetramine (TETA) [39, 83, 84] or Tween 20 [85], to the BGE. Since miniaturization is a key objective for the future of analytical sciences, microchip zone electrophoresis (MZE) represents the latest development to miniaturize CE separation methods. Improvement of CE performance in terms of separation time for mAbs charge heterogeneity place MZE as a forthcoming approach for the characterization of biopharmaceuticals. Several commercial systems are available with UV, MS, or chemiluminescence detection (*Figure 2.6*).

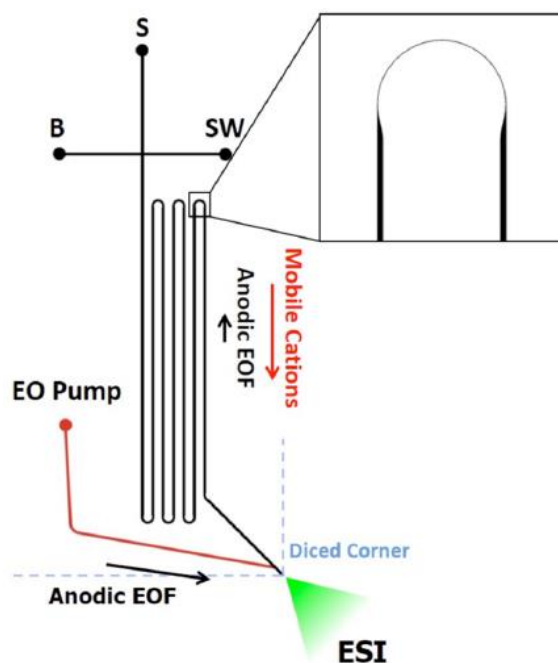


Figure 2.6 : Schematic representation for CE-ESI devices with a 23 cm separation channel with an enlarged image of the asymmetric turn tapering. Red channels indicate an APS coating while black channels indicate an APS-PEG450 coating. S: sample reservoir; B: background electrolyte reservoir; SW: sample waste reservoir; EO: electroosmotic pump reservoir. Extracted from [94]

As for conventional CE, adsorption phenomena on device surfaces is a concern, and both dynamic and permanent coatings have been developed for the most frequently used microchip materials including glass, poly(methylmethacrylate), poly(dimethylsiloxane), poly(carbonate), and poly(ethylene terephthalateglycol) [95]. As an MZE-UV approach, dynamic coating with HMPC is most commonly used for mAbs charge heterogeneity analysis using Tween 20 as a BGE additive [69, 86, 87]. More recently, Ramsey *et al.* proposed an MZE-MS device for the separation of intact mAbs variants based on a surface coating method utilizing chemical vapor deposition of an aminopropylsilane layer and covalent modification with polyethylene glycol [94, 96].

2.5.2. Applications

CE was investigated for the study of mAbs and related products focused on protein charge heterogeneity [39, 44, 85, 87, 97]. Nonetheless, some articles demonstrated the efficacy of CE for the determination of the effective electrophoretic mobilities and charge to characterize Fc1 aggregation, and highlighted the challenges in maintaining long-term stability of biotherapeutics based on human Fc constructs [98], or to enhance treatment of eye diseases such as wet age-related macular degeneration and diabetic retinopathy in the development of iontophoretic drug delivery systems [99]. Feng *et al.* identified the N-glycan profile with different CE methods including CE, CGE, and MEKC. They demonstrated the low covariance and high orthogonality using multiplexing platforms for the identification of glycans [100]. Jaccoulet *et al.* also demonstrated the potential of CE for routine and high-throughput applications in a hospital, particularly for drug delivery control in cancer treatment [101].

2.5.2.1. Charge heterogeneity analysis

Charge heterogeneity is considered by regulatory agencies to be a critical product quality attribute due to its potential to impact acidic and basic isoforms on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and stability during long-term storage [102]. High-throughput charge heterogeneity analysis in biopharmaceutical QC laboratories requires reproducible and fast analytical methods. As an alternative to CIEF, CE-based methods were developed for the rapid analysis of mAbs charge variants for the QC of biopharmaceuticals in terms of purity, quantification, and stability testing. Reusch's group can be considered the pioneers of CE separations of intact mAbs charge variants [83, 84]. They described CE-UV methods for the analysis of mAbs based on the optimization of three

parameters, (i) BGE pH between 4.5 and 6.0, (ii) ϵ -aminocaproic acid (EACA) BGE with a concentration between 300 and 600mM, and (iii) BGE additives with HPMC and TETA to perform dynamic coating of fused-silica capillary columns to assess robustness of the method. This method represents a reference for the analysis of mAbs charge variants.

A few articles described mAbs characterization analysis using similar CE-based methods with optimization of only EACA concentration, capillary coating properties, and nature of BGE additives [39, 44, 85-87, 97, 103]. Since CE provides an alternative approach to CGE or CIEF strategies for the characterization of intact mAbs, it also can be considered an orthogonal approach to assess the complete physicochemical properties of biotherapeutics. Glover *et al.* performed a stability study of pertuzumab and trastuzumab admixture in an intravenous infusion bag by several methods including CE, CGE, and iCIEF [44]. They concluded that, using these methods, no observable differences in the pertuzumab/trastuzumab mixtures stored for up to 24h at either 5°C or 30°C were detected, proving the suitability of CE as a new platform technology for the charge heterogeneity testing of mAbs. Zhao *et al.* reported their work on charge variants analysis of an avastin biosimilar using several analytical methods including CE and iCIEF (Figure 2.7). As expected, they concluded that these separation techniques contribute to the biopharmaceutical drug innovation and development [104].

Within the biopharmaceutical industry, to achieve the needs of GMP requirements, CE approaches have to pass method validation requirements according to ICH Q2. Evaluation of CE-UV methodology, in terms of pI range and high-throughput capabilities, was described in an international cross company study with 11 participating laboratories [39]. It was shown that CE can be applied to a broad pI range between 7.4 and 9.5. Correlation coefficients for linearity, precision by repeatability, and accuracy by recovery were 0.99 and around 1% and 100%, respectively. A direct comparison with ion exchange chromatography and iCIEF showed comparable results for percentage of corrected peak area for all three methods, but the highest resolution was obtained by CE for the investigated mAbs [39]. This major article confirms the potential of CE as a reference technology for the charge heterogeneity testing of biotherapeutics in the biopharmaceutical industry. ME-SDS or MIEF, and MZE have continued to develop for high-throughput charge heterogeneity analysis of mAbs [69, 86, 87]. These methods utilize high-speed microchip electrophoresis separations (from 8- to 90-fold faster) and are well suited for high-throughput charge profiling of antibodies during process and formulation development [69].

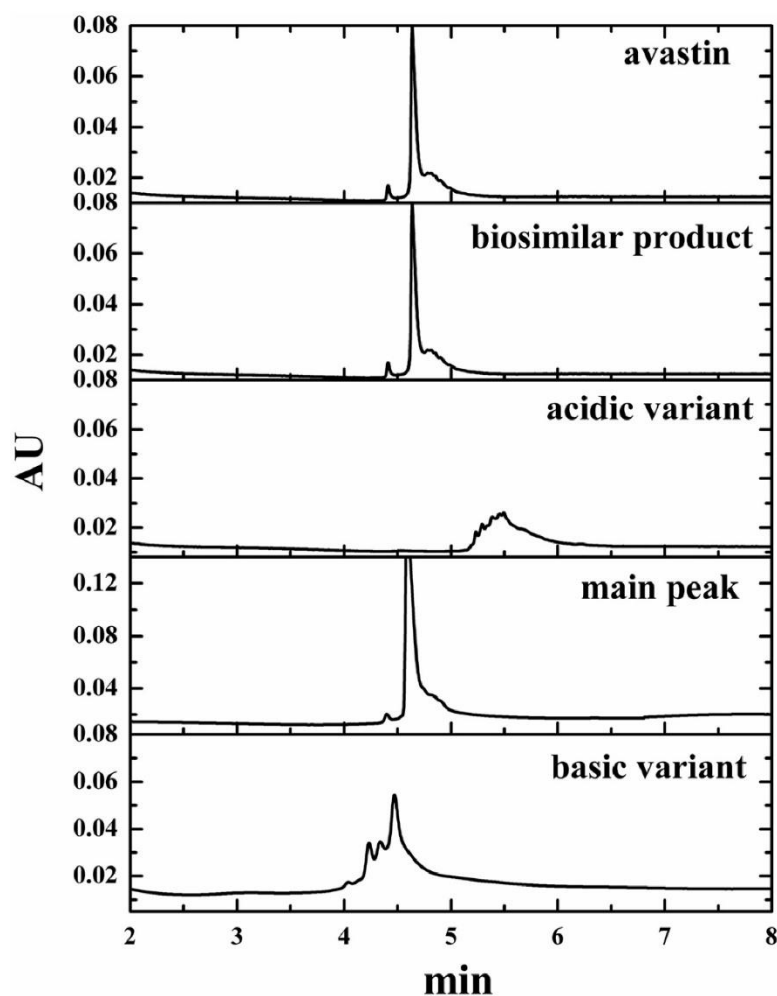


Figure 2.7 : Charge variants of mAbs, biosimilar product and avastin profile obtained by CZE analysis.

Extracted from [102]

[2.6. CE hyphenated with Mass Spectrometry](#)

[2.6.1. Method description](#)

The development of electrospray (ESI) ionization and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) led to the application of MS to biomolecules. As the performance of mass spectrometers improved in terms of sensitivity, mass accuracy, and scanning frequencies, MS progressively became a key technique for the analysis of biomolecules, especially as it allows structural information to be obtained. CE quickly appeared as a suitable separation technique for direct hyphenation with MS in order to analyze complex samples [105]. The different modes of separation provided by CE techniques are particularly adapted to biomolecules separation, including, glycans, peptides, and proteins. The example that emphasizes this approach the best is deoxyribonucleic acid sequencing by CGE. CE separations in most cases are utilized for charged analytes in solution, which is

favorable for MS analysis. Finally, MS delivers an outstanding sensitivity compared to other analysis techniques. The sensitivity provided by MS can counterbalance the limited injection volumes typical of CE. CE hyphenated with mass spectrometry (CE-MS) hyphenation is usually implemented with ESI ionization mass spectrometers (*Figure 2.8*); however, CE-MALDI-MS specific applications are also described in the literature. Regarding the coupling of CE-MS, it requires continuity of the electrical field applied to induce the migration of analytes whereas the capillary outlet is fixed inside the source instead of the outlet vial. Therefore, different designs have been developed to meet the technical requirements and ensure compatibility with ESI and MALDI ionization.



Figure 2.8 : Capillary electrophoresis-Mass spectrometry coupling with a sheathless interface.

CE-ESI-MS interfaces can be categorized based on the method used to maintain the electrical field [106]. The most common CE-MS interface uses a sheath liquid, connected to the outlet electrode and constantly flowing, in order to form a junction with the BGE flowing out from the capillary outlet. The constant introduction of the sheath liquid to the mass spectrometer reduces the ionization yield of analytes and thus the signal response. To address the limitations of sheath-liquid CE-MS interfaces, several research groups have developed CE-MS interfaces that do not rely on a sheath liquid or reducing to the minimum the flow rate of sheath liquid involved during the analysis, some of which are commercially available (Figure 2.9)[107-109].

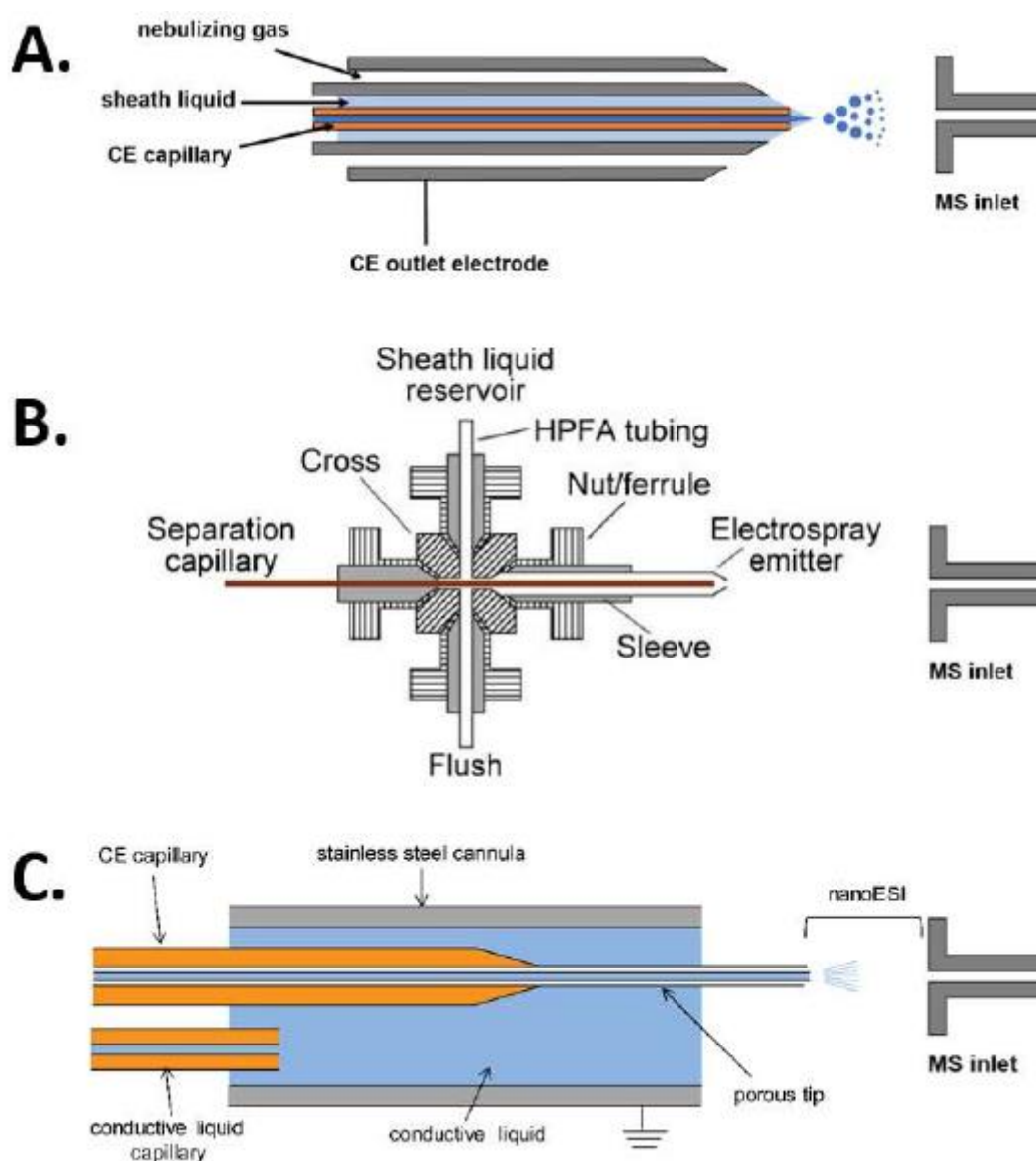


Figure 2.9 : Schematic representations of the principal design of CE-ESI-MS hyphenation systems. 3 main interfaces are commonly used: coaxial sheath liquid interface (A), nano sheath flow interface (B) and sheathless interface (C). Extracted from [18]

The formation of an EOF during the separation produces a constant flow of BGE of a few dozens of nL/min that is directed toward the MS source. The characteristics of this flow are favorable for nanoESI. NanoESI has favorable characteristics in terms of ionization yield and provides optimal sensitivity. In addition, capillary inner diameter below 100nm enables smaller droplets to be produced, which improves the production of ions in the gas phase [110]. With dedicated conditions, CE-MS analysis is described for the characterization of therapeutic proteins over different levels defining the structure of the macromolecule:

- Primary structure: amino acid sequence, PTMs including glycosylations
- Secondary structure: partially digested proteins for glycoforms and isoforms characterization
- Tertiary and quaternary structure: intact protein analysis

CE-MS demonstrated the contribution of the selectivity provided by electrokinetic separation for the comprehensive characterization of therapeutic proteins, especially at the peptide level. Indeed, CE enables peptides to be transferred to the MS regardless of structure or hydrophobicity. In addition, it has demonstrated the possibility to separate peptides with PTMs from the intact counterparts or glycopeptides containing different glycans [20]. These characteristics are particularly important for the development and approval of new therapeutic proteins. The analysis of intact proteins using liquid-chromatography-based methods is limited due to interactions with the stationary phase, especially for therapeutic proteins with high-molecular masses like mAbs. Because CE does not incorporate a stationary phase, it is well suited to the analysis of intact proteins. For biotherapeutic molecules, the objective is to provide relevant characterization while reducing sample pretreatment.

2.6.2. Applications

2.6.2.1. Amino acid sequence characterization

Even though most therapeutic proteins are produced by highly accurate recombinant technologies, amino acid sequence characterization is essential for lot release in order to demonstrate the absence of amino acid substitution during the production or conservation processes [111]. CE-MALDI-TOF MS was implemented using an automated fractionation/deposition system and

demonstrated the ability to perform peptide mapping of trastuzumab with a sequence coverage of 92%–100% for the HC and LC, respectively [112].

Gennaro *et al.* demonstrated the complete characterization of mAbs using CE-ESI-MS analysis of a Lys-C digest in combination with HPLC–MS analysis [113]. The approach was based on sheathless CE-ESI-MS/MS. This analysis with trypsin proteolysis demonstrated the consistent characterization of the amino acid sequence with 100% coverage for various mAbs in a single analysis while strictly considering peptides without miscleavage. The datasets generated enabled the characterization of N-glycosylations, N-terminal glutamic acid cyclization, asparagine deamidations, methionine oxidations, and aspartic acid isomerizations [20, 114]. The same method was used to assess the biosimilarity of trastuzumab and cetuximab to their respective biosimilar candidate. This analytical workflow demonstrated the possibility to achieve a detailed characterization of complex therapeutic proteins with a reduced number of analyses in a robust manner [115].

Said and coworkers adapted a CE-ESI-MS/MS method for the characterization of the primary structure of antibody-drug-conjugates brentuximab vedotin. They demonstrated complete characterization with a single injection and the ability to locate the position of drug molecules on the peptide backbone and to estimate the conjugation level independently for each site [116].

2.6.2.2. Glycosylation characterization

In a regulatory environment for therapeutic proteins, glycosylation is considered one of the major CQA. Indeed, glycosylation represents the most common PTMs and the characterization of glycosylation is complex due to the potential presence of several glycosylation sites on a single protein in addition to the different carbohydrate structures expressed for a designated site. They impact significantly the physicochemical properties of therapeutic proteins (solubility, protein–protein interactions) and may be the cause of immunogenic reactions if not properly controlled. Regulation agencies therefore require for approval a detailed investigation of the product glycoprofile, the demonstration of analytical methods able to provide a robust and confident characterization of this aspect of the protein.

The analysis of glycosylations using CE-MS methods is commonly performed on released glycans or at the peptide level whereas it is also emerging at the middle-up and intact protein level. Gennaro and coworkers utilized CE-ESI-MS of glycopeptides to study glycosylation of several mAbs. The glycopeptides were generated through Lys-C proteolysis of the therapeutic protein followed by APTS labeling. Detection was realized in the negative ionization mode and allowed the identification

of the major N-glycosylation and O-glycosylation sites [113]. The same group described a CE-LIF/ESI-MS method using a PVA-coated capillary for the analysis of therapeutic mAbs glycosylation after glycans release and APTS labeling [117]. A CE-ESI-MS method with a basic BGE was used for the analysis of glycans released from therapeutic mAbs as native or APTS-labeled glycans [118]. A similar CE-ESI-MS approach using an acidic BGE was used for the characterization of released glycans [27]. CE-ESI-MS/MS method could be used for characterization of glycosylation together with amino acid sequence information. The characterization based on MS/MS data enabled the position on the peptide backbone of the glycosylation site to be precisely determined and the structure of the glycan moiety was identified from the y/b ions (*Figure 2.10*). Finally, the intensities of each glycopeptide could be exploited to estimate the relative abundance of each glycoform [114]. This methodology demonstrated the possibility of using glycoprofiles for therapeutic mAbs to compare biosimilar candidates [115, 119].

The characterization of glycosylation using CE-ESI-MS/MS at the peptide level for ADCs suggests the technique may be adaptable for emerging therapeutic proteins. The localization of glycosylation sites of erythropoietin was described using a CE-ESI-MS analysis. In this case, the identification of glycosylation at the peptide level was demonstrated by proteolytic sample digestion [120]. Kammeijer and coworkers described a CE-ESI-MS method with a coaxial flow of nitrogen as a dopant in the ionization process for the characterization of therapeutic mAbs glycopeptides. The results demonstrate an increase in the sensitivity with improvement of the robustness of the glycoprofiles generated [121].

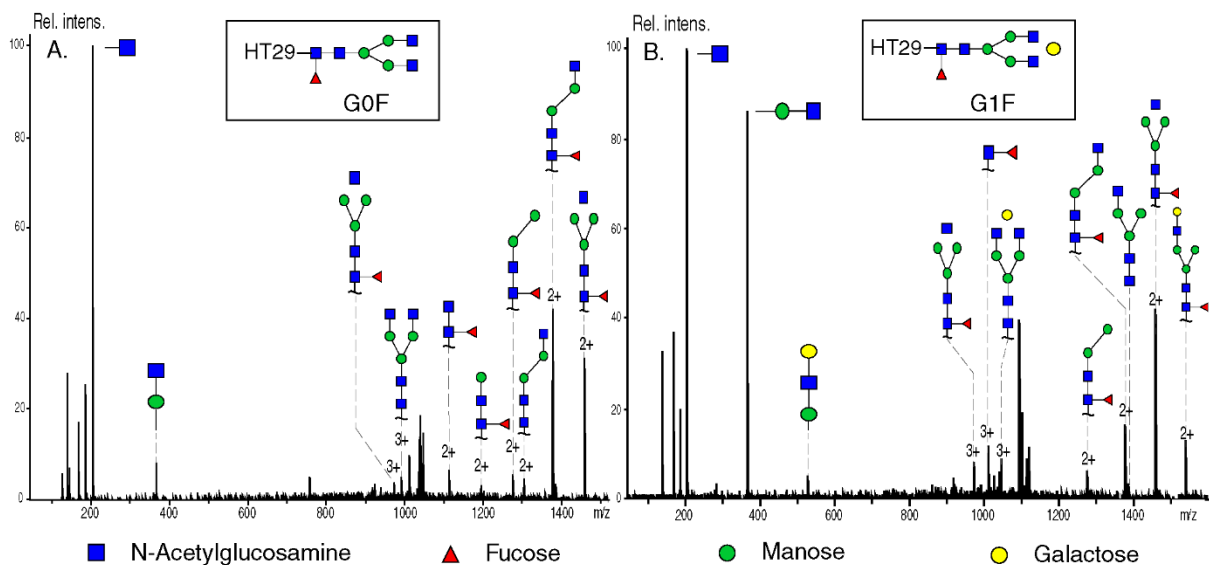


Figure 2.10 : Fragmentation spectra obtained for the CE-ESI-MS/MS analysis of trastuzumab corresponding to the glycopeptide HT29-G0F and HT29-G1F. Adapted from [120].

2.6.2.3. Middle-up analysis

Middle-up analysis refers to the characterization of therapeutic proteins after limited proteolysis, which generates peptides usually larger than 10kDa. Usually proteolytic treatment is realized with dedicated enzymes: pepsin, papain, streptococcal cysteine proteinase, for example. From an MS perspective, the use of a limited digestion is interesting. It allows the complexity of the sample to be reduced in order to focus the analysis on specific parts of the investigated protein, whereas the other sources of heterogeneities can be excluded. As a consequence, it is employed mainly for the analysis of highly complex proteins like mAbs, especially because highly specific enzymes for IgG1 proteolysis are available [122]. The peptide fragment generated from limited proteolysis is significantly larger compared with those typically generated by conventional enzymes like trypsin, chymotrypsin, Lys-C, Asp-N, or proteinase-K.

One of the major issues for middle-up and intact protein analysis is the adsorption of the protein due to electrostatic interactions with the silanol groups on the capillary surface. This occurs even in acidic conditions. To address this limitation, physically coated or chemically bonded modified capillaries may be necessary. For CE-MS, permanent coatings like HPC and LPA are typically used. Biacchi and coworkers developed an offline CE-MALDI/ESI-MS method for the analysis of different fragments produced from the IdeS digestion of cetuximab. They demonstrated the baseline separation of Fc lysine variants and the independent characterization of the N-glycosylation sites present on the protein [123]. This method was also used to investigate the formation of Fc/2 dimers from the IdeS digestion and their conservation in case of analysis in native conditions [124].

The analysis of a mAbs after reduction of disulfide bridges was developed using online CE-ESI-MS. Results showed the separation of the mAbs HC and LC in a mixture of reduced mAbs. CE-ESI-MS was used for the middle-up characterization of therapeutic mAbs after different sample pretreatments. The complete separation of the mixture composed of mAbs HC, LC, and fragments produced by IdeS digestion was demonstrated. In addition, the different lysine variants for the Fc fragments were identified as well. A study of mAbs stability demonstrated the ability of this method to separate Fd fragment carrying a succinimide intermediate on an asparagine residue [125]. The various applications of CE-ESI-MS middle-up characterization demonstrate show CE is suitable for the separation of large protein fragments even in the case of a single modification.

2.6.2.4. Intact protein analysis

In the context of biopharmaceutical products manufacturing, the analysis of intact proteins represents “the ideal analysis.” MS-based methods applied on a routine basis are delivering an unprecedented level of characterization, constantly enriched with methodological and technical improvements. However, most of these methods use extensive sample preparation, which risk introducing artificial modifications. The analysis of the intact protein has the advantage to be more representative of the actual sample. An automated CE-MALDI-MS instrument was designed by Biacchi and coworkers for offline analysis. The CE-MALDI-MS method demonstrated the separation and MS analysis of intact charge variants of trastuzumab [112].

CE-ESI-MS using a sheathless interfacing was used to develop a method for the characterization of human erythropoietin (Epo). This method allowed fractionation and subsequent characterization of a large number of Epo glycoforms in a single analysis. In this case, the separation of isoforms prior to their transfer to the MS improved sensitivity and significantly increased the number of identified isoforms [126]. The characterization of intact interferon- β 1 was realized using CE-ESI-MS/MS analysis. This methodology allowed the identification of glycoforms and modified variants by MS/MS analysis. The concomitant use of electron transfer dissociation and high-energy collision dissociation fragmentation demonstrated the possibility of performing a comprehensive characterization of isoform diversity and the occurrence of PTMs [110]. The separation and identification of deglycosylated therapeutic mAbs was described using CE-ESI-MS for the identification of low levels of free LC in IgG1 reference material [125].

A CE-nanoESI-MS microchip was used for the analysis of intact infliximab. In this application, the sample did not undergo any pretreatment. Lysine variants were successfully separated and identified by MS. An IgG1 drug conjugate was characterized using this method. The results showed the ability to discriminate between nonconjugated species and species conjugated with one or two drugs [94]. The same system was used for the characterization of intact ADCs approved as therapeutic treatment. The separation of charge variants emerging from N-terminal glutamic acid cyclization was achieved. In addition, decarboxylation of the sample prior to the CE-nanoESI-MS analysis enabled the characterization of the unconjugated species and ADCs exhibiting different numbers of conjugated drugs. The microchip CE-nanoESI-MS analysis demonstrated the possibility to accurately determine the drug-to-antibody ratio (DAR) (*Figure 2.11*)[96]. Based on the IgG1 format, ADCs include an additional level of complexity coming from the presence of different numbers of conjugated drugs compared with conventional mAbs. At the moment, they represent the most complex type of sample in the field of therapeutic protein products. To provide the most detailed characterization of this

category of therapeutic proteins, Said and coworkers developed an integrated analytical methodology based on ADCs analysis on the peptide, middle-up, and intact level. This integrated workflow is mainly based on sheathless CE-ESI-MS. It allows the characterization of the protein amino acid sequence, to precisely localize the different conjugation sites, and to estimate the relative conjugation levels for each site and obtain the glycoprofile of the protein. Finally, the different species produced from the conjugation reaction and their relative abundance were determined allowing the DAR of the protein to be deduced [116].

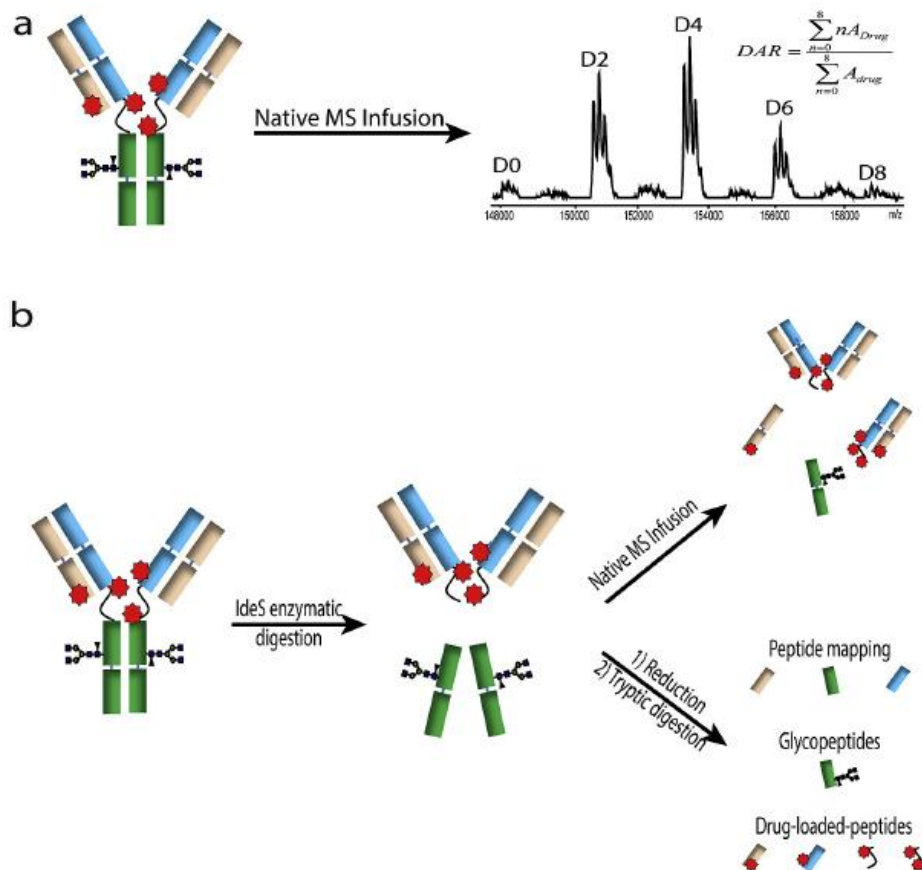


Figure 2.11 : Overview of brentuximab vedotin structural characterization using sheathless CE-MS. (a) Native MS infusion for average DAR determination and drug loaded distribution assessment, (b) middle-up and bottom-up analysis. Extracted from [116].

Because the ESI ionization yield is significantly lower for intact proteins compared to peptides, the CE-ESI-MS method should profit from the introduction of a more sensitive CE-MS coupling. The characterization of therapeutic proteins on the intact level using CE-MS based analysis still remains a challenge. However, the potential of the applications recently reported is undeniable and further developments are expected in the near future.

2.7. Références bibliographiques

1. Elgundi, Z., et al., *The state-of-play and future of antibody therapeutics*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2017. **122**: p. 2-19.
2. Hahm, Y.H., et al., *Comparative Glycopeptide Analysis for Protein Glycosylation by Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry: Variation in Glycosylation Patterns of Site-Directed Mutagenized Glycoprotein*. International Journal of Analytical Chemistry, 2018. p. 10.
3. Grilo, A.L. and A. Mantalaris, *The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market*. Trends in Biotechnology, 2019. **37**(1): p. 9-16.
4. Sandra, K., et al., *The versatility of heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography in monoclonal antibody clone selection*. Journal of Chromatography A, 2017. **1523**: p. 283-292.
5. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates*. Nat Rev Drug Discov, 2017.
6. Jooss, K., et al., *Two-dimensional capillary zone electrophoresis-mass spectrometry for the characterization of intact monoclonal antibody charge variants, including deamidation products*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017. **409**(26): p. 6057-6067.
7. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 345-352.
8. Montacir, O., et al., *Comparability study of Rituximab originator and follow-on biopharmaceutical*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017. **140**: p. 239-251.
9. Pisupati, K., et al., *A Multidimensional Analytical Comparison of Remicade and the Biosimilar Remsima*. Analytical Chemistry, 2017. **89**(9): p. 4838-4846.
10. D'Atri, V., et al., *Hydrophilic Interaction Chromatography Hyphenated with Mass Spectrometry: A Powerful Analytical Tool for the Comparison of Originator and Biosimilar Therapeutic Monoclonal Antibodies at the Middle-up Level of Analysis*. Analytical Chemistry, 2017. **89**(3): p. 2086-2092.
11. Liu, S., et al., *Comprehensive N-Glycan Profiling of Cetuximab Biosimilar Candidate by NP-HPLC and MALDI-MS*. Plos One, 2017. **12**(1): p. e0170013.
12. Pisupati, K., et al., *Biosimilarity under stress: A forced degradation study of Remicade® and Remsima™*. mAbs, 2017. **9**(7): p. 1197-1209.
13. Griaud, F., et al., *Identification of multiple serine to asparagine sequence variation sites in an intended copy product of LUCENTIS® by mass spectrometry*. mAbs, 2017. **9**(8): p. 1337-1348.
14. Gahoual, R., et al., *Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products*. Journal of Chromatography B, 2016. **1032**: p. 61-78.
15. Fekete, S., et al., *Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(1): p. 480-507.
16. Hjerten, S., *High performance electrophoresis - the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography, 1983. **(270)**: p. 1-6.
17. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries*. Analytical Chemistry, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
18. Iwamoto, N., et al., *Verification between Original and Biosimilar Therapeutic Antibody Infliximab Using nSMOL Coupled LC-MS Bioanalysis in Human Serum*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2018. **19**(6): p. 495-505.
19. Kopp, M.R.G. and P. Arosio, *Microfluidic Approaches for the Characterization of Therapeutic Proteins*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. **107**(5): p. 1228-1236.
20. Gahoual, R., et al., *Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*. Mabs, 2013. **5**(3): p. 479-490.
21. Biacchi, M., et al., *Top-down and middle-down approach by fraction collection enrichment using off-line capillary electrophoresis – mass spectrometry coupling: Application to*

- monoclonal antibody Fc/2 charge variants*. Journal of Chromatography A, 2017. **1498**: p. 120-127.
22. Belov, A.M., et al., *Analysis of Proteins, Protein Complexes, and Organellar Proteomes Using Sheathless Capillary Zone Electrophoresis - Native Mass Spectrometry*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2017. **28**(12): p. 2614-2634.
 23. *Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products*, European Medicine Agency. 2016.
 24. Shi, Y., Z. Li, and J. Lin, *Advantages of CE-SDS over SDS-PAGE in mAb purity analysis*. Analytical Methods, 2012. **4**(6): p. 1637-1642.
 25. Szabo, Z., et al., *Rapid High-Resolution Characterization of Functionally Important Monoclonal Antibody N-Glycans by Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(13): p. 5329-5336.
 26. Cooper, B.T., R.D. Sanzgiri, and S.B. Maxey, *Probing the conformational behavior of a monoclonal antibody with surfactant affinity capillary electrophoresis (SurfACE)*. Analyst, 2012. **137**(24): p. 5777-5784.
 27. Bunz, S.C., E. Rapp, and C. Neuss, *Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry of APTS-Labeled Glycans for the Identification of Unknown Glycan Species in Capillary Electrophoresis/Laser-Induced Fluorescence Systems*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(21): p. 10218-10224.
 28. Hamm, M., Y. Wang, and R.R. Rustandi, *Characterization of N-Linked Glycosylation in a Monoclonal antibody Produced in NSO Cells Using Capillary Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence Detection*. Pharmaceuticals, 2013. **6**(3): p. 393-406.
 29. Szekrényes, Á., et al., *Multi-Site N-glycan mapping study 1: Capillary electrophoresis – laser induced fluorescence*. mAbs, 2015: p. 1-9.
 30. Reusch, D., et al., *Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 1: Separation-based methods*. Mabs, 2015. **7**(1): p. 167-179.
 31. Varadi, C., C. Lew, and A. Guttman, *Rapid Magnetic Bead Based Sample Preparation for Automated and High Throughput N-Glycan Analysis of Therapeutic Antibodies*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(12): p. 5682-5687.
 32. Wang, T., et al., *Analysis and characterization of aggregation of a therapeutic Fc-fusion protein*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **72**: p. 59-64.
 33. Wacker, C., et al., *Glycosylation profiles of therapeutic antibody pharmaceuticals*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. **79**(3): p. 503-507.
 34. Michels, D.A., et al., *Fluorescent Derivatization Method of Proteins for Characterization by Capillary Electrophoresis- Sodium Dodecyl Sulfate with Laser-Induced Fluorescence Detection*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(15): p. 5963-5971.
 35. Michels, D.A., M. Parker, and O. Salas-Solano, *Quantitative impurity analysis of monoclonal antibody size heterogeneity by CE-LIF: Example of development and validation through a quality-by-design framework*. Electrophoresis, 2012. **33**(5): p. 815-826.
 36. Le, L.N., et al., *Profiling Antibody Drug Conjugate Positional Isomers: A System-of-Equations Approach*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(17): p. 7479-7486.
 37. Hapuarachchi, S., et al., *Use of capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate to monitor disulfide scrambled forms of an Fc fusion protein during purification process*. Analytical Biochemistry, 2011. **414**(2): p. 187-195.
 38. Xie, P.P., et al., *Elucidating the effects of pH shift on IgG1 monoclonal antibody acidic charge variant levels in Chinese hamster ovary cell cultures*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016. **100**(24): p. 10343-10353.
 39. Moritz, B., et al., *Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies*. Journal of Chromatography B, 2015. **983–984**: p. 101-110.
 40. Beck, A., et al., *Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(2): p. 715-736.

41. Guiotto, C., et al., *Switching from infliximab originator to a first biosimilar is safe and effective. Results of a case-control study with drug levels and antibodies evaluation.* Digestive and Liver Disease, 2019. **51**(8): p. 1117-1122.
42. Yang, J.C., et al., *Efficacy and Safety of Anti-cancer Biosimilars Compared to Reference Biologics in Oncology: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.* Biodrugs, 2019. **33**(4): p. 357-371.
43. Misra, S.K., et al., *Compensated Hydroxyl Radical Protein Footprinting Measures Buffer and Excipient Effects on Conformation and Aggregation in an Adalimumab Biosimilar.* Aaps Journal, 2019. **21**(5): p. 9.
44. Glover, Z.W.K., et al., *Compatibility and stability of pertuzumab and trastuzumab admixtures in i.v. infusion bags for coadministration.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. **102**(3): p. 794-812.
45. Visser, J., et al., *Physicochemical and Functional Comparability Between the Proposed Biosimilar Rituximab GP2013 and Originator Rituximab.* Biodrugs, 2013. **27**(5): p. 495-507.
46. Yin, S., et al., *Characterization of Therapeutic Monoclonal Antibodies Reveals Differences Between In Vitro and In Vivo Time-Course Studies.* Pharmaceutical Research, 2013. **30**(1): p. 167-178.
47. Szekely, A., et al., *Multicapillary SDS-gel electrophoresis for the analysis of fluorescently labeled mAb preparations: A high throughput quality control process for the production of QuantiPlasma and PlasmaScan mAb libraries.* Electrophoresis, 2014. **35**(15): p. 2155-2162.
48. Dada, O.O., et al., *Characterization of acidic and basic variants of IgG1 therapeutic monoclonal antibodies based on non-denaturing IEF fractionation.* Electrophoresis, 2015. **36**(21-22): p. 2695-2702.
49. Cherkaoui, S., et al., *Tracking of antibody reduction fragments by capillary gel electrophoresis during the coupling to microparticles surface.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. **53**(2): p. 172-178.
50. Gerster, A., et al., *A simple method to determine IgG light chain to heavy chain polypeptide ratios expressed by CHO cells.* Biotechnology Letters, 2016. **38**(12): p. 2043-2049.
51. Li, W., et al., *Identification and characterization of monoclonal antibody fragments cleaved at the complementarity determining region using orthogonal analytical methods.* Journal of Chromatography B, 2017. **1048**: p. 121-129.
52. Kubota, K., et al., *Identification and characterization of a thermally cleaved fragment of monoclonal antibody-A detected by sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017. **140**: p. 98-104.
53. Yagi, Y., et al., *Application of Microchip Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate for the Evaluation of Change of Degradation Species of Therapeutic Antibodies in Stability Testing.* Analytical Sciences, 2014. **30**(4): p. 483-488.
54. Chang, L.-C., *The biosimilar pathway in the USA: An analysis of the innovator company and biosimilar company perspectives and beyond.* Journal of Food and Drug Analysis, 2019. **27**(3): p. 671-678.
55. Smith, M.T., et al., *Establishment and validation of a microfluidic capillary gel electrophoresis platform method for purity analysis of therapeutic monoclonal antibodies.* ELECTROPHORESIS, 2017. **38**(9-10): p. 1353-1365.
56. Reusch, D., et al., *Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 2: Mass spectrometric methods.* Mabs, 2015. **7**(4): p. 732-742.
57. Brown, K.A., et al., *Rapid characterization of structural and functional similarity for a candidate bevacizumab (Avastin) biosimilar using a multipronged mass-spectrometry-based approach.* Drug Testing and Analysis, 2019. **11**(8): p. 1207-1217.
58. Jarvas, G., et al., *Characterization of a Porous Nano-electrospray Capillary Emitter at Ultra-low Flow Rates.* Journal of Chromatographic Science, 2016. **55**(1): p. 47-51.
59. Hjerten, S. and M.D. Zhu, *Adaptation of the equipment for high performance electrophoresis to isoelectric focusing.* Journal of Chromatography, 1985. **346**(11): p. 265-270.

60. Michels, D.A., et al., *Charge Heterogeneity of Monoclonal Antibodies by Multiplexed Imaged Capillary Isoelectric Focusing Immunoassay with Chemiluminescence Detection*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(12): p. 5380-5386.
61. Lin, J., Q.Q. Tan, and S.X. Wang, *A high-resolution capillary isoelectric focusing method for the determination of therapeutic recombinant monoclonal antibody*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(14): p. 1696-1702.
62. Suba, D., Z. Urbanyi, and A. Salgo, *Capillary isoelectric focusing method development and validation for investigation of recombinant therapeutic monoclonal antibody*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. **114**: p. 53-61.
63. Salas-Solano, O., et al., *Intercompany Study to Evaluate the Robustness of Capillary Isoelectric Focusing Technology for the Analysis of Monoclonal Antibodies*. Chromatographia, 2011. **73**(11-12): p. 1137-1144.
64. Kinoshita, M., et al., *Quality assurance of monoclonal antibody pharmaceuticals based on their charge variants using microchip isoelectric focusing method*. Journal of Chromatography A, 2013. **1309**: p. 76-83.
65. Maeda, E., et al., *Charge heterogeneity of a therapeutic monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic antitumor antibiotic, calicheamicin*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(45): p. 7164-7171.
66. Salas-Solano, O., et al., *Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: An interlaboratory study*. Journal of Separation Science, 2012. **35**(22): p. 3124-3129.
67. van den Bremer, E.T.J., et al., *Human IgG is produced in a pro-form that requires clipping of C-terminal lysines for maximal complement activation*. mAbs, 2015. **7**(4): p. 672-680.
68. Meert, C.D., et al., *Characterization of Antibody Charge Heterogeneity Resolved by Preparative Immobilized pH Gradients*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(9): p. 3510-3518.
69. Wheeler, T.D., et al., *Microchip Zone Electrophoresis for High-Throughput Analysis of Monoclonal Antibody Charge Variants*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(11): p. 5416-5424.
70. Bonn, R., et al., *CIEF method optimization: Development of robust and reproducible protein reagent characterization in the clinical immunodiagnostic industry*. Electrophoresis, 2013. **34**(6): p. 825-832.
71. Valliere-Douglass, J.F., et al., *Solid-State mAbs and ADCs Subjected to Heat-Stress Stability Conditions can be Covalently Modified with Buffer and Excipient Molecules*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. **104**(2): p. 652-665.
72. Zhu, G., et al., *A rapid CIEF-ESI-MS/MS method for host cell protein analysis of a recombinant human monoclonal antibody*. Talanta, 2012. **98**: p. 253-256.
73. Tamizi, E. and A. Jouyban, *The potential of the capillary electrophoresis techniques for quality control of biopharmaceuticals-A review*. Electrophoresis, 2015. **36**(6): p. 831-858.
74. Zhao, S.S. and D.D.Y. Chen, *Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics*. Electrophoresis, 2014. **35**(1): p. 96-108.
75. Fekete, S., et al., *Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2013. **42**: p. 74-83.
76. El Deeb, S., et al., *Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis*. Electrophoresis, 2014. **35**(1): p. 170-189.
77. Creamer, J.S., N.J. Oborny, and S.M. Lunte, *Recent advances in the analysis of therapeutic proteins by capillary and microchip electrophoresis*. Analytical Methods, 2014. **6**(15): p. 5427-5449.
78. Dotz, V., et al., *Mass spectrometry for glycosylation analysis of biopharmaceuticals*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015. **73**: p. 1-9.
79. Cao, J.Z., et al., *Charge profiling and stability testing of biosimilar by capillary isoelectric focusing*. Electrophoresis, 2014. **35**(10): p. 1461-1468.
80. Wu, Z.G., et al., *Structural Characterization of a Recombinant Fusion Protein by Instrumental Analysis and Molecular Modeling*. Plos One, 2013. **8**(3).

81. Anderson, C.L., Y. Wang, and R.R. Rustandi, *Applications of imaged capillary isoelectric focussing technique in development of biopharmaceutical glycoprotein-based products*. *Electrophoresis*, 2012. **33**(11): p. 1538-1544.
82. Michels, D., O. Salas-Solano, and C. Felten, *Imaged Capillary Isoelectric Focusing for Charge-Variant Analysis of Biopharmaceuticals*. *BioProcess International*, 2011. **9**: p. 48-53.
83. He, Y., et al., *Analysis of Identity, Charge Variants, and Disulfide Isomers of Monoclonal Antibodies with Capillary Zone Electrophoresis in an Uncoated Capillary Column*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(8): p. 3222-3230.
84. He, Y., et al., *Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary*. *Journal of Separation Science*, 2011. **34**(5): p. 548-555.
85. Gassner, A.L., S. Rudaz, and J. Schappler, *Static coatings for the analysis of intact monoclonal antibody drugs by capillary zone electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2013. **34**(18): p. 2718-2724.
86. Han, H.L., E. Livingston, and X.Y. Chen, *High Throughput Profiling of Charge Heterogeneity in Antibodies by Microchip Electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(21): p. 8184-8191.
87. Espinosa-de la Garza, C.E., et al., *Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2013. **34**(8): p. 1133-1140.
88. Balaguer, E., et al., *Glycoform characterization of erythropoietin combining glycan and intact protein analysis by capillary electrophoresis electrospray time-of-flight mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2006. **27**(13): p. 2638-2650.
89. Taichrib, A., M. Pioch, and C. Neuss, *Toward a screening method for the analysis of small intact proteins by CE-ESI-TOF MS*. *Electrophoresis*, 2012. **33**(9-10): p. 1356-1366.
90. Katayama, H., Y. Ishihama, and N. Asakawa, *Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers for capillary electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(24): p. 5272-5277.
91. Catai, J.R., et al., *Analysis of recombinant human growth hormone by capillary electrophoresis with bilayer-coated capillaries using UV and MS detection*. *Journal of Chromatography B*, 2007. **852**(1-2): p. 160-166.
92. Haselberg, R., G.J. de Jong, and G.W. Somsen, *Capillary electrophoresis-mass spectrometry of intact basic proteins using Polybrene-dextran sulfate-Polybrene-coated capillaries: System optimization and performance*. *Analytica Chimica Acta*, 2010. **678**(1): p. 128-134.
93. Dolník, V., *Wall coating for capillary electrophoresis on microchips*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(21-22): p. 3589-3601.
94. Redman, E.A., et al., *Integrated Microfluidic Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Devices with Online MS Detection for the Separation and Characterization of Intact Monoclonal Antibody Variants*. *Analytical Chemistry*, 2015. **87**(4): p. 2264-2272.
95. Dawod, M., N.E. Arvin, and R.T. Kennedy, *Recent advances in protein analysis by capillary and microchip electrophoresis*. *Analyst*, 2017. **142**(11) p. 1847-1866.
96. Redman, E.A., et al., *Characterization of Intact Antibody Drug Conjugate Variants Using Microfluidic Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2016. **88**(4): p. 2220-2226.
97. Shi, Y., et al., *Development and validation of a rapid capillary zone electrophoresis method for determining charge variants of mAb*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012. **906**: p. 63-68.
98. Wu, H., et al., *Weak protein interactions and pH- and temperature-dependent aggregation of human Fc1*. *mAbs*, 2015: **7**(6)p. 1072-1083.
99. Li, S.K., M.R. Liddell, and H. Wen, *Effective electrophoretic mobilities and charges of anti-VEGF proteins determined by capillary zone electrophoresis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011. **55**(3): p. 603-607.
100. Háda, V., et al., *Recent advancements, challenges, and practical considerations in the mass spectrometry-based analytics of protein biotherapeutics: A viewpoint from the biosimilar industry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018. **161**: p. 214-238.

101. Jaccoulet, E., et al., *Capillary electrophoresis for rapid identification of monoclonal antibodies for routine application in hospital*. *Electrophoresis*, 2015. **36**(17): p. 2050-2056.
102. Farrell, A., et al., *Monoclonal antibody sequence assessment using a hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer*. *Analytical Methods*, 2018. **10**(25): p. 3100-3109.
103. Xiao, Z., et al., *A comprehensive approach for evaluating charge heterogeneity in biosimilars*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018. **115**: p. 19-24.
104. Zhao, Y.Y., et al., *Charge Variants of an Avastin Biosimilar Isolation, Characterization, In Vitro Properties and Pharmacokinetics in Rat*. *Plos One*, 2016. **11**(3): p. 13.
105. Olivares, J.A., et al., *Online mass-spectrometric detection for capillary zone electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 1987. **59**(8): p. 1230-1232.
106. Kleparnik, K., *Recent advances in combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: Methodology and theory*. *Electrophoresis*, 2015. **36**(1): p. 159-178.
107. Busnel, J.M., et al., *High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Coupling a Porous Sheathless Interface with Transient-Isotachopheresis*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(22): p. 9476-9483.
108. Wojcik, R., et al., *Simplified capillary electrophoresis nanospray sheath-flow interface for high efficiency and sensitive peptide analysis*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010. **24**(17): p. 2554-2560.
109. Zhong, X.F., E.J. Maxwell, and D.D.Y. Chen, *Mass Transport in a Micro Flow-Through Vial of a Junction-at-the-Tip Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Interface*. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(12): p. 4916-4923.
110. Wilm, M.S. and M. Mann, *Electrospray and Taylor cone theory, Does beam of macromolecules at last*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 1994. **136**(2-3): p. 167-180.
111. Hajba, L., et al., *On the glycosylation aspects of biosimilarity*. *Drug Discovery Today*, 2018. **23**(3): p. 616-625.
112. Biacchi, M., et al., *Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface*. *Electrophoresis*, 2014. **35**(20): p. 2986-2995.
113. Gennaro, L.A., O. Salas-Solano, and S. Ma, *Capillary electrophoresis–mass spectrometry as a characterization tool for therapeutic proteins*. *Analytical Biochemistry*, 2006. **355**(2): p. 249-258.
114. Gahoual, R., et al., *Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(18): p. 9074-9081.
115. Gahoual, R., et al., *Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry*. *Mabs*, 2014. **6**(6): p. 1464-1473.
116. Said, N., et al., *Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis – Tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method*. *Analytica Chimica Acta*, 2016. **918**: p. 50-59.
117. Gennaro, L.A. and O. Salas-Solano, *On-line CE-LIF-MS technology for the direct characterization of N-linked glycans from therapeutic antibodies*. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(10): p. 3838-3845.
118. Bunz, S.C., F. Cutillo, and C. Neussuss, *Analysis of native and APTS-labeled N-glycans by capillary electrophoresis/time-of-flight mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013. **405**(25): p. 8277-8284.
119. Gahoual, R., et al., *Comprehensive Multilevel Characterization of Biologics Using Sheathless Capillary Electrophoresis Hyphenated to tandem Mass Spectrometry*. *LCGC North America*, 2015. **13**(4): p. 8-15.
120. Nupur, N., et al., *Assessment of structural and functional similarity of biosimilar products: Rituximab as a case study*. *mAbs*, 2018. **10**(1): p. 143-158.

121. Kammeijer, G.S.M., et al., *Dopant Enriched Nitrogen Gas Combined with Sheathless Capillary Electrophoresis–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry for Improved Sensitivity and Repeatability in Glycopeptide Analysis*. *Analytical Chemistry*, 2016, **88**(11): p. 5849-5856.
122. Vincents, B., et al., *Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding*. *Biochemistry*, 2004. **43**(49): p. 15540-15549.
123. Biacchi, M., et al., *Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS*. *Analytical Chemistry*, 2015. **87**(12): p. 6240-6250.
124. François, Y.-N., et al., *Characterization of cetuximab Fc/2 dimers by off-line CZE-MS*. *Analytica Chimica Acta*, 2016. **908**: p. 168-176.
125. Han, M., et al., *Intact mass analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis—Mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, 2016. **1011**: p. 24-32.
126. Haselberg, R., G.J. de Jong, and G.W. Somsen, *Low-Flow Sheathless Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Sensitive Glycoform Profiling of Intact Pharmaceutical Proteins*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(4): p. 2289-2296.

Au cours de ma thèse, des avancées significatives ont été réalisées dans la caractérisation de biomolécules et de leurs dérivés à l'aide de séparations électrophorétiques. Des miniaturisations de systèmes CE sur micropuce ont permis de séparer des composés en un temps record tout en conservant une efficacité de séparation maximale. De plus, des développements en électrophorèse capillaire à 2 dimensions ont élargi le champ de possibilité qu'offre la CE-MS. La 2D-CE-MS offre une alternative aux conditions restrictives de séparation en termes de volatilité de sels et d'électrolytes supports compatibles à la MS. La première étape permettant l'utilisation de tampons incompatibles avec la MS qui offrent une séparation plus efficace et qui seront éliminés lors du passage à la deuxième dimension, cette fois-ci constituée de BGE compatibles à la MS et qui permet de conserver voire optimiser la séparation effectuée en première dimension.

L'analyse des mAbs et des dérivés tels que les nanobodies, les protéines de fusion ou encore les anticorps monoclonaux bispécifiques a également connu un véritable essor lors de ces 3 dernières années avec des études plus précises aux différents niveaux notamment au niveau de la molécule intacte et du niveau intermédiaire middle-up. De même, l'analyse au niveau peptidique et notamment des N-glycosylations a été largement investiguée et a permis de mettre en lumière des modifications de liaisons entre les unités glycaniques expliquant une différence de conformation tridimensionnelle et donc une disparité de l'efficacité des traitements.

D'autre part, l'optimisation constante des protocoles opératoires mène à une préparation d'échantillon plus rapide et avec des quantités chimiques plus justes afin de limiter l'impact des traitements chimiques qui se répercute sur la conformation et la stabilité des échantillons.

Pour finir, le développement d'instrumentations de plus en plus rapides, robustes et précises en mesure de masse associée à l'expertise grandissante des scientifiques ont permis de récolter des informations structurales plus nombreuses et plus justes.

La somme de toutes ces avancées nous dessine une représentation plus proche du réel du contenu des médicaments ainsi que de la répartition des différents variants présents dans les traitements

Nous avons souhaité regrouper les nouvelles applications entre 2016 et 2018 dans une seconde revue. La partie ci-dessous reprend donc une partie de cette publication à laquelle j'ai contribué notamment pour la caractérisation de biomolécules à l'aide du couplage direct CE-MS.

3. Publication : Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016 - 2018

Antony Lechner, Jeremie Giorgetti, Rabah Gahoual, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François, Journal of Chromatography B, 2019, 1123, 1-17.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.014>

3.1. CE hyphenated with Mass Spectrometry

3.1.1 Technical considerations

The growing need of precise characterization of biotherapeutics implies the constant evolution in separation methods especially with the achievement of additional structural information. As the performance of mass spectrometers improved in term of sensitivity, mass accuracy and scanning frequencies, MS became a key instrumentation for the analysis of biomolecules. The complexity due to the large scale of heterogeneity on mAbs needs to take the sensitivity into account to characterize low amount isoforms. While the different miniaturized electrophoretic modes (CE-SDS, cIEF, CZE) coupled with spectrophotometric detection are already known to be reference methods for mAbs characterization, the main improvements developed these last few years were achieved in the development of CE-MS methods. Since the end of the eighties, instrumental developments have been constantly performed in order to optimized the hyphenation of CE with MS detection using offline or online approaches depending on the nature of the MS sources: electrospray ionization (ESI) and matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) [1]. CE-MS coupling is usually implemented with ESI; however, specific CE-MALDI-MS applications were also described in the literature [2-4]. As the weak acceptance of salts and the need of volatile solvents is known to be primary parameters for CE-MS applications, one of the main issue for CE-MS instrumentation is known to conserve a continuous electric field during CE separation while maintaining a stable spray. This last decades, a way to get around this issue has been to design innovative CE-MS interface geometries. Historical developed CE-MS interfacing systems relied on a conductive sheath-liquid, connected to the outlet electrode of the CE system, continuously injected to maintain the electrical field [5]. Despite a good robustness and an easy setup, regarding the very low amount of sample carried in the separation capillary, the dilution effect due to the sheath-liquid has a negative impact on MS sensitivity. To address this limitation, other geometries have been developed allowing to reduce to the minimum the flow rate or to wholly eliminate the sheath-liquid. Today some commercial CE-MS solutions based on sheath liquid and sheathless interface are already fully described in the literature and commercially available [1]. Nevertheless, regarding direct CE-ESI-MS, the main hurdle quite in common of all papers detailed in

the literature consisted of the incompatibility of classical well known BGEs with MS detection due to the presence of nonvolatile compounds that diminishes drastically the quality of MS data. While some very recent articles describing improvement of CZE-ESI-MS or cIEF-ESI-MS applications for mAbs charge variants characterization [6-8], another recent approach have been developed to reduce BGE impact on CE-ESI-MS detection. Inspired by 2D LC-MS, the group of Prof. Neusüß worked on a promising 2D CE-MS setup, pursuing to provide interference-free mass spectra with electrophoretic separations [9]. This advanced separation technique includes a first dimension which allows to perform a high resolving CE separation with nonvolatile BGEs followed by a second dimension able to fully remove the ESI-interfering components from the analytes prior to MS detection. For this purpose, a mechanical four-port valve with a small volume loop was utilized to lead the analytes from the first dimension to the second one with limited diffusion. The main advantage of this approach is the possibility to perform the 1st dimension in any CE mode (CZE, cIEF, CE-SDS) with classical conditions discussed in previous sections (BGE, coating, additives, etc.). This type of instrumentation has the potential to further increase the level of characterization achieved in a single experiment, but still needs some technical improvements to make it robust and get a marketed solution.

3.1.2. Applications

3.1.2.1. Amino acid sequence characterization

MABs are produced from a biosynthesis process in culture cells from living organisms that could induce some minor differences in the amino acid sequence or PTMs during the maturation phase of the proteins. Moreover, production, packaging and storage conditions of the molecules can also induce some amino acid substitutions or other sort of modifications. Since 2006, Gennaro *et al.* demonstrated the potential of CZE-ESI-MS to obtained the complete characterization of mAbs using a Lys-C digestion combined with HPLC-MS analysis [10]. In 2013, Gahoual *et al.* confirmed the positive impact of sheathless CZE-ESI-MS methods demonstrating the consistent characterization of the amino acid sequence with 100% coverage and some PTMs such as *N*-glycosylations, *N*-terminal glutamic acid cyclization, asparagine deamidations (deaN) ([Figure 2.12](#)), methionine oxidations (oxyM), and aspartic acid isomerization (isoD) in a single analysis [11, 12]. In 2016, Said *et al.* adapted the CZE-ESI-MS method, especially with the optimization of the tryptic digestion protocol, for the characterization of the primary structure of a cysteine-linked ADC. Results revealed the method ability to characterize ADCs primary structure particularly with the location of drug loaded peptides and the estimation of their conjugation level [13]. More recently, some aqueous/aprotic dipolar solvent mixes systems were tested by Dada *et al.* to enhance the peptide mapping on mAbs and ADCs. Authors explained that *N,N*-dimethylacetamide (DMA) and *N,N*-dimethylformamide (DMF) used as BGE allow to have a complete

sequence coverage and improve the separation of peptides with a neutral coated capillary at the expense of time analysis [14]. The results confirmed several advantages of CZE-ESI-MS for the analysis of small hydrophilic di-/tripeptides, large hydrophobic peptides, glycopeptides, and hydrophobic drug-linked peptides.

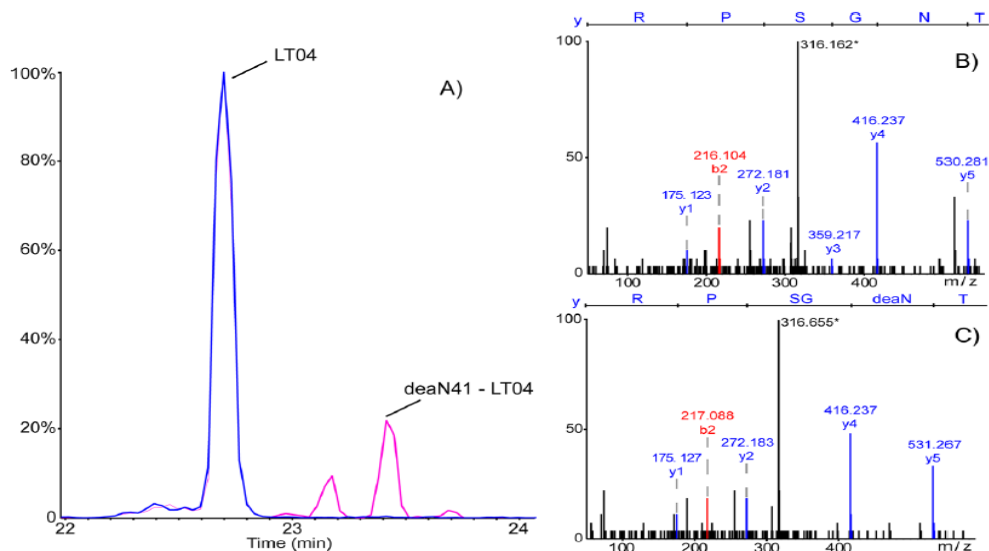


Figure 2.12 : (A) Extracted Ion Electropherogram corresponding to the m/z of peptide LT04 (light chain, position 40–45) and LT06 with deamidated Asp41. Deconvoluted MS/MS spectra corresponding to (B) peptide LT04 and (C) LT04 deamidated Asp41 (deamidation represented by deaN). Extracted from [11]

3.1.2.2. Glycosylation characterization

Glycosylation is a PTM that occurs naturally during excretion of antibodies from the expression system to the extracellular medium. It only represents 2–5% of the total mass of the protein but it is subjected to extensive studies due to its significant influence on effector functions of mAbs [15, 16]. As a consequence, the mAbs glycosylation profile is considered as a CQA and must be thoroughly analyzed [17-19]. For over 10 years, numbers of analytical methods have been developed to better understand the synthesis, roles and consequences of mAbs glycosylations [15, 20, 21]. The last development of CE-MS methods highlighted the attractiveness to characterize and quantify the glycosylation heterogeneity with high accuracy and precision [11]. In 2016, a quantitative twoplex glycan analysis using heavy and light carbon stable isotopes of 2-aminobenzoic acid (2-AA) labelling have been developed to check the quality of different mAbs batches [22]. Glycosylation profiles have been detected and identified with a fluorescence detector on different cetuximab batches. Comparison with orthogonal techniques as HPLC-MS were realized using a released glycan approach. Results showed a good agreement and the reproducibility of the two methods. In 2017, Giorgetti *et al.* evaluated the

CZE-ESI-MS method to perform relative quantitation of *N*-glycan species for mAbs characterization at the peptides level [23]. Validation in terms of robustness and reproducibility were demonstrated through the relative quantitation of glycosylation profiles for ten different mAbs and two biosimilar produced in different cell lines. A systematic comparison was performed with hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) reference method, obtaining very similar glycosylation pattern. Some glycan differences can also be provided from a difference of linkage between two glycosylation units. Sialic acid linkages differences have been observed by Kammeijer *et al.* using CZE-ESI-MS [24]. Although identical fragmentation patterns obtained by collision induced dissociation (CID), authors detailed the selective analysis of α 2,3 and α 2,6 –sialylated glycopeptides with no additional sample preparation. The different migration behavior between the two moieties was found to correlate with differences of pKa values which is consistent with the selectivity of the separation. In 2018, Chen *et al.* worked on the glycoprofiling of the NIST mAb with a mCE-MS interface [25]. Authors proposed a quick solution for intact mAb characterization with quantitative results on protein variants. They obtained a partial separation and the relative quantitation of 18 variants including some glycolytic modifications. In the last few months of 2018, Jooß *et al.* described a method based on CZE coupled to drift tube ion mobility MS for the analysis of native and APTS-labeled *N*-glycans [26]. In their study, each individual glycan signal separated in CZE exhibited an unexpected high number of peaks observed in the IMS dimension. Among the possible explanations, the type of sialic acid attached to glycans has a significant impact on the IMS heat map.

3.1.2.3. Middle-up analysis

Biopharmaceutics analysis at the bottom-up level involves sample treatments as digestion protocol which is known to potentially induce some artefactual modifications of amino acids implying possible over estimation of PTMs. To avoid or reduce these limitations, optimizations of sample preparation were developed to study mAbs at other levels such as middle-up or intact ones. Middle-up analysis consists of a prior partial and localized mAbs digestion by the mean of specific enzymes and reduction reagents. Obtained fragments, usually larger than 10 kDa, gave the opportunity to focus on specific parts of the mAbs structure with a lower difficulty than intact molecules. The middle-up level has been made possible due to the development of proteolytic enzymes like *Streptococcal endopeptidase* (IdeS) or papain. On contrary to bottom-up level, middle-up strategies allow to enhance the sample preparation protocol by reducing the number of chemical steps and then minimizing modifications induced by digestion.

Due to the limited proteolysis of mAbs which generates significantly larger peptides as compared to classical trypsin or Lys-C digestions, different strategies of online and offline CE-MS coupling have been developed in the last ten years. Biacchi *et al.* detailed an offline CE-MALDI/ESI-MS method for the analysis of Fc/2 and F(ab')₂ fragments produced from the IdeS digestion of cetuximab [27]. They concluded on the baseline separation of Fc/2 lysine variants and the characterization of the *N*-glycosylation sites present on the mAb. In 2016, the same group deepened their study by demonstrating the separation in native conditions of three Fc/2 homo- or heterodimers depending on the presence of a C-terminal lysine [28]. The first study using an online CE-ESI-MS coupling for mAbs separation at middle-up level was described by Han *et al.* in 2016 (Figure 2.13) [29]. Authors demonstrated the baseline separation of HC and LC after reduction of disulfide bridges as well as the complete separation of Fc/2, Fd and LC fragments after IdeS digestion followed by a reduction step. Concerning IdeS digestion, they obtained in less than 20 minutes, a separation of Fc/2 lysine variants and observed mass differences between control, deamidated and oxidized stressed mAbs.

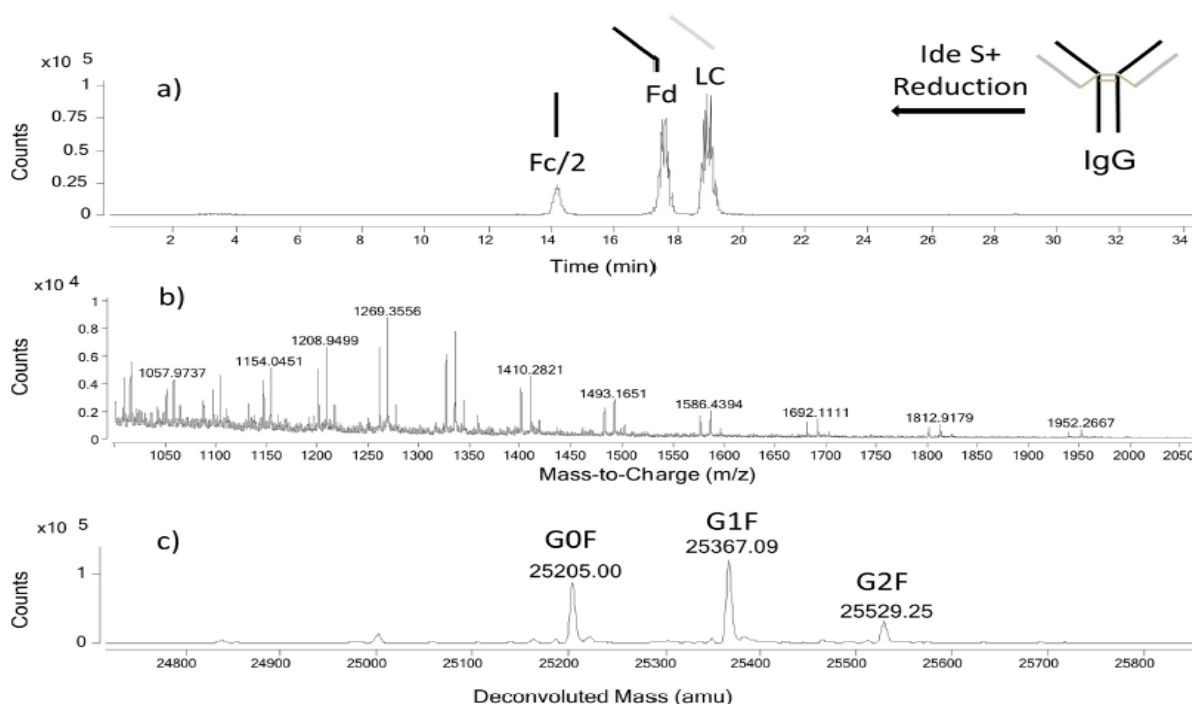


Figure 2.13 : CE-MS analysis of reduced IdeS enzyme digested IgG1. (a) Base peak electropherogram; (b) averaged mass spectrum of Fc/2 peak; (c) deconvoluted mass spectrum showing G0F, G1F, and G2F forms of Fc/2. Sample: 0.5 mg/mL of IgG 1 in 15% acetic acid, 15% acetonitrile. Conditions: capillary, LPA-coated fused silica (360 μ m OD, 50 μ m ID, 70 cm length), outlet etched to 180 μ m OD; electrolyte, 5% acetic acid; sheath liquid, 0.5% formic acid, 50% methanol; injection, 5 s at 50 mbar; separation, 18 kV. Extracted from [29].

Very recently, two major articles were published on the multi-level characterization of diverse mAbs combining middle-up and intact strategies using CZE-ESI-MS methods. Belov and coworkers developed

CZE-ESI-MS methods to study different IgG1 at the intermediate level with an IdeS digestion but no reduction step [8]. CE conditions consisted of the use of a 1-(4-iodobutyl) 4-aza-1-azoniabicyclo[2,2,2] octane iodide (M7C4I) positively coated capillary with a BGE composed of 50 % ethanol added to 1 % formic acid and a voltage of 20 kV. They obtained a separation of Fc/2 and F(ab)'2 fragments in less than 60 minutes, with the characterization of modifications such as oxidations and deamidations. In addition, they studied the same samples with a combination of IdeS digestion and a TCEP reduction step. They obtained separation of respectively LC, Fc/2 and Fd fragments in nearly 40 minutes. Both experiments allowed to characterize different glycoforms on the Fc/2 fragments. The same year, Somsen's team succeed in separating Fc/2 glycoforms by varying BGE [30]. Neutral LPA capillary has been employed due to the near zero EOF generated during the separation and to avoid protein adsorption on the capillary wall. They discussed the effect of acetic acid concentration as BGE. A complete characterization of the different Fc/2 variants has been detailed with the glycan and C-terminal Lys variability and the observation of other PTMs as deamidation.

3.1.2.4. Intact protein analysis

Analysis of intact protein, which is considered particularly challenging, represents the absolute way of protein characterization. Indeed, due to the reduction or even the absence of sample preparation which can introduce artefactual modifications, intact protein analysis has the advantage to be more representative of the actual sample. However, due to the high masses and the complexity of mAbs, intact level analysis of these therapeutics is still a challenge for analytical sciences. CE-MS coupling has been described as a promising technique for the characterization of intact proteins [31] and then has been applied particularly these last years in the field of biotherapeutics [32]. In 2014, Biacchi *et al.* detailed the first separation of intact mAbs using an offline CZE-MALDI-MS coupling [3]. The offline property of the CE-MS coupling allows the authors to work with salt-concentrated and non-volatile BGE enabling them to obtain the separation and MS analysis of intact charge variants of trastuzumab. Unfortunately, limitation of MALDI-MS resolution for molecules up to 100 kDa did not allow the measurement of the exact mass of these charge variants. Direct CE-ESI-MS coupling then appears as a solution to avoid this limitation. In 2016, Han *et al.* proposed the separation and identification of free LC contained in IgG1 reference material using CZE-ESI-MS method [29]. The same year, Ramsey's group developed and employed a CE-nanoESI-MS microchip for the analysis of intact infliximab [33]. Molecular weights were determined for five charge variants separated on a 23 cm long separation channel coated with an aminopropylsilane (APS) base layer and covalent modification with polyethylene glycol (PEG). Three major species corresponding to C-terminal lysine variants plus some

minor acidic and basic species have been characterized with an average resolution of 0.80. The same group used this method for the characterization of a lysine-linked ADC [34]. Authors observed the separation of five main species that differed in their respective DAR, which for each DAR displayed the same variant population observed on the unconjugated mAb. They concluded that the CE-nanoESI-MS microchip method demonstrated the possibility of accurately determine the DAR.

In 2017, Belov *et al.* have been the first group to analyze intact mAb by online native CZE-ESI-MS [35]. Working on a sheathless CE-MS interface coupled with an orbitrap mass spectrometer and using neutral polyacrylamide coated capillary, they obtained a partial separation of intact mAbs aggregates. Native condition as 20 mM ammonium acetate pH 8.0 allowed them to reveal predominant forms of the intact mAb, corresponding to 2X-glycosylated, 1X-glycosylated and dimeric structures. They also observed other molecular species of about 101 kDa, presumably corresponding to the mAb with the loss of 2 light chains. The dissociated light chains have been separated as monomeric and dimeric forms. In 2018, the same group worked on another mAb under denaturing conditions and using a positively charged coating capillary (M7C4I) [8]. Optimized BGE condition composed of 10% isopropanol, 0.2% formic acid allows them to report the complete glycosylation profile of the mAb. Three types of mAb glycans populations (2X-glycosylated, 1X-glycosylated and aglycosylated forms) have been observed (*Figure 2.14*).

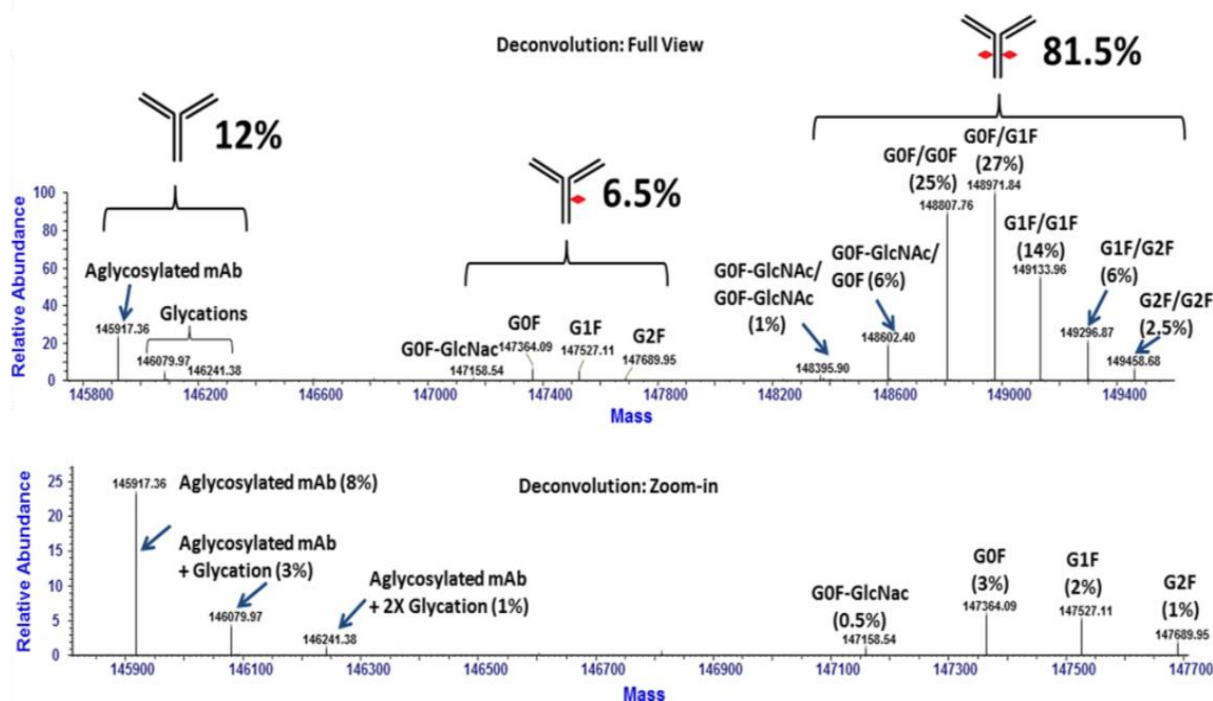


Figure 2.14 : Deconvolution spectrums showing major glycosylation states of the intact mAb. Quantitative ratios of each population of the mAb (2X-glycosylated, 1X-glycosylated, aglycosylated) are specified. Reprinted from [8].

Very soon after this paper, Haselberg *et al.* performed the heterogeneity assessment of intact trastuzumab and ustekinumab using sheathless CE-MS interface coupled with a Q-TOF MS instrument [30]. For the two mAbs, partial separation of charge variants has been obtained using 10% acetic acid BGE and a neutral capillary coating consisting of a hydrophobic layer to protect siloxanes from hydrolysis, and a second layer of polyacrylamide providing a hydrophilic surface. Each peak appeared to consist of variants mixtures with different properties depending of the nature of the mAb. The same year, a third paper about intact mAb separation using sheathless CZE-ESI-MS has been published by Giorgetti *et al.* [7]. Using 3% acetic acid BGE, sample buffer of 30% methanol 1% formic acid and a PEI positively coated capillary, separation of three world-wide health authorities approved mAbs (rituximab, palivizumab and trastuzumab), have been evaluated. CZE-ESI-MS analysis of these three mAbs showed partial separation obtained in less than 20 min allowing identification of mAbs isoforms. For each mAb, 2X-glycosylated and 1X-glycosylated structures have been identified and separated. Concerning basic and acidic variants, minor differences between 0 and 2 Da have been observed suggesting potential iso-Asp modification and dea_N. However, mass accuracy of the mass spectrometer added to separation performances, did not allow to conclude without ambiguity on the nature of these modification.

As a well-known property, MS-based methods present the main drawback to be intolerant to classical salted and non-volatile BGE reducing the possibility of optimizing CE methods. Indeed, in a comparison between reference CZE-UV and CZE-ESI-MS methods using different BGE, obtained electropherograms fitted well but lower resolutions were obtained for CZE-ESI-MS [7]. In 2017, Jooß *et al.* described a CZE-CZE-MS method for the characterization of intact mAbs charge variants [36]. Authors achieved interference-free, highly precise mass data (deviation less than 1 Da) of trastuzumab charge variants. The mass accuracy obtained (< ppm) were discussed regarding both measured and calculated masses. The same group confirmed the advantages of their 2D CE-MS system with the development of a cIEF-CZE-MS for the characterization of intact mAbs [37]. After focusing step, the analytes were mobilized through two external detectors (UV and C⁴D) to select precisely analytes inside the transfer loop and then to run the CZE dimension prior to MS detection. They established a “multiple heart-cut” approach considerably reducing the analysis time allowing them to perform the transfer of up to six analytes from a single cIEF run and the analysis via CZE-MS in less than 3h. Application on the MS characterization of intact mAb charge variants enabled them to detect a mass difference of approximately 2 Da between two variants. In 2018, the same group deepened the development of the 2D CE-MS coupling to identify low abundance charge variants of trastuzumab using icIEF-CZE-MS [38]. icIEF first dimension can be monitored in real-time thanks to the whole-column detection. Accurate masses were attributed to deamidation, formation of succinimide or cyclisation of

N-terminal glutamic acid for the main acidic and basic variants. Despite the difficulty to achieve online cIEF-ESI-MS application due to CE experimental condition, Dai *et al.* reported a new online cIEF-ESI-MS method for mAb charge variant analysis using an electrokinetically pumped sheath-flow nanospray ion source with pressure-assisted chemical mobilization [6]. Many critical parameters and reagents have been optimized including MS-friendly anolyte and catholyte, a glycerol enhanced sample mixture or ampholyte. Charge variant profiles of trastuzumab, bevacizumab, infliximab and cetuximab, obtained using cIEF-MS method, were corroborated by icIEF-UV analysis. Moreover, charge variants of these mAbs were characterized using the online intact MS data. More recently, the same group applied their cIEF-ESI-MS method for the in-depth characterization of cetuximab charge heterogeneity [39].

4. Conclusion

A la vue de la complexité intrinsèque des molécules basées sur les mAbs, une grande variété de techniques analytiques telles que la chromatographie, l'électrophorèse ou encore la spectrométrie de masse ont été développées. Une caractérisation fine de ces protéines thérapeutiques a pu être obtenue à l'aide de ces outils pour s'assurer de la qualité de ces médicaments. Par conséquent, le phénomène physico-chimique impliqué dans la séparation en CE a démontré, pour de nombreuses applications, un avantage unique pour l'analyse des mAbs. Les modes de séparation conventionnels en CE comme la CZE, la CE-SDS ou la cIEF sont particulièrement pertinents pour caractériser les variants de taille et de charge des mAbs grâce à des caractéristiques propres à la CE qui fournissent des séparations efficaces et très résolutive. En outre, les différentes études inter-laboratoires confirment sans ambiguïté la fiabilité des analyses, en plus de la robustesse fournie par les méthodes analytiques basées sur la CE. Par conséquent, la CE est progressivement devenue l'une des techniques de référence dans l'industrie biopharmaceutique pour évaluer la pureté et la stabilité des mAbs. En même temps, il a été démontré que le couplage CE-MS était pertinent pour accéder à de précieux renseignements structurels comme les séquences d'acides aminés, les glycosylations, les PTMs et les structures d'ordre supérieur.

Au cours de ces dernières années, le développement de méthodologies analytiques impliquant la séparation en CE n'a pas diminué, ce qui est souligné par le nombre important d'articles présents dans la littérature et nommés tout au long de ce chapitre. De plus, il est important de noter que chaque mode de séparation de CE est actuellement exploré pour le développement de méthodes dédiées à la caractérisation des mAbs et de leurs dérivés. L'intérêt majeur de ces développements est d'enrichir notre compréhension de la sélectivité de la séparation qui s'avère pertinente pour distinguer plusieurs

types de micro-hétérogénéités. En outre, l'introduction de molécules innovantes basées sur les mAbs comme les ADCs contribue à la dynamique de développement de la méthode CE.

La mise en œuvre du couplage CE-ESI-MS a également bénéficié de divers progrès instrumentaux. En ce qui concerne cet aspect, l'émergence récente de la 2D CE-MS représente une percée significative. En effet, le système 2D CE-MS permet d'améliorer potentiellement la séparation et la capacité de pointe de la même manière que la chromatographie liquide 2D. L'introduction des technologies microfluidiques a également montré la possibilité de réaliser des analyses à court terme tout en maintenant une haute résolution due à la réduction des effets de diffusion, par exemple pour effectuer un screening à haut débit des mAbs et des ADCs.

Les perspectives d'avenir concernant les analyses de mAbs et leurs dérivés par CE suggèrent que la CE-MS possède le potentiel le plus important en raison de l'orthogonalité complète des deux techniques et des performances de la génération actuelle d'instruments MS à haute résolution. Aussi, en exécutant une CZE et en utilisant un BGE compatible MS sur la deuxième dimension, la CE-MS 2D permet d'exécuter un mode de séparation précédemment incompatible avec le couplage MS comme la CE-SDS ou la cIEF sur la première dimension. Cet aspect de la CE-MS 2D est particulièrement prometteur car il enrichit de manière drastique l'applicabilité de la CE-MS, c'est pourquoi d'autres développements s'orientent dans ce sens dans un proche avenir. Par exemple, il est possible d'envisager l'utilisation d'une analyse CE spécifique comme la CE d'affinité. L'application de la CE d'affinité en conjonction avec la MS est particulièrement attrayante pour la caractérisation des mAbs. Au cours de leur vie, les mAbs interagissent avec des antigènes cibles en plus de plusieurs types de protéines qui influencent leurs fonctions effectrices et/ou leurs propriétés pharmacologiques. Ainsi, en distinguant les complexes protéine-protéine/protéine-ligand et en déterminant les constantes d'affinité en utilisant leurs mobilités électrophorétiques respectives, il pourrait être possible de corréliser les modifications structurales avec l'affinité des mAbs, ouvrant la voie à l'analyse structure-fonction. Le développement d'expériences en CE-MS d'affinité adaptées aux mAbs représente un défi majeur mais l'introduction de la CE-MS 2D change clairement les cartes sur cet aspect.

Enfin, comme l'analyse en MS native est souvent limitée par l'absence de séparation en amont de l'analyse MS, le développement de l'analyse en CE-MS pourrait améliorer considérablement la sensibilité et élargir l'applicabilité de la MS en conditions natives. Ceci pourrait être appliqué en particulier pour l'analyse de mélanges complexes tout en maintenant les mAbs thérapeutiques dans un état aussi proche que possible de la protéine administrée au patient.

5. Références bibliographiques

1. Neusüß, C., et al., *Chapter 12 - Coupling of Capillary Electromigration Techniques to Mass Spectrometry A2 - Poole, Colin F*, in *Capillary Electromigration Separation Methods*. 2018, Elsevier. p. 293-311.
2. Busnel, J.-M., et al., *Iontophoretic Fraction Collection for Coupling Capillary Zone Electrophoresis with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(10): p. 3867-3872.
3. Biacchi, M., et al., *Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface*. *Electrophoresis*, 2014. **35**(20): p. 2986-2995.
4. Vannatta, M.W., C.D. Whitmore, and N.J. Dovichi, *CE-MALDI interface based on inkjet technology*. *Electrophoresis*, 2009. **30**(23): p. 4071-4074.
5. Olivares, J.A., et al., *Online mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 1987. **59**(8): p. 1230-1232.
6. Dai, J., et al., *Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry Method for the Separation and Online Characterization of Intact Monoclonal Antibody Charge Variants*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(3): p. 2246-2254.
7. Giorgetti, J., et al., *Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry*. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2018. **25**(3): p. 324-332.
8. Belov, A.M., et al., *Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis – mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2018. **39**(16): p. 2069-2082.
9. Schlecht, J., K. Jooß, and C. Neusüß, *Two-dimensional capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-CE-MS): coupling MS-interfering capillary electromigration methods with mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018. **410**(25) p.6353-6359.
10. Gennaro, L.A., O. Salas-Solano, and S. Ma, *Capillary electrophoresis–mass spectrometry as a characterization tool for therapeutic proteins*. *Analytical Biochemistry*, 2006. **355**(2): p. 249-258.
11. Gahoual, R., et al., *Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(18): p. 9074-9081.
12. Gahoual, R., et al., *Independent highly sensitive characterization of asparagine deamidation and aspartic acid isomerization by sheathless CZE-ESI-MS/MS*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2016. **51**(2): p. 150-158.
13. Said, N., et al., *Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis – Tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method*. *Analytica Chimica Acta*, 2016. **918**: p. 50-59.
14. Dada, O.O., et al., *High-Resolution Capillary Zone Electrophoresis with Mass Spectrometry Peptide Mapping of Therapeutic Proteins: Peptide Recovery and Post-translational Modification Analysis in Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates*. *Analytical Chemistry*, 2017. **89**(21): p. 11236-11242.
15. Beck, A., et al., *Trends in Glycosylation, Glycoanalysis and Glycoengineering of Therapeutic Antibodies and Fc-Fusion Proteins*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2008. **9**(6): p. 482-501.
16. Jefferis, R., *Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2009. **30**(7): p. 356-362.
17. Reusch, D. and M.L. Tejada, *Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes*. *Glycobiology*, 2015. **25**(12): p. 1325-1334.

18. Ayoub, D., et al., *Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques*. *Mabs*, 2013. **5**(5): p. 699-710.
19. Schiestl, M., et al., *Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals*. *Nature Biotechnology*, 2011. **29**: p. 310.
20. Beck, A., et al., *Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013. **48**: p. 81-95.
21. Banazadeh, A., et al., *Recent advances in mass spectrometric analysis of glycoproteins*. *Electrophoresis*, 2017. **38**(1): p. 162-189.
22. Varadi, C., et al., *Quantitative twoplex glycan analysis using C-12(6) and C-13(6) stable isotope 2-aminobenzoic acid labelling and capillary electrophoresis mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. **408**(30): p. 8691-8700.
23. Giorgetti, J., et al., *Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis – Mass spectrometry: Assessment and method validation*. *Talanta*, 2018. **178**(Supplement C): p. 530-537.
24. Kammeijer, G.S.M., et al., *Sialic acid linkage differentiation of glycopeptides using capillary electrophoresis – electrospray ionization – mass spectrometry*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 3733.
25. Chen, C.H., et al., *Intact NIST monoclonal antibody characterization-Proteoforms, glycoforms-Using CE-MS and CE-LIF*. *Cogent Chemistry*, 2018. **4**(1).
26. Jooß, K., et al., *Capillary zone electrophoresis coupled to drift tube ion mobility-mass spectrometry for the analysis of native and APTS-labeled N-glycans*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019. **411**(4) p. 6255-6264.
27. Biacchi, M., et al., *Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS*. *Analytical Chemistry*, 2015. **87**(12): p. 6240-6250.
28. François, Y.-N., et al., *Characterization of cetuximab Fc/2 dimers by off-line CZE-MS*. *Analytica Chimica Acta*, 2016. **908**: p. 168-176.
29. Han, M., et al., *Intact mass analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis—Mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, 2016. **1011**: p. 24-32.
30. Haselberg, R., et al., *Heterogeneity assessment of antibody-derived therapeutics at the intact and middle-up level by low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2018. **1044**: p. 181-190.
31. Voeten, R.L.C., et al., *Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(3): p. 1464-1481.
32. Gahoual, R., et al., *Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products*. *Journal of Chromatography B*, 2016. **1032**: p. 61-78.
33. Redman, E.A., et al., *Integrated Microfluidic Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Devices with Online MS Detection for the Separation and Characterization of Intact Monoclonal Antibody Variants*. *Analytical Chemistry*, 2015. **87**(4): p. 2264-2272.
34. Redman, E.A., et al., *Characterization of Intact Antibody Drug Conjugate Variants Using Microfluidic Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2016. **88**(4): p. 2220-2226.
35. Belov, A.M., et al., *Analysis of Proteins, Protein Complexes, and Organellar Proteomes Using Sheathless Capillary Zone Electrophoresis - Native Mass Spectrometry*. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 2017. **28**(12): p. 2614-2634.
36. Jooß, K., et al., *Two-dimensional capillary zone electrophoresis–mass spectrometry for the characterization of intact monoclonal antibody charge variants, including deamidation products*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017. **409**(26): p. 6057-6067.
37. Hühner, J., K. Jooß, and C. Neusüß, *Interference-free mass spectrometric detection of capillary isoelectric focused proteins, including charge variants of a model monoclonal antibody*. *Electrophoresis*, 2017. **38**(6): p. 914-921.

38. Montealegre, C. and C. Neusüß, *Coupling imaged capillary isoelectric focusing with mass spectrometry using a nanoliter valve*. *Electrophoresis*, 2018. **39**(9-10): p. 1151-1154.
39. Dai, J. and Y. Zhang, *A Middle-Up Approach with Online Capillary Isoelectric Focusing/Mass Spectrometry for In-Depth Characterization of Cetuximab Charge Heterogeneity*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(24): p. 14527-14534.

PARTIE II – Validation de méthode CE- MS pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux

Chapitre III : Validation du couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse pour l'identification et la quantification relative de N-glycosylations d'anticorps monoclonaux

1. Introduction

L'arrivée des anticorps monoclonaux (mAbs) sur le marché des molécules biopharmaceutiques dans les années 1980 a révolutionné les traitements contre diverses maladies telles que de nombreux cancers, les rejets de greffe ou encore les maladies auto-immunes. Cette nouvelle classe de protéines thérapeutiques a connu un véritable essor jusqu'à devenir majeure sur le marché biopharmaceutique. L'attrait grandissant pour les traitements à base de mAbs ainsi que les candidats aux essais cliniques a imposé une cadence de développement de ces molécules qui induit un besoin de caractérisation fine de ces médicaments.

A ce jour, la caractérisation de protéines thérapeutiques représente un véritable défi pour les sciences analytiques. En effet, ces protéines possèdent une forte hétérogénéité due à de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTMs) diverses et variées. Parmi ces PTMs, on retrouve des modifications mineures telles que des oxydations de méthionine, des déamidations d'asparagine ou encore des isomérisations de résidus acide aspartique qui impliquent de faibles différences de masse ou des changements conformationnels des protéines. Cependant, les N-glycosylations sont une catégorie de PTMs qui s'est révélée comme étant capitale dans l'efficacité et l'innocuité des mAbs dans les traitements.

Bien que ne représentant que 2 à 5 % de la masse totale de la protéine, les N-glycosylations ont pourtant été identifiées par les différentes agences du médicament comme ayant une influence non négligeable dans l'efficacité des traitements. La *Food and Drug Administration* (FDA) et la *European Medicine Agency* (EMA) ont qualifié les glycosylations comme *Critical Quality Attribute* (CQA). La caractérisation fine de ces glycosylations est donc très importante afin d'autoriser la mise sur le marché de médicaments efficaces et non nocifs.

Diverses méthodes analytiques telles que la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) ou encore l'électrophorèse capillaire en gel (CGE) avec détection par fluorescence (FD) ont permis d'identifier les différentes structures composant ces glycosylations. La caractérisation des N-glycosylations a également été réalisée à l'aide d'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS) en utilisant une stratégie bottom-up. Une digestion trypsique permet

d'obtenir les peptides portant les glycosylations et l'utilisation de la spectrométrie de masse en ligne permet de quantifier relativement l'abondance de chaque glycosylation.

Contrairement à la HILIC-FD, la CE-MS n'était pas considérée comme une méthode suffisamment robuste et répétable pour être qualifiée de méthode de référence. Or, diverses études sur les biomolécules et en particulier les mAbs ont été réalisées ces dernières années en CE-MS et ont montré des résultats très encourageants. En effet, des travaux antérieurs ont montré qu'une seule injection en CE-MS permet d'avoir un nombre considérable d'informations telles que le recouvrement intégral de séquence en acides aminés, l'hétérogénéité de charge, la présence de formes de dégradation mais aussi l'identification et la localisation précise de PTMs de faible poids moléculaire mais également de masse plus importante telles que les N-glycosylations.

L'objectif l'étude détaillée dans ce chapitre a été de prouver que la CE-MS était en mesure de satisfaire tous les critères imposés par les agences de médicaments pour qualifier cette méthode comme méthode de référence dans l'analyse de biomolécules, et principalement pour la caractérisation et la quantification relative des N-glycosylations. Nous souhaitons proposer une méthode alternative à la quantification relative des N-glycosylations qui ne nécessite pas l'usage de standards internes ni d'étape supplémentaire de déglycosylation des mAbs nécessaire dans le cadre des techniques habituellement utilisées.

Afin d'aboutir à la validation de la CE-MS pour la caractérisation des biomolécules, nous avons développé une étude pour caractériser des N-glycosylations présentes sur 10 mAbs commerciaux selon les critères de la FDA et de l'EMA et comparé les résultats obtenus avec ceux de la méthode de référence, la HILIC-FD. La validation a été réalisée à la fois sur les structures glycaniques mais aussi sur la quantification relative de ces structures sur chaque mAb. De plus, les résultats obtenus en CE-MS ont été comparés avec ceux obtenus en nanoLC-MS publiés dans la littérature, afin de montrer la forte corrélation entre la CE-MS et la LC-MS, technique plus conventionnellement utilisée.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le journal scientifique Talanta.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.083>

2. Publication : Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis – mass spectrometry : assessment and method validation

Jérémie Giorgetti, Valentina D’Atri, Julie Canonge, Antony Lechner, Davy Guillaume, Olivier Colas, Elsa Wagner-Rousset, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François. **Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis – mass spectrometry: assessment and method validation**, *Talanta*, 2018, 178, 530-537.

[2.1. Abstract:](#)

Characterization of therapeutic proteins represents a major challenge for analytical sciences due to their heterogeneity caused by post-translational modifications (PTM). Among these PTM, glycosylation which is possibly the most prominent, require comprehensive identification because of their major influence on protein structure and effector functions of monoclonal antibodies (mAbs). As a consequence, glycosylation profiling must be deeply characterized. For this application, several analytical methods such as separation-based or MS-based methods, were evaluated. However, no CE-ESI-MS approach has been assessed and validated. Here, we illustrate how the use of CE-ESI-MS method permits the comprehensive characterization of mAbs N-glycosylation at the glycopeptide level to perform relative quantitation of N-glycan species. Validation of the CE-ESI-MS method in terms of robustness and reproducibility was demonstrated through the relative quantitation of glycosylation profiles for ten different mAbs produced in different cell lines. Glycosylation patterns obtained for each mAbs were compared to Hydrophilic Interaction Chromatography of 2-aminobenzamide labeled glycans with fluorescence detector (HILIC-FD) analysis considered as a reference method. Very similar glycoprofiling were obtained with the CE-ESI-MS and HILIC-FD demonstrating the attractiveness of CE-ESI-MS method to characterize and quantify the glycosylation heterogeneity of a wide range of therapeutic mAbs with high accuracy and precision.

Keywords: Capillary Electrophoresis-Mass spectrometry; Monoclonal antibody; IgG glycosylation; HILIC-FD; Glycopeptide

[2.2. Introduction](#)

Monoclonal antibodies (mAbs) were introduced for the treatment of various diseases in the late 1980 and they still represent the most rapidly growing category of therapeutic molecules today [1-3]. mAbs are particularly interesting because of their good therapeutic efficiency, favorable pharmacokinetic and pharmacodynamics, and relatively low side-effects [4]. mAbs are tetrameric glycoproteins having a molecular mass of approximately 150 kDa, composed of two heavy chains and two light chains, inter-linked by several disulfide bonds, and having at least one conserved N-glycosylation site located in the Fc domain [3]. Glycosylation is a post-transcriptional modification (PTM) that occurs naturally during excretion of antibodies from the expression system to the extracellular medium. It only represents 2-5% of the total mass of the protein but it is subjected to extensive studies due to its significant influence on effector functions of mAbs, especially antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) [5-8]. As a consequence, the mAbs glycosylation profile is considered as a critical quality attribute (CQA) and must be thoroughly analyzed [9-13]. The complexity and heterogeneity of the glycosylation pattern is mainly due to mAbs production in living expression systems [14-16] and requires a number of orthogonal analytical techniques to be fully characterized. Several analytical methods have been described for the glyco-variants characterization at different levels (from released glycans to intact protein level) including separative techniques (liquid chromatography (LC), capillary electrophoresis (CE)) often coupled to spectrometric, amperometric and mass spectrometric detection [17-21].

Recently, Reusch's group published two major articles dealing with the analysis of Fc-glycosylation profiles, and comparing several separation methods hyphenated or not with mass spectrometry (MS) detection [20, 21]. This comprehensive comparison showed an excellent precision and accuracy for all the methods. However, concerning MS-based methods [22-25], a large panel of methodologies were evaluated, except the CE-ESI-MS approach. Nevertheless, in 2008, Gennaro *et al.* described the development of CE-ESI-MS technology with online LIF detection that allows identification of major and minor glycan species observed in the routine CE-LIF assay. Despite significant instrumental development to achieve LIF and MS dual detection, their strategies allowed to perform quantitative analysis provided by the on-line LIF trace and to increase confidence by providing accurate mass information [26]. More recently, Gahoual *et al.* reported the development of CE-ESI-MS technique for the characterization of the primary structure of mAbs performed in a single injection [27]. Based on a bottom-up approach, they highlighted the benefits of using electrophoretic separation in complement to chromatographic separation, which is conventionally applied in this type of study. CE separation selectivity allowed to simultaneously perform the amino acid sequencing and the PTMs characterization, including the N-glycosylation profiling. However, concerning the latter point, the

approach was not statistically validated and potential bias in the obtained glycosylation heterogeneity could exist [28]. In the meantime, Heemskerk *et al.* reported the use of a similar methodology for highly sensitive IgG1 glycosylation profiling as a complementary method to a high-throughput nano-RPLC-MS [29]. They concluded that CE-ESI-MS provide information on IgG Fc glycosylation with concentrations below the LODs of the conventional methods. However, no comparison with reference method were applied to validate the obtained glycosylation heterogeneity.

In this report, we evaluated and validated CE-ESI-MS method to characterize and quantify the heterogeneity of the glycosylation pattern with high accuracy, precision and robustness. A systematic characterization study of glycopeptides obtained from ten different therapeutic mAbs produced in different expression systems (CHO, NS0 and SP2/0), has been performed to evaluate the suitability of CE-ESI-MS method, according to mAbs properties. Rituximab (chIgG1, CHO), palivizumab (hzIgG1, SP2/0), natalizumab (hzIgG4, NS0), nivolumab (hulgG4, CHO), trastuzumab (hzIgG1, CHO), panitumumab (hulgG2, CHO), adalimumab (hulgG1, CHO), infliximab-Remicade® (chIgG1, SP2/0) as well as two infliximab biosimilars, infliximab-Inflectra® (chIgG1 SP2/0) and infliximab-Remsima® (chIgG1 SP2/0), were selected for this study. Comparison with glyco-profiling of released and 2-AB labeled glycans (used as a reference method) obtained by state-of-the-art Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) was methodically performed to assess the reliability of the CE-ESI-MS methodology.

[2.3. Experimental](#)

2.3.1. Chemicals. Chemicals used were of analytical grade or high purity grade and purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). RapiGest SF surfactant was purchased from Waters (Milford, MA, USA). mAbs and biosimilars products were all kindly provided by Pierre Fabre laboratories (Saint-Julien en Genevois, France).

2.3.2. Sample preparation. A volume corresponding to 100 µg (0.67 nmol) of protein was used. Samples were first diluted from stock solution to a concentration of 45.6 µM by using milliQ water. A second dilution to a concentration of 22.2 µM was performed by using 0.1% RapiGest surfactant and incubation at 40°C for 10 min. Reduction of the samples was then achieved by the addition of dithiothreitol (DTT, final concentration of 25 mM) and incubation at 95°C for 5 min. Once cooled down to room temperature (RT), the alkylation of the cysteines (Cys) was performed to avoid the reformation of the disulphide bonds. Thus, iodoacetamide (IDA, final concentration of 10 mM) was added to the

samples, followed by incubation at RT for 20 min in the dark. For performing the trypsin digestion, a volume of 1 μL of trypsin (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was added to the samples that were left at room temperature for 3h. Then another volume of 1 μL was added afterward and digestion was performed overnight at 37°C. In order to cleave the surfactant, formic acid (FA) was added to the samples at a final concentration of 1% (v/v) and samples were left at RT for 2h. Samples were finally diluted to a final protein concentration of 2.2 μM using ammonium acetate 50 mM (pH 4.0).

2.3.3. Capillary electrophoresis. The CE experiments were performed with a CESI8000 capillary electrophoresis system from Sciex Separation (Brea, CA, USA). A 32 Karat™ (Sciex Separation) was used for instrument control, data acquisition and data handling. Bare fused-silica capillaries (total length 100 cm; 30 μm i.d.) with characteristic 3 cm porous tip on its final end, a second capillary (total length 80 cm; 50 μm i.d.) filled during experiments with BGE allows electric contact. New capillaries were flushed for 10 min at 75 psi (around 5 bar) with methanol, then 10 min with 0.1 M sodium hydroxide, followed by 10 min with 0.1 M hydrochloric acid and water for 20 min at 75 psi. Finally, the capillary was flushed 10 min at 75 psi with BGE which contains 10% acetic acid. Hydrodynamic injection (6 psi for 2 min) corresponding to a total volume of 90 nL of injected sample was used. Injection volumes were calculated by using the CEToolbox application (Pansanel, GooglePlay). Separations were performed using a voltage of +20 kV.

2.3.4. Mass spectrometry. For glycopeptide analysis, the CESI system was hyphenated with a 5600 TripleTOF mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany). The MS instrument is equipped with a hybrid analyzer composed of quadrupoles followed by a time-of-flight (TOF) analyzer. ESI source parameters were set as follows: ESI voltage -1.75kV, gas supplies (GS1 and GS2) were deactivated, source heating temperature 150°C and curtain gas value 5. Experiments were performed in Top15 information dependent acquisition (IDA), accumulation time was 250 msec for MS scans and 100 msec for MS/MS scans leading to a total duty cycle of 1.75 sec. Mass/charge (m/z) range was set to 100-2000 in MS and 50-2000 in MS/MS. Using those parameters, the mean resolution provided by the instrument is 40000 in MS (for m/z 485.251) and 25000 in MS/MS (for m/z 345.235).

2.3.5. MS/MS data analysis. Data obtained from the sheathless CE-MS/MS experiments were analyzed using Peakview software (Sciex, San Francisco, CA). The allowed mass tolerance for search algorithm identification, were set to ± 5 ppm and ± 0.05 Da for precursor ions and fragmentation ions, respectively.

2.3.6. HILIC (2-AB). Each mAb (200 μg ; 1.34 nmol) was deglycosylated by incubation with 2 μg PNGase F (500,000 U/ml, New England Biolabs) at 37°C for 3 h following the standard protocols provided by the manufacturer. Released glycans were labelled with 2-AB at 65°C for 3 h (Glyko Signal 2-AB Labeling

Kit, ProZyme), and then purified using dedicated GlikoClean S Cartridges (ProZyme). Labeled glycans were washed with 96% acetonitrile (ACN), eluted from the cartridges and evaporated to dryness using a speedvac. Samples were reconstituted in 100 μ L of 30:70 water/ACN (v/v). The pH of the mobile phase was 4.5. Analysis were performed by HILIC using an Agilent AdvanceBio Glycan column (2.1 x 150 mm, 1.8 μ m) on a Waters ACQUITY UPLC I-Class system equipped with a binary solvent delivery pump, an auto-sampler, a UV-DAD and a fluorescence detector (FD) set at λ_{ex} = 260 nm and λ_{em} = 430 nm. The system included a flow through needle (FTN) injection system with a 15 μ L needle. Data acquisition, data handling and instrument control were performed with Empower 2 (Waters, Milford, MA, USA). Mobile phase consisted of 20 mM Ammonium Formate solution (A) and ACN (B). The column temperature was set to 55 °C, and injection volume was 2 μ L corresponding to 0.08-0.2 μ g glycan sample. The flow rate was set to 0.5 mL/min, and the gradient conditions consisted of 80% to 60% B in 25 minutes, followed by a 3 min washing step at 20% B and a 15 min re-equilibration step. Peaks were manually integrated and relative glycan compositions were calculated. For the correct identification of the labelled glycans, UHPLC-MS analysis were also performed using an ACQUITY UPLC system (Waters), equipped with a binary pumping system and fixed loop injector of 5 μ L. This UHPLC was coupled to a fluorescence detector (FD) and an electrospray time-of-flight mass spectrometer (Xevo™ Q-ToF, Waters). The mass spectrometer was operated in the positive ion mode and ions were scanned over an m/z range of 500-2500 with a 1 s scan rate. Capillary voltage was set to 3.0 kV, sample cone voltage to 35 V, source temperature to 120 °C, desolvation gas temperature to 350 °C and gas flow to 800 L/h. The instrument was calibrated using the singly charged ions produced by a 2 μ g/ μ L sodium iodide solution in 2-propanol/water (1:1). Data acquisition and analysis were performed with MassLynx 4.1 (Waters). In all cases, a 2-AB labelled dextran ladder standard (1 pmol/ μ L) was also injected before and after a series of 5 samples, to check the repeatability of the injections and verify that no drift in retention times was observed.

[2.4. Results and discussions](#)

[2.4.1. Characterization of N-Glycopeptide by CE-ESI-MS.](#)

MAbs are glycosylated proteins whose N-glycans are naturally incorporated in the protein during secretion into the extracellular environment. Extensive glycans characterization in terms of structure and relative abundance is of prime importance. The main goal of this study was to demonstrate the possibility to use CE-ESI-MS method for performing glycosylation profiling of a large panel of therapeutic mAbs using glycopeptides MS data. Therefore, we realized a systematic study of glycosylation characterization on ten different mAbs produced in CHO, NS0 and SP2/0 cell lines ([Table](#)

3.1). To evaluate the viability of CE-ESI-MS, we focused our characterization on the main Fc N-glycan species typically found in therapeutic IgG mAb produced in the above mentioned cell lines and listed in Table 1. In this section, natalizumab results have been selected as example to describe the CE-ESI-MS methodology allowing to assess the in-depth N-glycan characterization. *Figure 3.1a* illustrates the separation obtained for the tryptic digest of natalizumab for a 200 fmol injection. The total analysis time was less than 45 min and the resulting electropherogram showed that all peptides migrated between 15 and 40 min. As tandem MS data interpretation and peptide identification was automatically done using Mascot, to obtain fast and accurate data treatment, it was necessary to manually evaluate the CE-ESI-MS/MS data in order to identify the glycopeptides and determine their structures. Peak assignment of glyco-structures was performed based on accurate mass measurement in MS1, provided by high resolution MS (mass accuracy below 2 ppm) (*Figure 3.1b*) and collision induced decay (CID) fragmentation spectra (*Figure 3.1c*), respectively. Indeed, MS/MS spectra exhibited the fragmentation of glycan moieties present on the glycopeptide, giving structural information on the glycans along with reinforcing the confidence of the identification. Furthermore, the obtained electropherogram showed the separation of several glycopeptides, demonstrating the benefit of using CE for such characterization. The charge-based CE separation allowed the baseline resolution of sialic acid and neutral glycans located on the peptide EEQFN³⁰⁰STYR. *Figure 3.1a* represents two windows on the electropherogram, corresponding to the neutral glycans separation (between 30.5 and 31.9 min) and to the sialic acid moieties separation (between 34.9 and 36.5 min). Moreover, particular glycopeptides having a difference of only one galactose could also be baseline separated. Glycopeptides having such a small difference in mass tend to compete against each other during the ionization process, potentially interfering with relative quantification, thus the capacity to separate them is clearly an intriguing advantage. To perform the glycans profiling of each mAb, relative occurrence levels were estimated from the sum of isotopic peak intensities, considering all charge states of the ion corresponding to one glycopeptide (*Figure 3.2a* and *Table 3.S-1*). A comparison of all glycoforms abundance was then realized (Fig. 2b). To validate the method reproducibility, the digestions of each mAb were performed three times using different experimenters and triplicate injections of each digested sample were carried out. The relative occurrence glycan levels reported in Table 1 were calculated for a selected mAb as the average of all relative abundances of the nine values (three digestions and three injections per digested samples), with a confidence interval of 95%.

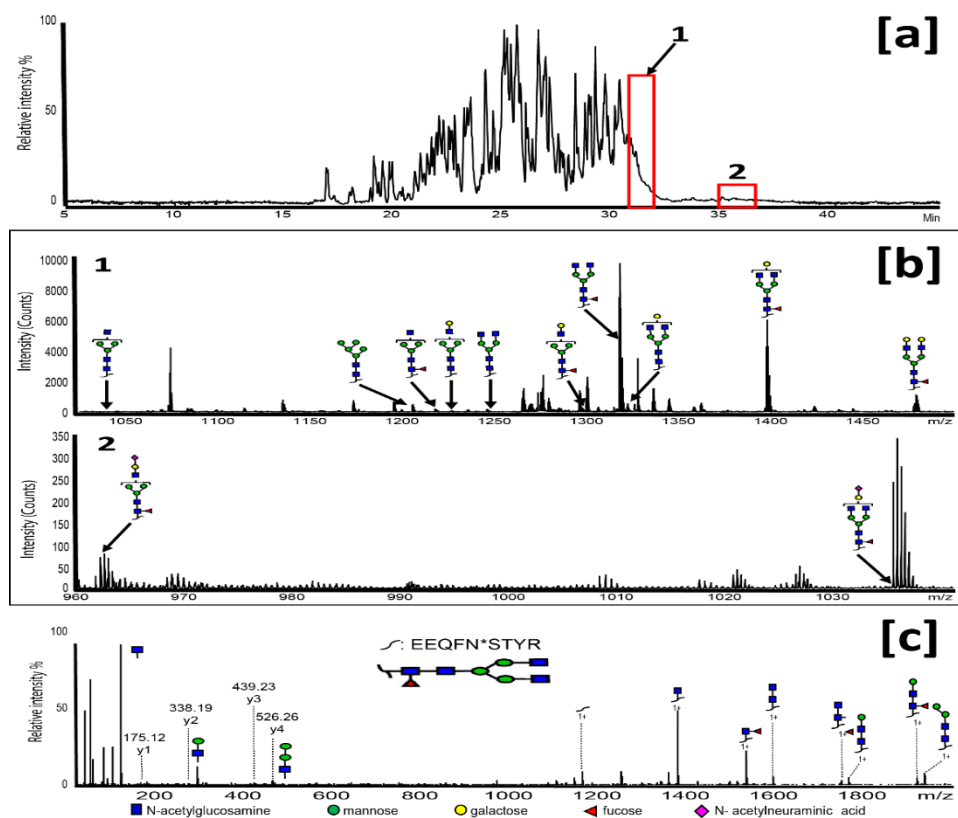


Figure 3.1 : (a) Base Peak Electropherogram corresponding to the analysis by CE-ESI-MS/MS of natalizumab tryptic digest. (b) MS spectrum of 30.5 – 31.9 min and 34.9 – 36.5. (c) MS/MS fragmentation spectra of [EEQFNSTYR] + G0F. Experimental conditions described in Experimental section.

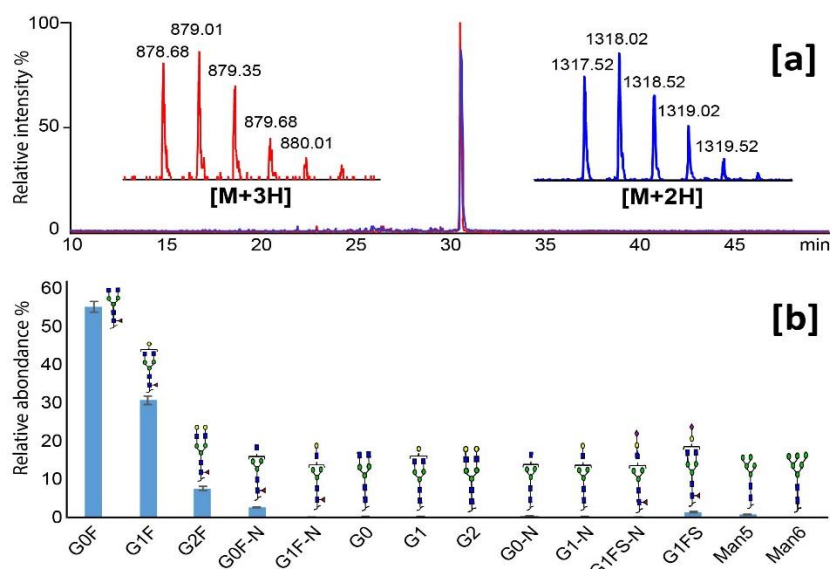


Figure 3.2 : (a) Extracted Ion Electropherogram (EIE) of m/z ratios 878.68 and 1317.52 ([EEQFN*STYR] + G0F) and corresponding MS/MS fragmentation spectra (right-hand side). (b) Glycoforms relative abundance results obtained through the CE-ESI-MS data for the natalizumab Fc glycopeptide.

2.4.2. Evaluation of CE-ESI-MS method performance

To assess the performance of the CE-ESI-MS methodology with respect to accuracy and precision, each mAb glycosylation profile was compared with the reference method, namely HILIC-FD glycosylation profile obtained upon release and 2-AB-labeling of the glycans. HILIC-FD acquisitions were performed in triplicate and peaks on the FD chromatogram were manually integrated for estimating the relative glycan compositions. The deviations observed for retention times were minimal ($RSD_{RT} = 0.39\%$, calculated on G0F, for $n = 30$). Peak assignment of the 2AB-glycans was accomplished by online coupling of HILIC with ESI-MS. A detailed list of the glycan composition and the theoretical masses of the unlabelled/labelled glycans is shown in [Table 3.2](#). The theoretical 2AB-glycan masses were used to obtain the extracted ion chromatogram (EIC) of each glycan. Furthermore, GlycoMod software (<http://web.expasy.org/glycomod/>) was eventually used for the prediction of the possible glycan structures based on the experimentally determined masses.

Glycan Species	Structural Scheme	Theo M	2-AB M	z=1 (+)	z=2 (+)	z=3 (+)
G0F [H3N4F1]		1444.534	1582.750	1583.757	792.382	528.590
G1F [H4N4F1]		1606.587	1744.803	1745.810	873.409	582.608
G2F [H5N4F1]		1768.640	1906.856	1907.863	954.435	636.626
G0F-N [H3N3F1]		1241.455	1379.671	1380.678	690.843	460.897
G1F-N [H4N3F1]		1403.507	1541.723	1542.730	771.869	514.915
G0 [H3N4]		1298.476	1436.692	1437.699	719.353	479.904
G1 [H4N4]		1460.529	1598.754	1599.752	800.380	533.922
G2 [H5N4]		1622.582	1760.798	1761.805	881.406	587.940
G0-N [H3N3]		1095.397	1233.613	1234.620	617.814	412.211
G1-N [H4N3]		1257.449	1395.665	1396.672	698.840	466.229
G1FS-N [H4N3FS1]		1710.598	1848.814	1849.821	925.414	617.178
G1FS [H4N4FS1]		1913.677	2051.893	2052.900	1026.954	684.971
M5 [H5N2]		1216.423	1354.639	1355.646	678.327	452.553
M6 [H6N2]		1378.476	1516.692	1517.699	759.353	506.571

Table 3.2 : Overview of 2AB-glycans masses of monoclonal antibody.

Table 1 compiles the results of CE-ESI-MS and HILIC-FD (2-AB) relative abundance values obtained for each mAb. As described in the literature [20], HILIC-FD shows excellent precision with low standard deviations (with the exception of Infliximab-RemSima® analysis). The suggested CE-ESI-MS method also presents low absolute variation with values below 4% for the different glycan structures.

These values are comparable to those determined for other MS-based methods, such as NanoLC-ESI-MS described elsewhere [21]. It is worth noticing that for each mAb, the deviations were obtained based on the combination of digestions and injections performed in triplicates by different experimenters over an extended period of several weeks, thus the results strongly support the performance of the method in terms of robustness and reproducibility. Moreover, the relative occurrence level estimated by CE-ESI-MS method were in good agreement for the values obtained with the reference HILIC-FD method. For G0F and G1F, which represent at least 75% of the total glycosylation of each mAb, the relative absolute difference between CE-ESI-MS means and HILIC-FD means expressed as a percentage ($100 * |\text{Mean}_{\text{CE}} - \text{Mean}_{\text{HILIC}}| / \text{Mean}_{\text{CE}}$) showed an average of 7.5% for G0F and 7.8% of G1F. These values confirm the good fit between the two methodologies for the major forms of glycosylation. Moreover, for glycosylation expressed at least at 10% of the total glycoforms (i.e. G2F of Palivizumab), this value is up to 20% meaning a good variability between CE-ESI-MS and HILIC (2-AB) mean amount. For glycosylation representing less than 10% of the total glycoforms, the relative absolute differences between HILIC-FD and CE-ESI-MS are no longer representative, because these values can be very high, due to low degree of expression.

The relative quantification of mono-antennary structures, defined by the lack of N-acetylglucosamine (G0F-N, G1F-N, G0-N, G1-N), is known to be problematic using MS-based methods. Indeed, in-source fragmentation of bi-antennary structures resulting in the loss of one antenna can generate elevated mono-antennary structures levels, along with a charge reduction that is commonly observed in MS spectra and that is a consequence of a loss of the N-acetylglucosamine [21]. While only low or similar levels of mono-antennary structures were detected in CE-ESI-MS for eight mAbs, higher levels of these glycovariants were detected for natalizumab and nivolumab, as compared to HILIC-FD (*Table 2*). However, for these two mAbs, differences between the mono-antennary averages obtained by CE-ESI-MS and HILIC-FD were not aberrant and no charge state reduction was observed by CE-ESI-MS. These behaviours mean that the detected sum of mono-antennary structures were not over-estimated. Moreover, this result confirmed that during ESI-MS analysis of glycopeptides, in source decay can efficiently be avoided through the proper choice of the MS conditions and voltages, even for CE-ESI-MS method [21].

The sum of afucosylated species (G0, G1, G2) is a relevant parameter for antibody effector function. For nine mAbs, similar levels of G0+G1+G2 were observed. Only trastuzumab showed a difference between CE-ESI-MS (8.3%) and HILIC-FD (4.4%) (*Table 2*). Similarly, the sum of highly mannosylated species (M5, M6) was evaluated and similar levels of M5+M6 were observed for seven mAbs, along with small differences concerning M5 species for adalimumab, infliximab-Remicade® and palivizumab. This variability, already observed with other MS-based methods [21], could be explained

by the low degree of expression of N-glycans. Finally, good correlations were observed for the mean levels of sialylated structures sum (G1FS, G1FS-N). Overall comparisons of results obtained by CE-ESI-MS approach and HILIC-FD reference method showed very similar glycoprofiling of the ten therapeutic mAbs. CE-ESI-MS demonstrated to be a valuable method to characterize and quantify with high accuracy, precision and robustness the most largely expressed glycan species as well as the low abundance glycoforms. Recently, Pisupati *et al.* published an important work describing a multidimensional analytical comparison of infliximab-Remicade® and the biosimilar infliximab-Remsima® [30]. They performed the glycoforms quantification by LC-MS using trypsin-digested products and demonstrated, for the first time, significant differences in the N-Glycan distributions for infliximab-Remicade® and infliximab-Remsima® (*Figure 3.3a*). To confirm the assessment of CE-ESI-MS method in performing the relative quantitation of mAbs glycopeptides, we compared our infliximab-Remicade® and infliximab-Remsima® means with those obtained by Pisupati *et al.* It must be highlighted that no collaboration was carried out between Prof. Schwendeman's group and our laboratory, which means that samples were not from the same batch, and that experimenters and instrumentations were different. *Figure 3.3b* represents the glycoprofiling of infliximab-Remicade® and infliximab-Remsima® following CE-ESI-MS analysis for the selected N-glycan species. Comparison between Pisupati *et al.* results and our profiles highlights a total similarity between the two glycoprofilings. For the eight selected N-glycan species, similar relative abundance have been obtained and originator/biosimilar comparison followed the same expression degree differences. While the confirmation of CE-ESI-MS performance in term of N-Glycan species quantification was proved, significant differences in the N-Glycan distributions for infliximab-Remicade® and infliximab-Remsima® were confirmed.

Infliximab-Inflectra® is another biosimilar that was studied in this work and not reported by Pisupati *et al.*. Thanks to the CE-ESI-MS methodology, we showed for the first time significant differences in the N-Glycan distributions also for infliximab-Remicade® and infliximab-Inflectra® (*Table 1*).

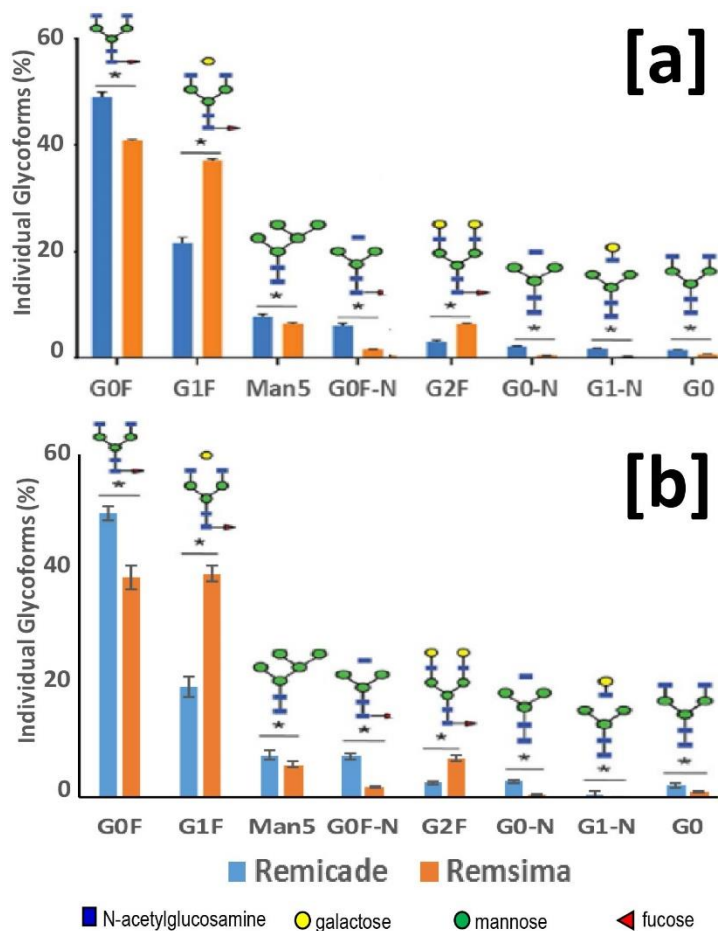


Figure 3.3 : Comparison of Infliximab-Remicade® and infliximab-Remsima® glycoprofiling. (a) Quantification of N-glycans adapted following the method of Pisupati et al. (adapted with permission from [30]). Copyright (2017) American Chemical Society. (b) Quantification of N-glycans following CE-ESI-MS analysis.

2.5. Conclusion

To summarize, we reported here the development of a CE-ESI-MS methodology to perform relative quantitation of N-glycan species for mAbs characterization at the glycopeptides level. Validation in terms of robustness and reproducibility of CE-ESI-MS method were demonstrated through the relative quantitation of glycosylation profiles for ten different mAbs produced in different cell lines. A systematic comparison of the glycosylation patterns obtained for each mAbs was compared with that obtained with the HILIC-FD reference method. Results obtained with the CE-ESI-MS approach and HILIC-FD showed very similar glycoprofiling, demonstrating the attractiveness of CE-ESI-MS method to characterize and quantify the glycosylation heterogeneity of a wide range of therapeutic mAbs, with high accuracy and precision. In addition, focusing on the glycopeptide may allow to distinguish glycans

with regard to their glycosylation sites, which cannot be done when using methodologies involving glycans release. This property may be important, especially in case of more complex glycoproteins or for mAbs having several glycosylation sites. Moreover, it must be mentioned that our CE-ESI-MS methodology is not restricted to the sole purpose of glycopeptides characterization and quantitation, but it can also be employed for the overall characterization of mAbs, including primary structure assessment with complete sequence coverage as well as identification and quantification of a large number of PTMs, all performed within a unique single analysis [27]. In our opinion, this work proves that CE-ESI-MS could be a viable alternative to LC-ESI-MS for glycosylation profiling and should be considered as an innovative approach in MS-based proteomics applied to mAbs characterization.

[2.6. Acknowledgments](#)

Emmanuelle Leize-Wagner would like to thank Sciex for the fruitful collaboration and the support. The authors would like to express their gratitude to Camille Banholzer, Jordan Kirmann and Charly Renard (LSMIS, Université de Strasbourg, France), P. Hammann, Lauriane Kuhn and J. Chicher (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France) and MC. Janin-Bussat (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France). This work was supported by the CNRS (UMR 7140), the University of Strasbourg. Davy Guillarme also wishes to thank the Swiss National Science Foundation for its financial support (31003A_159494).

2.7. Supplementary information

Peptide	EEQFNSTYR	theo M (glycan)	theo M (glycopeptide)	z=1 (+)	z=2 (+)	z=3 (+)	z=4 (+)
G0F [H3N4F1]		1444.534	2617.044	2618.044	1309.522	873.348	655.261
G1F [H4N4F1]		1606.587	2779.097	2780.097	1390.548	927.366	695.774
G2F [H5N4F1]		1768.640	2941.149	2942.149	1471.575	981.383	736.287
G0F-N [H3N3F1]		1241.455	2413.964	2414.964	1207.982	805.655	604.491
G1F-N [H4N3F1]		1403.507	2576.017	2577.017	1289.009	859.672	645.004
G0 [H3N4]		1298.476	2470.986	2471.986	1236.493	824.662	618.746
G1 [H4N4]		1460.529	2633.039	2634.039	1317.519	878.680	659.260
G2 [H5N4]		1622.582	2795.091	2796.091	1398.546	932.697	699.773
G0-N [H3N3]		1095.397	2267.906	2268.906	1134.953	756.969	567.977
G1-N [H4N3]		1257.449	2429.959	2430.959	1215.980	810.986	608.490
G1FS-N [H4N3FS1]		1710.598	2883.107	2884.107	1442.554	962.036	721.777
G1FS [H4N4FS1]		1913.677	3086.187	3087.187	1544.093	1029.729	772.547
M5 [H5N2]		1216.423	2388.933	2389.933	1195.466	797.311	598.233
M6 [H6N2]		1378.476	2550.985	2551.985	1276.493	851.328	638.746

Table 3.S-1 : Overview of glycopeptides masses of natalizumab

3. Conclusion

Les travaux présentés dans cette partie ont permis de valider la méthode de CE-MS afin de caractériser et quantifier relativement des structures de N-glycosylation présentes sur les mAbs. La stratégie *bottom-up* déjà utilisée pour obtenir les informations de structure primaire telles que la séquence en acides aminés ainsi que la nature et la localisation des PTMs s'est révélée tout aussi efficace pour les N-glycosylations, qui sont des PTMs plus imposantes et dont l'influence sur l'efficacité des mAbs a été largement démontrée.

La validation de méthode de CE-MS s'est basée sur la reproductibilité, la répétabilité, la non-spécificité ainsi qu'une comparaison des résultats expérimentaux avec ceux obtenus avec la méthode HILIC-FD, reconnue comme référence pour l'identification et la quantification relative des glycosylations. 3 personnes de l'équipe ont effectué les digestions trypsiques des 10 mAbs et les échantillons ont été analysés en triplicat afin d'avoir une représentativité des résultats satisfaisante lors de l'analyse statistique.

Après digestion trypsique des 10 mAbs commerciaux, les digests ont été analysés et MS et MS/MS. Les masses de 14 formes de glycosylation ont été calculées théoriquement et les masses ont été extraites des données expérimentales. Après avoir sommé les intensités des 5 premiers pics pour 2 états de charge (2^+ et 3^+), il a été possible d'obtenir la quantité relative de chaque N-glycosylation pour chaque mAb.

Les profils de glycosylation obtenus en CE-MS ont été comparés avec ceux obtenus avec la HILIC-FD. La forte similarité entre les profils obtenus par ces deux approches démontre l'intérêt de la CE-MS pour identifier et quantifier les glycosylations et illustrer leur hétérogénéité avec précision. La technique de CE-MS développée ici permet d'avoir une information supplémentaire sur la localisation du site d'attache entre la glycosylation et le squelette protéique contrairement aux autres méthodes qui nécessitent une libération des glycosylations de la chaîne protéique. Ces informations peuvent être d'autant plus importantes si les mAbs analysés contiennent plusieurs sites d'attache des N-glycosylations comme c'est le cas dans de nombreux ADCs.

Parmi les mAbs étudiés, certains font partie de la catégorie des biosimilaires. Les biosimilaires étant des molécules proches des protéines originales mais issues d'une lignée cellulaire différente, les PTMs et notamment les N-glycosylations peuvent varier. L'étude faite par l'équipe de Pisupati en nanoLC-MS sur un biosimilaire d'infliximab a montré une différence au niveau des abondances relatives des glycosylations. La méthode CE-MS développée par le laboratoire a permis de caractériser et quantifier les glycosylations sur ces mêmes molécules. La similarité entre les profils obtenus en nanoLC-MS et en CE-MS est flagrante et conforte la validation de la CE-MS comme méthode d'analyse des N-glycosylations.

Les informations concernant les N-glycosylations peuvent être obtenues simultanément aux autres paramètres structuraux tels que la séquence en acides aminés ou la recherche des PTMs. La faible consommation d'échantillon (100fmol injectés) ainsi qu'une injection unique pour la caractérisation structurale des mAbs font de la CE-MS une technique puissante pour l'analyse de biomolécules. La méthode développée peut donc être utilisée plus largement afin de caractériser les PTMs présentes sur d'autres glycoprotéines telles que des biosimilaires ou encore des ADCs.

4. Références bibliographiques

1. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 345-352.
2. Reichert, J.M., *Marketed therapeutic antibodies compendium*. mAbs, 2012. **4**(3): p. 413-415.
3. Pan, J., S. Zhang, and C.H. Borchers, *Comparative higher-order structure analysis of antibody biosimilars using combined bottom-up and top-down hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2016. **1864**(12): p. 1801-1808.
4. Wang, W., et al., *Antibody structure, instability, and formulation*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(1): p. 1-26.
5. Beck, A., et al., *Trends in Glycosylation, Glycoanalysis and Glycoengineering of Therapeutic Antibodies and Fc-Fusion Proteins*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008. **9**(6): p. 482-501.
6. Okano, M., M. Sato, and S. Kageyama, *Mass spectrometric characterisation of darbepoetin alfa biosimilars with C-terminal arginine residues*. Drug Testing and Analysis, 2016. **8**(11-12): p. 1138-1146.
7. Gahoual, R., et al., *Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products*. Journal of Chromatography B, 2016. **1032**: p. 61-78.
8. Li, W., et al., *Discovery and characterization of antibody variants using mass spectrometry-based comparative analysis for biosimilar candidates of monoclonal antibody drugs*. Journal of Chromatography B, 2016. **1025**: p. 57-67.
9. Ayoub, D., et al., *Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques*. Mabs, 2013. **5**(5): p. 699-710.
10. Gahoual, R., et al., *Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*. Mabs, 2013. **5**(3): p. 479-490.
11. W Mulcahy, A., J. Hlavka, and S. Case, *Biosimilar Cost Savings in the United States*. Rand Corporation, 2017.
12. Kurki, P., et al., *Interchangeability of Biosimilars: A European Perspective*. BioDrugs, 2017. **31**(2): p. 83-91.
13. Largy, E., et al., *Orthogonal liquid chromatography–mass spectrometry methods for the comprehensive characterization of therapeutic glycoproteins, from released glycans to intact protein level*. Journal of Chromatography A, 2017. **1498**: p. 128-146.
14. Niwa, R., et al., *IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides*. Journal of Immunological Methods, 2005. **306**(1): p. 151-160.
15. Neill, A., et al., *Characterization of Recombinant Monoclonal Antibody Charge Variants Using Off-gel Fractionation, Weak Anion Exchange Chromatography, and Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(12): p. 6204-6211.
16. Ponniah, G., et al., *Characterization of the Acidic Species of a Monoclonal Antibody Using Weak Cation Exchange Chromatography and LC-MS*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(17): p. 9084-9092.
17. Dotz, V., et al., *Mass spectrometry for glycosylation analysis of biopharmaceuticals*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015. **73**: p. 1-9.
18. Hosken, B.D., et al., *Isolation and Characterization of Monoclonal Antibody Charge Variants by Free Flow Isoelectric Focusing*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(11): p. 5662-5669.
19. Lechner, A., et al., *Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016–2018*. Journal of Chromatography B, 2019. **1122-1123**: p. 1-17.

20. Reusch, D., et al., *Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 2: Mass spectrometric methods*. *Mabs*, 2015. **7**(4): p. 732-742.
21. Reusch, D., et al., *Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 1: Separation-based methods*. *Mabs*, 2015. **7**(1): p. 167-179.
22. Beck, A., S. Sanglier-Cianferani, and A. Van Dorsselaer, *Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(11): p. 4637-4646.
23. Thobhani, S., et al., *Identification and quantification of N-linked oligosaccharides released from glycoproteins: An inter-laboratory study*. *Glycobiology*, 2008. **19**(3): p. 201-211.
24. Wuhler, M., *Glycomics using mass spectrometry*. *Glycoconjugate Journal*, 2013. **30**(1): p. 11-22.
25. Banazadeh, A., et al., *Recent advances in mass spectrometric analysis of glycoproteins*. *Electrophoresis*, 2017. **38**(1): p. 162-189.
26. Gennaro, L.A. and O. Salas-Solano, *On-line CE-LIF-MS technology for the direct characterization of N-linked glycans from therapeutic antibodies*. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(10): p. 3838-3845.
27. Gahoual, R., et al., *Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachophoresis and Sheathless Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(18): p. 9074-9081.
28. Gahoual, R., et al., *Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachophoresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry*. *Mabs*, 2014. **6**(6): p. 1464-1473.
29. Heemskerk, A.A.M., et al., *Coupling porous sheathless interface MS with transient-ITP in neutral capillaries for improved sensitivity in glycopeptide analysis*. *Electrophoresis*, 2013. **34**(3): p. 383-387.
30. Pisupati, K., et al., *A Multidimensional Analytical Comparison of Remicade and the Biosimilar Remsima*. *Analytical Chemistry*, 2017. **89**(9): p. 4838-4846.

PARTIE III – Etude des mAbs aux niveaux intact et middle-up

Chapitre IV : Développement de méthode CE-MS pour la séparation d'anticorps entiers en conditions dénaturantes

1. Introduction

Les industries biopharmaceutiques l'affirment, les traitements à base de mAbs ne sont pas efficaces à 100 % [1]. Cela est en partie dû au fait que les glycoprotéines ont des structures très complexes qui peuvent subir des différences de composition chimique. Les mAbs utilisés dans les traitements possèdent de nombreuses micro-hétérogénéités, qui vont mener à une multitude de variants dont l'activité peut différer du médicament d'origine. La chaîne d'acides aminés composant les mAbs peut subir des modifications à différentes étapes, de la biosynthèse de la protéine à sa maturation puis son stockage. Ces modifications appelées également PTMs ont été identifiées grâce à de nombreuses techniques basées sur la stratégie *bottom-up*. Cependant, le protocole opératoire de cette stratégie nécessite l'emploi d'agents chimiques qui peuvent eux-mêmes induire des PTMs et ainsi biaiser les résultats interprétés. Pour éviter cela et avoir une information la plus proche possible de la réelle composition des mAbs, des techniques de séparation et d'analyse des différentes isoformes ont été développées. L'analyse des variants de mAbs repose sur des techniques chromatographiques ou électrophorétiques couplées à des détections par fluorescence ou par spectrométrie de masse.

A ce jour, il y a peu de bibliographie décrivant la séparation de mAbs à l'échelle de la molécule entière en électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS). La difficulté majeure de ces travaux réside dans la forte adsorption des mAbs entiers sur la surface interne du capillaire. Cela implique une rétention de ces protéines qui va induire une perte partielle ou totale de la détection. Par ailleurs, les conditions classiques de séparation des protéines entières ne sont pas adéquates pour séparer des molécules d'une masse moléculaire aussi importante que celle des mAbs. Les autres obstacles à une séparation efficace et une bonne détection des mAbs entiers sont liés aux faible nombre de solutions salines efficaces pour séparer les mAbs et directement compatibles avec la MS.

Dans ce chapitre, différents paramètres ont été analysés puis optimisés afin d'obtenir une séparation efficace de micro-variants de mAbs entiers qui soit directement compatible avec les conditions d'injection en MS via une source ESI. Dans un premier temps, les paramètres de détection en MS ont été étudiés puis ceux de séparation en CE. L'utilisation de capillaires usuels en silice vierge (BFS) dans la séparation de molécules imposantes telles que les mAbs entiers s'est révélée être un obstacle majeur dans l'efficacité de séparation. En effet, les charges de surface interne du capillaire portées par les groupements silanols sont négatives et induisent des phénomènes d'adsorption des

mAbs. Par conséquent, une stratégie de greffage des capillaires a été employée afin d'éviter toute adsorption des protéines sur la surface interne du capillaire en masquant les charges négatives. Des greffages neutre et positif ont été testés afin d'obtenir une efficacité de séparation maximale. D'autre part, différents paramètres tels que le volume d'injection, la nature du BGE ou encore du solvant d'échantillon se sont révélés majeurs dans l'efficacité de séparation. La difficulté réside dans le fait que tous les solvants utilisés dans la séparation en CE doivent être volatils et pauvres en sels afin d'assurer l'injection MS *on-line* à partir des composés sortant du capillaire de CE.

L'étude décrite ci-après a été réalisée sur 3 mAbs commerciaux rituximab, palivizumab et trastuzumab. Ces IgG 1 ont été approuvées par les autorités mondiales de la santé et du médicament et sont reconnues comme des standards dans la caractérisation des mAbs à tous les niveaux d'étude.

L'objectif de ces travaux était d'obtenir une séparation des isoformes de ces mAbs en un temps relativement court (< 30 min) et de pouvoir caractériser les différences de masses afin d'identifier les PTMs présentes sur ces variants.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le journal scientifique *European Journal of Mass Spectrometry*.

<https://doi.org/10.1177/1469066718807798>

2. Publication : Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry

Jérémy Giorgetti, Antony Lechner, Elise Del Nero, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner. **Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry**, *European Journal of Mass Spectrometry*, 2019, **25**(3), 324-332

2.1. Abstract:

Capillary electrophoresis mass spectrometry coupling (CE-MS) is a growing technique in biopharmaceutics characterization. Assessment of monoclonal antibodies (mAbs) is well known at middle-up and bottom-up levels to obtain information about the sequence, post-translational modifications (PTMs) and degradation products. Intact protein analysis is an actual challenge to be closer to the real protein structure. At this level, actual techniques are time consuming or cumbersome

processes. In this work, a 20 minutes separation method has been developed to optimize characterization of intact mAbs. Thus, separation have been done on a positively-charged coated capillary (PEI) with optimized volatile background electrolyte (BGE) and sample buffer (SB). A sheathless interface allowed to hyphenate CE to a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF) which parameters has been tuned to improve the high masses detection and identification of intact mAbs. Three world-wide health authorities approved mAbs have been used to set up a rapid and ease of use method. Intact trastuzumab, rituximab and palivizumab isoforms have been partially separated with this method in less than 20 minutes under denaturing conditions. For each mAb, 2X-glycosylated and 1X-glycosylated structures have been identified and separated. Concerning basic and acidic variants potential Iso-Asp modification and Asn deamidation have been observed. Accurate mass determination for high-mass molecular species remains a challenge, but the progress in intact mAbs separation appears very promising for biopharmaceutics characterization.

Keywords: Capillary Electrophoresis; Mass Spectrometry; Monoclonal Antibody; micro-variant separation, glycoform separation

[2.2. Introduction](#)

Monoclonal antibodies (mAbs) are tetrameric glycoproteins having a molecular mass of approximately 150 kDa, composed of two heavy chains and two light chains, inter-linked by several disulfide bonds, and having at least one conserved N-glycosylation site located in the Fc domain[2]. mAbs were introduced for the treatment of various diseases in the late 1980 and they still represent the most rapidly growing category of therapeutic molecules today[2-4]. There are more than seventy-five mAbs approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA). mAb are particularly interesting because of their good therapeutic efficiency, favorable pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamics (PD), and relatively low side-effects[5].

Several separation-based methods both on liquid chromatography and electrophoresis are used for antibody characterization and homogeneity assessment[6]. These orthogonal analytical methods aim particularly to separate the antibody main isoform from micro-variants[7]. Micro-variants are commonly observed when mAbs are analyzed by charge-based separation techniques such as isoelectric focusing gel electrophoresis (IEF), capillary IEF (cIEF), imaged cIEF (icIEF), capillary zone electrophoresis (CZE) and ion exchange chromatography (CEX/ AEX)[8]. Many of the modifications leading to the formation of acidic and basic species have been identified as asparagines (Asn)

deamidation, methionines oxidation, aspartic acid isomerization (Iso-Asp), cyclization of glutamic acid or glycosylation. mAb heterogeneity explains the difficulty of separation and identification of each isoform. In a theoretical way, millions of possibilities are available for only one mAb with plenty of weak masses difference between proteoforms. Most of these PTMs have been localized and characterized by different techniques as liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) or capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry coupling (CE-MS/MS)[6, 9-11]. LC-MS/MS and CE-MS/MS analysis, built on a classical bottom-up proteomics strategy, allowed to get a lot of information about mAbs proteoforms and their PTMs but workflows can induce some modifications or degradations of therapeutic proteins.

This last decade, separation of intact mAbs have been studied with several electrophoretic techniques such as CZE, 2D-CE-MS and CZE-MS[12-15]. He *et al* were precursor in the field of intact mAbs separation using CZE-UV. They developed a rapid method using ϵ -amino-caproic acid (EACA) and triethylenetetramine (TETA) as BGE, and hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) as dynamic neutral coating of the capillary[12, 16]. In 2015 Moritz *et al* validated this method by an inter-laboratory study allowing to consider it as the reference method for charge heterogeneity assessment of mAbs[17]. Other approach using UV detection was recently described by Goyon *et al* to set up a simpler CZE method to separate more acidic and basic variants for a dozen of commercial mAbs[18]. However, the composition of BGEs described in these studies are not compatible with ESI-MS detection due to high salt concentration and the presence of detergents and polymers. Since 2017, Neusüß's group developed an original 2D-CE-MS instrumentation allowing the separation of intact mAbs by CZE-CZE-MS and icIEF-CZE-MS[19, 20]. While the first CZE dimension enabling to use the same BGE condition as the reference CZE-UV method described by He *et al*[16], the second dimension allowed the MS characterization by the use of BGEs compatible with ESI-MS detection. Jooß *et al* illustrated their method for the detailed MS characterization of mAbs charge variants[19]. They highlighted glycosylated and deglycosylated variants and potential deamidation products for an intact antibody. While this approach appears very promising, CZE-CZE-MS setup needed heavy instrumental development and the overall analysis time is rather long. More recently, Belov *et al* developed a CZE-ESI-MS method to characterize one unknown IgG1 mAb by both middle-down and intact levels. At the intact level, CZE-ESI-MS analysis were performed under denaturing conditions and using a non-commercial positive coating (M7C4I). Baseline separation of the 2X-glycosylated, 1X-glycosylated, and aglycosylated populations were obtained in nearly 30 minutes[21].

In this report, we developed a 20 minutes CZE-ESI-MS method for the analysis of three well-known approved mAbs at the intact level. Experiments were performed with a commercial positively-charged capillary coating of polyethylenimine (PEI) to avoid adsorption phenomenon. Acidic

background electrolyte (BGE) and acidic methanol/water sample buffer have been optimized in order to obtain micro-variants separation of intact mAbs in less than 20 minutes. Three world-wide health authorities approved mAbs: rituximab (chIgG1, CHO), palivizumab (hzIgG1, SP2/0) and trastuzumab (hzIgG1, CHO), were selected for this study. Comparison with reference CZE-UV methods have been achieved allowing potential characterization of basic and acidic variant regions. Separation of charge variants arising from 2X-glycosylated, 1X-glycosylated pattern has been identified while potential Iso-aspartic acid isomerization (Iso-Asp) and asparagine deamidation have been observed as basic and acidic variants.

[2.3. Experimental](#)

[2.3.1. Chemicals](#)

Chemicals used were of analytical grade or high purity grade and purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). mAbs were obtained as European Union pharmaceutical-grade drug product from their respective manufacturers.

[2.3.2. Sample preparation](#)

For intact mAbs analysis; trastuzumab, rituximab and palivizumab were desalted to remove all residual components of the storage solution. Samples were buffer exchanged with milliQ water three times on Amicon centrifugal filters with a 10 kDa cut off (Merck, Darmstadt, Germany). Each centrifugation was made at 14'000 g speed during 20 min to claw back 30 μ L of mAbs at a concentration of 33.3 μ M. Samples were led to a final concentration in protein of 6.7 μ M using the desired sample buffers.

[2.3.3. Capillary electrophoresis](#)

All of the CE experiments have been done on a CESI8000 capillary electrophoresis system from Sciex Separation (Brea, CA, USA). Bare fused-silica capillaries (total length 100 cm; 30 μ m i.d.) with a porous end from Sciex Separation (Brea, CA, USA) were positively coated with a commercial PolyEthyleneimine (PEI) coating following the protocol provided by Sciex Separation. A second capillary (total length 80 cm; 50 μ m i.d.) was used to complete the electric line of the separation system. Before each analysis, both capillaries were rinsed at 75 psi during 3 min with 3% acetic acid BGE. The 32

Karat™ (Sciex Separation) software was used for instrument control and data acquisition. Hydrodynamic injection (2 psi for 10 sec) corresponding to a volume of 3 nL (0.5% of the capillary length) was used to inject the sample.

[2.3.4. Mass spectrometry](#)

The CE system was hyphenated to a maXis 4G (Bruker, Bremen, Germany) by the sheathless interface. This MS instrument is equipped with a hybrid analyzer composed of hexapoles followed by a time-of-flight (TOF) analyzer. Sample were run in denaturing conditions and analyzed in a m/z range from 2500 to 5000. The Otof control 3.4 software allowed to pilot the nano-ESI source and the settings were the following ones: nanoESI voltage +1500 V, dry gas 3 L/min, ion funnels set at values of 400 and 400 Vpp, isCID energy at 190 eV and source temperature at 150°C. The data acquisition was made in positive mode.

[2.3.5. Data analysis](#)

MS data have been analyzed with the dissect mode of Data Analysis 4.2 software (Bruker, Bremen, Germany) with an internal S/N threshold of 3 and a maximum of 10 overlapping compounds. Cut-off intensity of mass spectrum calculation was set at 0.1 %. After an automatic interpretation of the results, a manual validation has been performed on the results. MS spectra have been extracted from each peak represented on the BPE (Base Peak Electropherogram). Each profile has been selected and deconvoluted between 140 and 160 KDa with the maximum entropy algorithm provided by Bruker's software to calculate the mass of the corresponding compounds. Automatic and manual results have been confronted to detect any mass modifications and get some additional information about the different identified compounds.

[2.4. Results and discussion](#)

In this work, major separation parameters have been selected and optimized based on the agreement of intact mAbs analysis and limits of CE-MS coupling. To avoid protein adsorption on the inner surface of the capillary due to negative charge surface of the silanol groups, bare fused silica capillaries have been previously modified with a covalent coating of PEI which confers positive charge surface of the inner capillary wall and then involves a reverse electro-osmotic flow under an electric

field. Online CZE-ESI-MS coupling excluding the use of non-volatile salts[12], effects of volatile background electrolyte (BGE), sample buffer and injection volume were optimized on the separation of intact trastuzumab. This mAb can be considered as reference material for CZE-ESI-MS method development due to the large number of reports describing the physicochemical properties of the protein[8].

2.4.1. Evaluation of BGE and sample buffer component effect on method development

The most frequently used BGEs in CZE-ESI-MS under denaturing conditions are acetic acid and formic acid because of their conductivity and their volatility allowing a good compatibility with ESI-MS detection[21-24]. In our study, BGEs consisted in acetic acid and formic acid at different concentrations from 1 to 10 % (v/v) and 1 to 5 % (v/v) respectively, were evaluated to keep a current intensity compatible with the separation and to avoid any degradation of capillaries. No separation has been observed with formic acid BGEs in the tested conditions.

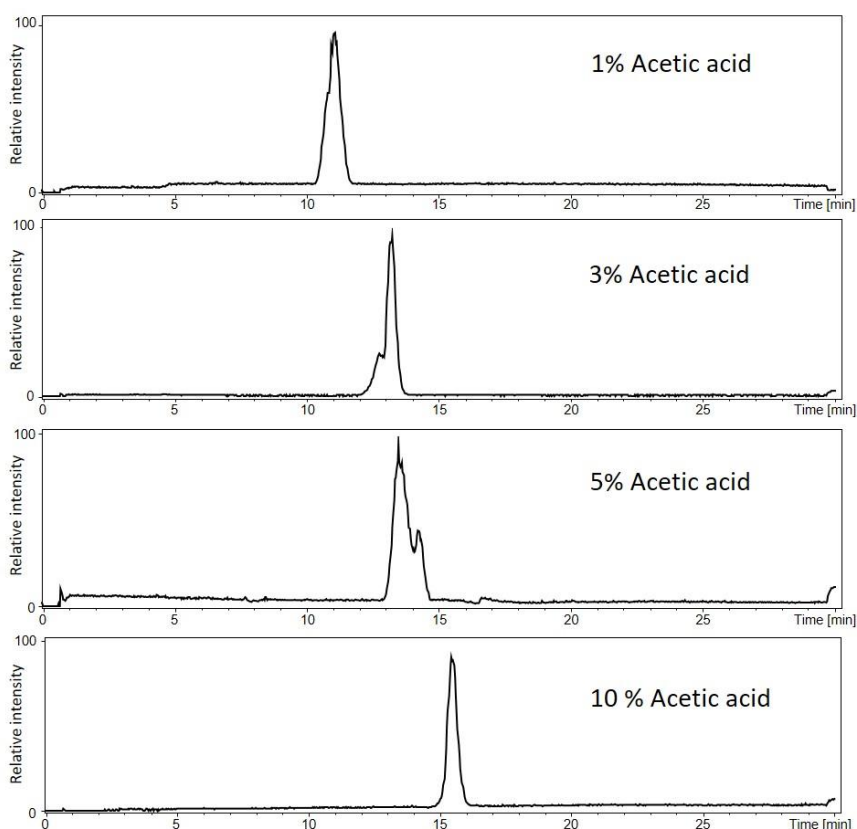


Figure 4.1 : Effect of acetic acid concentration on the separation of trastuzumab charge variants. Acetic acid proportion was set up at 1%, 3%, 5% and 10%.

Concerning acetic acid, increasing concentration from 1 to 10 % induced a time shift for the compounds migration (*Figure 4.1*) due to the increase of ionic strength. 1% and 10% showed only one peak meaning that no separation of mAbs isoforms can be observed. However, 3 and 5 % acetic acid gave partial separation of mAbs with poor resolution. Indeed, obtained peaks were not thin and resolved and deconvolution spectra showed partial overlapping of different isoforms. However, 3 % acetic acid BGE gave the most encouraging separation of intact mAbs and was conserved to the next optimization step.

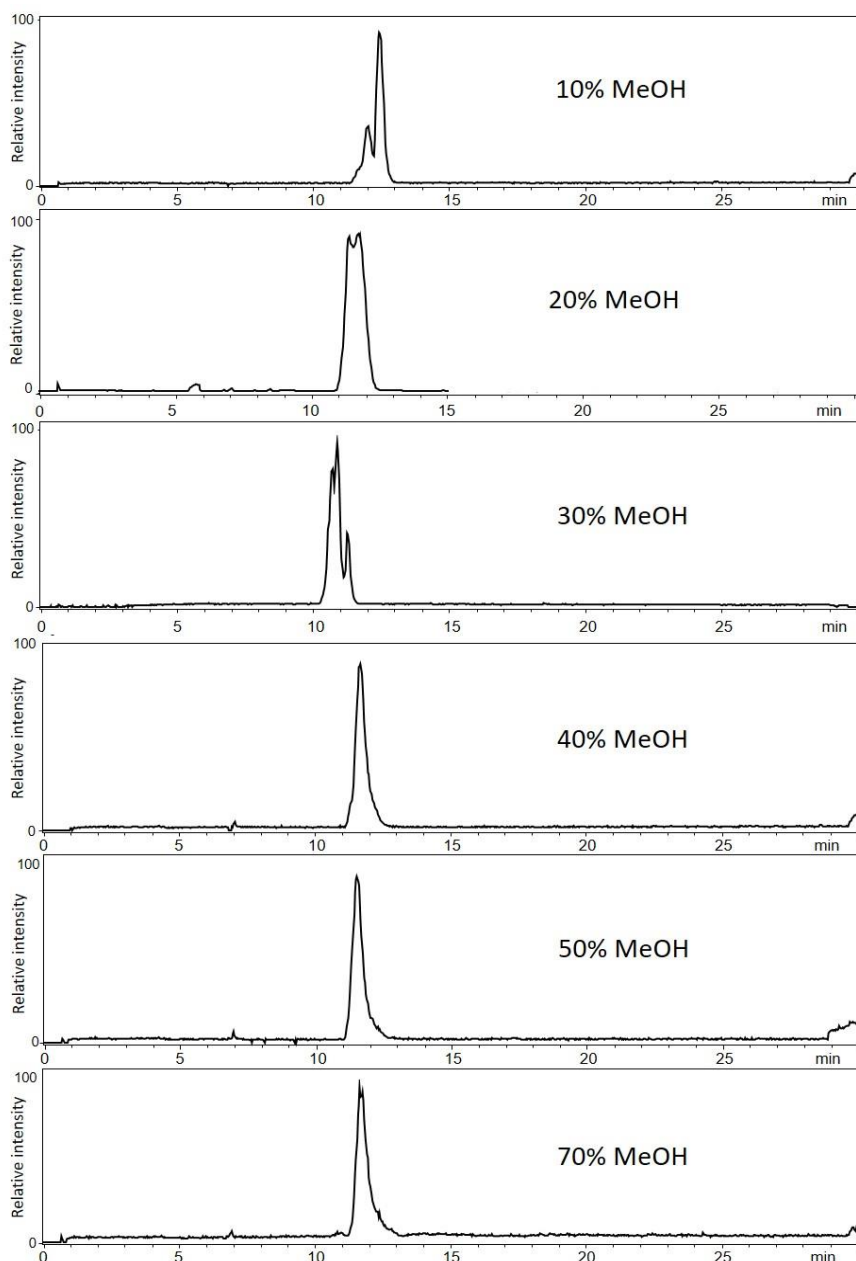


Figure 4.2 : Effect of methanol concentration in the sample buffer for the separation of trastuzumab charge variants. Methanol proportion was set up at 10%, 20%, 30%, 40%, 50% and 70% on 1% formic acid (v/v). The BGE contained 3% acetic acid.

Sample buffer is a parameter which can increase the performance of the separation, for instance due to difference of conductivity with BGE. The first part of this optimization step consisted in testing purified water, acetic acid and formic acid at different concentrations (1 to 10 % (v/v) and 1 to 5 % (v/v) respectively) as sample buffer. Obtained results with purified water and acetic acid showed no increase of resolution in mAbs separation. Only formic acid gave better resolution partly due to the sharpness of the peaks, however, no tremendous increase of separation has been observed. Nevertheless, 1% formic acid has been selected for the following steps. Based on the work of Schwer *et al* who have calculated the influence on the electroosmotic velocity of adding organic solvent to the electrolytes[25], we assessed the addition of methanol at different ratio (10 to 50% (v/v)) in the 1% formic acid sample buffer (*Figure 4.2*). Up to 30 % Methanol, a partial separation was obtained while a total loss of resolution was observed for ratio above 30%. Trastuzumab separation performed with 30 % methanol, 1% formic acid sample buffer exhibited three peaks obtained in less than 15 minutes (RSD < 3% on migration times (n=10)). Other organic solvents have been investigated as acetonitrile and isopropanol in the same proportions, however only methanol has given some good results. Sample injection volume has also been studied to subvert a capillary overloading known to affect the separation of compounds. Trials were done from 1 to 20 nL corresponding to 7 to 350 fmol of mAbs. Better results were obtained by injecting 3 nL (20 fmol) of trastuzumab in the PEI coated capillary.

2.4.2. CZE-ESI-MS characterization of intact mAbs

Since 2010, a some reports described CZE-based methods for the characterization of mAbs charges variants for the quality control of biopharmaceutical companies in terms of product heterogeneity[12-15, 19]. To date, two reports from Reuch's group represents a reference for the analysis of mAbs using CZE with a UV detection [12, 16]. Nevertheless, no structural information can be detailed for the basic and/or acidic variants. In our study, optimized CZE-ESI-MS condition developed on trastuzumab sample has been assessed on two other well-known IgG1 mAbs: rituximab and palivizumab. Obtained results for these three mAbs are showed in *Figure 4.3*. Due to the reverse electroosmotic mode involved by the use of PEI coated capillary, electropherograms of each mAbs exhibited three peaks distributed as acidic variants in the first peak, the main variant in the second peak and basic variants in the third peak. Despite the worst resolution obtained in CZE-ESI-MS as compared to reference CZE-UV method which can be easily understood by the difference of BGE condition (pH 5.7, presence of TETA...) and the inverted profiles of the three regions due to reverse mode, obtained CZE-ESI-MS electropherograms fitted well with reference CZE-UV electropherograms.

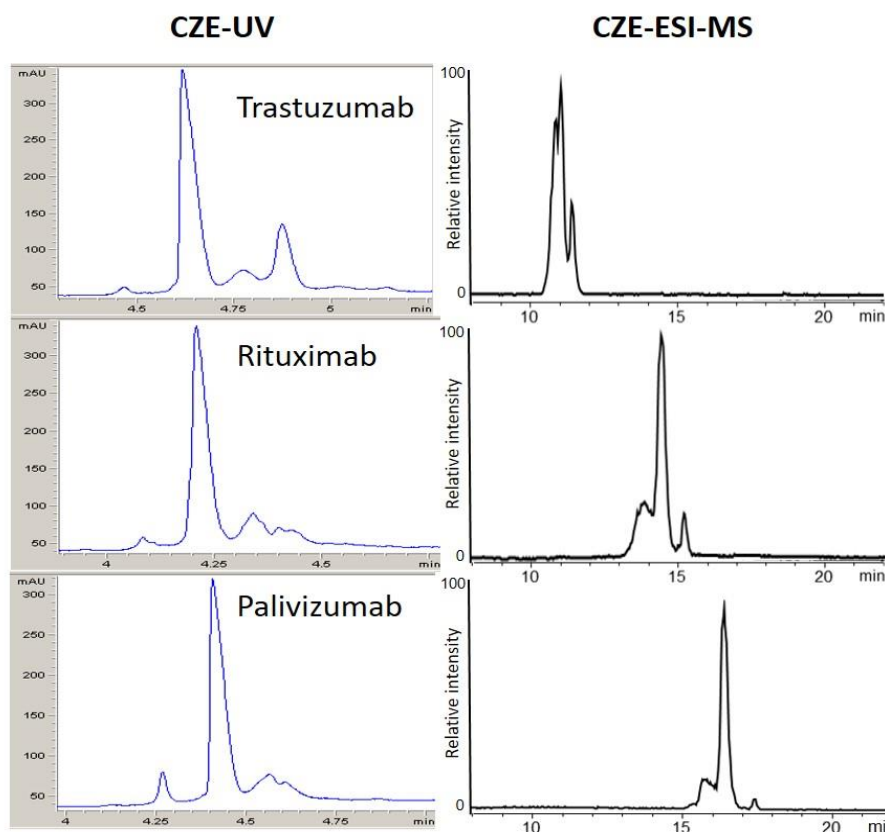


Figure 4.3 : CZE-ESI-MS separation of intact trastuzumab, rituximab and palivizumab obtained with the optimized settings and CZE-UV profiles according to the methodology of He *et al* [16]. Reprinted from [18].

Each mAbs following quite well similar behavior in appearance, trastuzumab has been chosen to illustrate globally the obtained MS results. However, differences will be detailed for rituximab and palituzumab. For each peak, deconvoluted mass spectra exhibited the classical glycoform pattern of trastuzumab (Figure 4.4). Focused on the three highest abundance glycoforms of the main peak, average masses of $148,057 \pm 3$ Da, $148,218 \pm 2$ Da, and $148,380 \pm 3$ Da were measured corresponding to G0F/G0F, G0F/G1F, and G1F/G1F glycoforms respectively. Mass delta of around 162 Da between the three glycoforms agreed with the theoretical mass of a galactose moiety. However, glycan structure with the addition of galactose moieties does not induce a change in net charge[26-28]. Gahoual and co-workers demonstrated that particular glycopeptides having a difference of one galactose could be baseline separated[9] whereas Redman *et al* did not observe mobility shifts between intact mAb glycoforms due to the low impact of 162 Da on the global mass of the mAb ($\approx 0.1\%$)[24]. Our work follows Redman *et al* observations with no separation of intact mAb variants due to differences of 2X-glycosylated forms. However, in each cases, manual analysis of raw data enabled to characterize 1X-glycosylated forms overlapping with the last peak meaning that separation

between 2X-glycosylated and 1X-glycosylated forms are obtained for the three mAbs. This confirms the results recently described by Belov *et al* on an unknown mAbs[21].

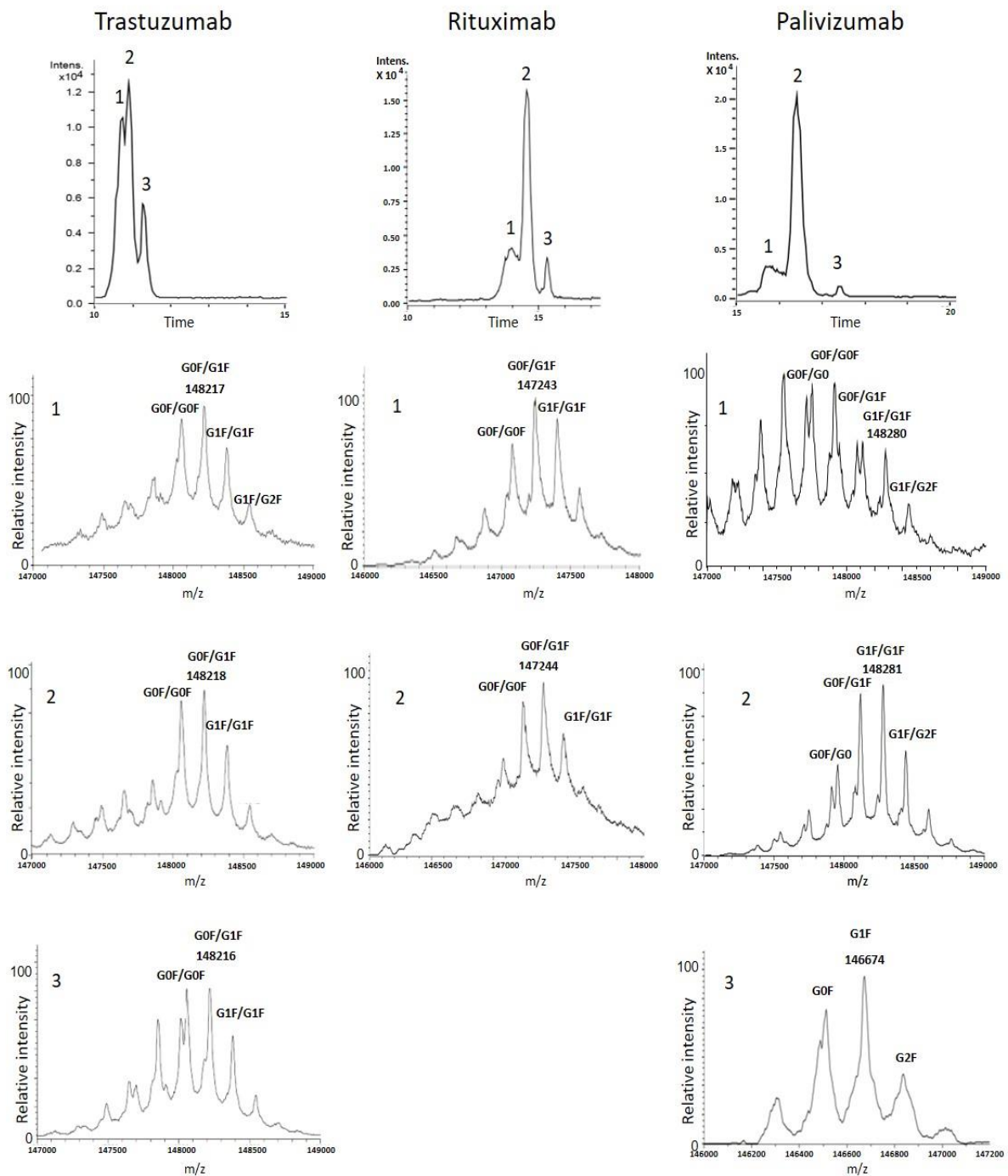


Figure 4.4 : CZE-ESI-MS separation of intact trastuzumab, rituximab and palivizumab obtained with the optimized settings. For each mAbs, deconvoluted mass spectra was performed for the basic variant (1), main variant (2), and acidic variant (3).

For each mAb, peaks corresponding to possible acidic or basic variants have been deconvoluted. Concerning basic variant, a mass difference of -1 to -2 Da compared with the main variant was observed for the three mAbs ($148,217 \pm 4$ Da as compared to $148,218 \pm 3$ Da for trastuzumab), while a mass difference of -2 Da was observed only for trastuzumab ($148,216 \pm 4$ Da) for acidic variant. As already described in the literature, the most important antibody basic charge variants are iso-Asp modification, C-terminal Lys truncation, aglycosylation, incomplete cyclization of the N-terminal glutamine (Gln) to pyroGlu or methionine oxidation; whereas sialylation, asparagine deamidation, glycation, cysteinylolation are the most commonly observed acidic variants[29]. Trastuzumab possesses several Asp and Asn residues in its amino acid sequence which can be potentially iso-Asp or deamidated[11, 30]. Even if the standard deviation of mass measurement less than 4 Da doesn't allow to conclude without any ambiguity on the exact nature of the modification, we can explain the mass shift of less than 2 Da by potential iso-Asp modification for basic charge variants and potential Asn deamidation for acidic charge variants. These results are in agreement with the literature obtained for the characterization of trastuzumab in a 2D-CZE-MS coupling[19]. However, while rituximab and palivizumab also possess potential modified Asn, no acidic variant characterization has been observed using our CZE-ESI-MS condition. Indeed, for rituximab, third peak deconvoluted mass spectrum gives any masses corresponding to intact mAbs or degradation products but an unknown impurity, and for palivizumab, deconvoluted mass spectra fitted with 1X-glycoform pattern. These results can potentially ask the real nature of acidic variants found by the CZE-UV reference methods for these two mAbs and highlights the constant need of method development with MS detection to obtain structural characterization.

2.5. Conclusion

In this study, trastuzumab, rituximab and palivizumab were analyzed at the intact level by CZE-ESI-MS. A rapid separation method has been developed to characterize these commercial mAbs under denaturing condition. A PEI positive coating has been set up to avoid protein adsorption on the inner surface of the capillary. Separation has been performed in 3% acetic acid BGE at 30 kV and sample buffer has been optimized to 30% methanol, 1% formic acid with each mAbs to a final concentration of 6.7 μ M. CZE-ESI-MS analysis of these three mAbs showed partial separation obtained in less than 20 minutes allowing identification of mAbs isoforms. As a first result, CZE-ESI-MS electropherograms fitted quite well with reference CZE-UV electropherograms allowing a potential characterization of the basic and acidic variant regions. For each mAbs, 2X-glycosylated and 1X-glycosylated structures has been identified and separated. Concerning basic and acidic variants, minor differences between 0 to 2

Da have been observed suggesting potential Iso-Asp modification and Asn deamidation. However, mass precision didn't allow to conclude without any ambiguity on the nature of these modifications. Accurate mass determination for high-mass molecular species remains a challenge, but the progress in intact mAbs separation appears very promising and could be recognized as an additional step in biopharmaceutics characterization.

[2.6. Acknowledgments](#)

Authors would like to thank Sciex and Bruker Daltonics for the fruitful collaboration and the support. The authors would like also to express their gratitude to Dr. E. Wagner-Rousset, , MC. Janin-Bussat and O. Colas (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France) for helpful discussions around antibody structural characterization by LC-MS. This work was supported by the CNRS (UMR 7140), the University of Strasbourg, and a doctoral fellowship from Bruker Daltonics and the General Council of Region Grand Est to JG.

2.7. References

1. Teicher, B.A. and R.V.J. Chari, *Antibody Conjugate Therapeutics: Challenges and Potential*. Clinical Cancer Research, 2011. **17**(20): p. 6389.
2. Berger, M., V. Shankar, and A. Vafai, *Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies*. The American Journal of the Medical Sciences, 2002. **324**(1): p. 14-30.
3. Reichert, J.M., *Marketed therapeutic antibodies compendium*. mAbs, 2012. **4**(3): p. 413-415.
4. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 345-352.
5. Wang, W., et al., *Antibody structure, instability, and formulation*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(1): p. 1-26.
6. Fekete, S., et al., *Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(1): p. 480-507.
7. Doneanu, C.E., et al., *Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry*. Mabs, 2012. **4**(1): p. 24-44.
8. Gahoual, R., et al., *Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products*. Journal of Chromatography B, 2016. **1032**: p. 61-78.
9. Gahoual, R., et al., *Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(18): p. 9074-9081.
10. Said, N., et al., *Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis – Tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method*. Analytica Chimica Acta, 2016. **918**: p. 50-59.
11. Gahoual, R., et al., *Independent highly sensitive characterization of asparagine deamidation and aspartic acid isomerization by sheathless CZE-ESI-MS/MS*. Journal of Mass Spectrometry, 2016. **51**(2): p. 150-158.
12. He, Y., et al., *Analysis of Identity, Charge Variants, and Disulfide Isomers of Monoclonal Antibodies with Capillary Zone Electrophoresis in an Uncoated Capillary Column*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(8): p. 3222-3230.
13. Schlecht, J., K. Jooß, and C. Neusüß, *Two-dimensional capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-CE-MS): coupling MS-interfering capillary electromigration methods with mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018.
14. Han, M., et al., *Intact mass analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis–Mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2016. **1011**: p. 24-32.
15. Belov, A.M., et al., *Analysis of Proteins, Protein Complexes, and Organellar Proteomes Using Sheathless Capillary Zone Electrophoresis - Native Mass Spectrometry*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2017. **28**(12): p. 2614-2634.
16. He, Y., et al., *Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(5): p. 548-555.
17. Moritz, B., et al., *Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies*. Journal of Chromatography B, 2015. **983–984**(1): p. 101-110.
18. Goyon, A., et al., *High-resolution separation of monoclonal antibodies mixtures and their charge variants by an alternative and generic CZE method*. Electrophoresis, 2018. **39**(16) p.2083-2090.
19. Jooß, K., et al., *Two-dimensional capillary zone electrophoresis–mass spectrometry for the characterization of intact monoclonal antibody charge variants, including deamidation products*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017. **409**(26): p. 6057-6067.

20. Montealegre, C. and C. Neusüß, *Coupling imaged capillary isoelectric focusing with mass spectrometry using a nanoliter valve*. *Electrophoresis*, 2018. **39**(9-10): p. 1151-1154.
21. Belov, A.M., et al., *Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis – mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2018. **39**(16): p. 2069-2082.
22. Faserl, K., et al., *Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(19): p. 7297-7305.
23. Haselberg, R., et al., *Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **698**(1-2): p. 77-83.
24. Redman, E.A., et al., *Characterization of Intact Antibody Drug Conjugate Variants Using Microfluidic Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2016. **88**(4): p. 2220-2226.
25. Schwer, C. and F. Lottspeich, *Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer systems*. *Journal of Chromatography*, 1992. **623**(2): p. 345-355.
26. Biacchi, M., et al., *Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS*. *Analytical Chemistry*, 2015. **87**(12): p. 6240-6250.
27. Raju, T.S. and B.J. Scallon, *Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. **341**(3): p. 797-803.
28. Liu, H.C., et al., *Heterogeneity of monoclonal antibodies*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008. **97**(7): p. 2426-2447.
29. Du, Y., et al., *Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies*. *mAbs*, 2012. **4**(5): p. 578-585.
30. Gahoual, R., et al., *Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*. *Mabs*, 2013. **5**(3): p. 479-490.

3. Conclusion

Durant ces travaux, les paramètres majeurs permettant une séparation d'isoformes de glycoprotéines ont été étudiés et optimisés. Une fois les paramètres de détection en MS ajustés, les essais se sont portés sur le choix du greffage à instaurer à l'intérieur du capillaire pour en masquer les charges négatives. Un premier greffage neutre au polyacrylamide (PA) a été employé. Cependant, étant donné la nature neutre de ce greffage, le phénomène d'électro-osmose était nul et donc l'ajout d'une pression à l'intérieur du capillaire était requis afin d'obtenir une séparation. Les premiers résultats montrèrent une trainée de pic sur les électrophérogrammes traduisant un phénomène d'adsorption toujours présent. L'utilisation de ce greffage n'a donc pas été poursuivie. Un nouveau test a été réalisé en utilisant cette fois un greffage cationique au polyéthylèneimine (PEI). Le greffage au PEI dépose une couche de cations qui permettent de conserver le phénomène d'électro-osmose nécessaire à la séparation des mAbs en CE. Les essais sur le trastuzumab se sont montrés concluants puisque que très peu voire pas de protéines ne s'adsorbaient sur la paroi interne du capillaire.

Les autres paramètres étudiés ont été le volume d'injection, la nature du BGE ainsi que la concentration, la nature du solvant d'échantillon, l'ajout de solvants organiques dans ce solvant d'échantillon ainsi que la tension de séparation. Différents points de mesure ont été expérimentés jusqu'à obtenir une séparation partielle de 3 isoformes pour le trastuzumab. Le volume d'échantillon a été fixé à 10 nL, dans un solvant composé d'acide formique, d'eau et de méthanol (1/69/30) (v/v/v). Le méthanol a été choisi à la suite de travaux repris dans la littérature qui montraient l'influence de divers solvants organiques dans la séparation en électrophorèse capillaire. Le BGE choisi est de l'acide acétique avec une concentration ajustée à 3 % et la tension de séparation a été fixée à 30 kV afin d'obtenir une séparation plus rapide mais aussi efficace qu'à une tension moins élevée.

Des premiers travaux avaient été décrits peu de temps avant dans la littérature en utilisant des mAbs non commerciaux ou des greffages différents. Les séparations obtenues montraient moins de micro-variants ainsi que des séparations plus chronophages (+50 %). En utilisant l'ensemble des paramètres décrits dans ce chapitre, plusieurs isoformes de trastuzumab, palivizumab et rituximab ont été partiellement séparées, démontrant l'intérêt de la CE-MS dans la séparation de mAbs entiers et de leurs micro-variants. Les natures des différentes micro-hétérogénéités présentes sur ces variants ont également pu être caractérisées. Les PTMs identifiées sont divers profils de glycosylations, notamment avec des mAb 2X-glycosylés, 1X-glycosylé ou aglycosylés. De plus, des PTMs de masse plus faibles ont également été potentiellement caractérisées telles que de possibles oxydations de méthionine ou encore déamidations de résidus asparagine.

Ces travaux montrent la possibilité de caractériser des glycoprotéines de masse importante, séparer les variants de ces molécules afin de pouvoir optimiser les traitements administrés aux patients souffrant de diverses maladies. La faible préparation d'échantillon ainsi que le temps minimaliste d'étude permettent d'obtenir une illustration de la répartition des isoformes des mAbs plus proche du réel que les autres méthodes actuellement employées pour la caractérisation des mAbs. Ce niveau d'étude étant le plus complexe des niveaux d'analyse de protéine, il démontre la puissance des techniques combinées d'électrophorèse capillaire et de spectrométrie de masse pour la caractérisation de biomolécules thérapeutiques.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont servi de preuve de concept dans la séparation de mAbs à l'échelle de la molécule intacte. La suite de nos travaux a été de mettre en place une stratégie similaire à celle décrite précédemment translatée à un niveau d'étude intermédiaire. Ce niveau appelé middle-up s'intercale entre le niveau peptidique (bottom-up) et le niveau de molécule intacte. L'étude des mAbs au niveau middle-up a pour objectif de confirmer les résultats obtenus aux autres échelles mais aussi d'étoffer la liste des PTMs identifiées.

Chapitre V : Caractérisation multi-niveaux d'anticorps monoclonaux par un couplage CE-ESI-MS

1. Introduction

Le développement de méthode de CE-MS mis en place au cours de ces travaux de thèse a permis d'avoir une idée de la répartition des variants de mAb au niveau intact. La haute masse moléculaire des mAbs ainsi que les nombreuses micro-hétérogénéités présentes sur ces protéines restreignent le nombre et la qualité des informations obtenues par CE-MS. L'étude des molécules intactes se heurte aux limites technologiques actuelles et verrouille la sensibilité et la résolution obtenues par les spectres MS. Une seconde étude à un niveau intermédiaire « middle-up » basée sur le développement de méthode précédemment décrit a été réalisée afin d'analyser les variants de mAbs et les PTMs présentes sur ces derniers. Pour cela, une digestion enzymatique partielle spécifique a été réalisée afin d'obtenir des fragments plus petits (25 et 50 kDa) et donc favoriser leur séparation et leur détection. L'étude de ces fragments de masse moins importante a permis d'avoir de meilleures sensibilité et précision de mesure tout en conservant une combinaison partielle des PTMs présentes sur les différents fragments. L'avantage majeur de ce niveau intermédiaire est qu'il permet de faire le lien entre le niveau « bottom-up » et le niveau de la molécule intacte en illustrant les combinaisons de PTMs présentes sur les différents variants ainsi que leur localisation. Le protocole de digestion partielle a été perfectionné afin de limiter les étapes de préparation d'échantillon et donc éviter la formation de modifications artéfactuelles sur les fragments de mAbs. Une étape de réduction a également été réalisée afin de confirmer les résultats obtenus en « middle-up » en étudiant d'autres types de fragments (LC et Fd) pour pouvoir croiser les résultats et ainsi confirmer les PTMs identifiées et leur localisation.

Notre étude s'est portée sur 7 mAbs commerciaux et a montré la robustesse de la méthode CE-MS développée pour le niveau de protéine intacte afin d'obtenir une séparation partielle de plusieurs isoformes de chaque fragment. La comparaison des résultats obtenus aux différents niveaux permet alors d'avoir une caractérisation complète et multi-niveaux de différents mAbs.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication actuellement en cours de soumission dans le Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

2. Publication : Combination of intact, middle-up and bottom-up levels to characterize 7 therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis – mass spectrometry

Jérémie Giorgetti, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François, **Combination of intact, middle-up and bottom-up levels to characterize 7 therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis – mass spectrometry**, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, *submitted*

2.1. Abstract:

Significant growth of biopharmaceuticals requires powerful analytical methods to better understand their structure by establishing a complete characterization. To this end, a combination of bottom-up, middle-up and intact molecule levels with a capillary electrophoresis-mass spectrometry coupling has been performed to have a comprehensive picture of monoclonal antibodies. In this study, 7 worldwide health authorities approved mAbs have been analyzed to get information about their charge heterogeneity, the identification of post translational modifications (PTMs), their location and relative quantitation. Intact mAbs isoforms have been partially separated in less than 12 minutes and enabled to have a global illustration of mAbs heterogeneity and high masses PTMs characterization notably major N-glycosylation forms. Particularly, 2x glycosylated and 1x glycosylated forms have been partially separated. To deepen characterize PTMs carried by the backbone structure, advanced investigations at a middle-up level have been performed. Limited IdeS proteolysis allowed to study independently Fc/2 and F(ab)'2 fragments. Following the same separation conditions, isoforms of these fragments have been separated and data interpretation allowed to disclose additional PTMs as K-clip, oxidations or deamidations. A second intermediate level has been examined by adding a reduction step to establish a more precise assessment of PTMs and isoforms from the F(ab)'2 fragment. This reduction step released the light chains from the Fd fragment to get only 25 kDa fragments to analyze. CE-ESI-MS coupling allowed to get more information particularly about low masses PTMs. The precise location and relative quantitation of each PTM has been investigated at the peptidic level induced by a tryptic digestion of the studied mAbs. The concordance of the results shows the efficiency of the CE-ESI-MS coupling to characterize mAbs and highlight the need of the multi-level combination to get a comprehensive characterization of biotherapeutics.

Keywords: Capillary electrophoresis, mass spectrometry, monoclonal antibody, micro-variant separation, glycoform separation, intact molecule, middle-up level, bottom-up level

2.2. Introduction:

Over the last decades, the expanding development of monoclonal antibodies (mAbs) has led to numerous solutions employed in therapeutic treatment. These glycoproteins become one of the main class of biopharmaceuticals involved in various treatment such as cancers, auto-immune disease but also to prevent transplant rejection [1-3]. Nowadays, more than 70 mAbs have been approved by worldwide health authorities and commercially available and 80 candidates are in the last phase of clinical trials [4]. The increasing number of candidates is supported by the expanding range of biological targets identified and high specificity of mAbs to the corresponding antigens. MAbs production processes are based on cell lines inducing their own modifications that irremediably elicits a diversity of isoforms. The mixture of proteoforms involved by the variety of macro and micro-heterogeneities leads to a charge heterogeneity. It can be explained by post-translational modifications (PTMs) such as N-glycosylations, partial amino-acid sequence cleavage, deamidations or oxidations which can occur during fabrication, purification, conditioning or storage steps. Combining certain of these PTMs may result in a difference of biological activity of the treatment or affect the stability and safety of the drugs.

Currently, a large panel of analytical techniques are required to perform an advanced characterization of mAbs among biotherapeutics [5, 6]. Mass spectrometry (MS) is now recognized as a major tool in protein structural characterization [7]. The continuous evolution of separative techniques and MS hyphenation enhances protein mixtures understanding and is widely applicable in mAbs assessments [8-10]. On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry coupling *via* an electrospray ionization interface (CE-ESI-MS) has already proved its ability to separate and characterize micro-variants of mAbs [11-13]. The effectiveness of miniaturized systems oriented our strategy to CE-ESI-MS to separate and characterize mAbs proteoforms. It offers the possibility to combine protein separation and analysis at different levels such as bottom-up, middle-up and intact levels that justifies its use in biotherapeutic characterization [14-16]. Indeed, the intrinsic heterogeneity of mAbs involves the need of a comprehensive characterization in order to obtain a model the most realistic of the real drug.

Traditional mAb characterization has been operated following a “bottom-up” strategy with a LC-MS/MS coupling or more recently with a sheathless CE-ESI-MS/MS coupling [9, 17]. Although the important ability to identify different proteoforms with minor micro-heterogeneities, this approach can occur some artifactual modifications due to sample preparation and chemical treatment. This limitation can be surpassed by a comprehensive structural characterization at higher levels as middle-up and intact molecule approaches. These respectively intermediate and ultimate levels seem to be

particularly interesting for biopharmaceutical companies because of their ability to illustrate the heterogeneity of produced mAbs. Middle-up level can be performed by digesting mAbs with IdeS protease which cleaves Immunoglobulins (IgGs) under the hinge region between 2 Glycine residues at a specific amino-acid sequence CPPCPPELLG/GPSVF to obtain Fc/2 fragments (25 kDa) and F(ab)'₂ fragment (100 kDa). Optional reducing step can be done to reduce intra-chain and inter-chain disulfide bonds to cleave the F(ab)'₂ fragment by releasing the light chain (LC) (25 kDa) from the Fd fragment (25 kDa), facilitating the mAb assessment. To complete mAbs characterization, an intact protein level corresponding to the highest analytical level of mAbs has been investigated. Based on the CE-ESI-MS development previously described by our group, a partial separation of intact mAbs has been performed and spectra interpretation highlighted a charge heterogeneity which may be explained by a combination of PTMs [18]. As expected, PTMs characterized at this upper level are essentially high weight major modifications as N-glycosylations but surprisingly it also disclosed some common low masses PTMs as oxidations or deamidations.

In this work, we report the development of a multi-level combined approach implementing a complete structural characterization of mAbs based on a CE-ESI-MS coupling. Adalimumab (huIgG1, CHO), natalizumab (hzIgG4, NS0), nivolumab (huIgG4, CHO), palivizumab (hzIgG1, SP2/0), infliximab remicade® (chIgG1, SP2/0), rituximab (chIgG1, CHO) and trastuzumab (hzIgG1, CHO) were the seven commercial mAbs considered in this multi-level assessment.

[2.3. Experimental:](#)

[2.3.1. Chemicals](#)

Chemicals used were of analytical grade or high purity grade and purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). Adalimumab, Natalizumab, Nivolumab, Palivizumab, Infliximab, Rituximab and Trastuzumab were obtained as European Union pharmaceutical-grade drug product from their respective manufacturers.

2.3.2. Sample preparation

Intact level

For intact mAbs analysis, samples were desalted to remove all residual components of the storage solution. Samples were buffer exchanged with milliQ water three times at 4°C on Amicon centrifugal filters with a 10 kDa cut off (Merck, Darmstadt, Germany). Each centrifugation was made at 14'000 g speed during 20 min to claw back mAbs at 33.3 µM. Then, mAbs were led to a final concentration of 6.7 µM using formic acid 1% - methanol 30% (v/v).

Middle-up level

MABs were clived under the hinge region with IdeS enzyme (FabRICATOR®, Genovis), to obtain two Fc/2 fragments and one f(ab)'2 fragment. Samples were diluted in 200 mM ammonium bicarbonate pH 6.5 to a final concentration of 1 g/L. A volume of 2.24 µL of IdeS (67 U/µL) was added to each sample and left at 37°C for 45 min. After digestion, three desalting steps were performed with milliQ water on Amicon centrifugal filters with a 10 kDa cut off at 4°C and 14'000 g for 20 min. Then, mAbs were led to a final concentration of 6.7 µM using formic acid 1% - methanol 30% (v/v).

Middle-up reduced level

After IdeS digestion, 20 mM TCEP was added to samples then left 30 minutes at room temperature to reduce disulfide bonds on F(ab)'2 fragments. The reduction of F(ab)'2 fragments results in the dissociation of the light chain (LC) and the Fd fragment. After reduction, three desalting steps were performed with milliQ water on Amicon centrifugal filters with a 10 kDa cut off at 4°C and 14'000 g for 20 min. Then, mAbs were led to a final concentration of 6.7 µM using formic acid 1% - methanol 30% (v/v).

Bottom-up level

A volume corresponding to 100 µg (0.67 nmol) of protein was used. Samples were first diluted from stock solution to a concentration of 45.6 µM by using milliQ water. A second dilution to a concentration of 22.2 µM was performed by using 0.1% RapiGest surfactant an incubation at 40°C for 10 min. Reduction of the samples was then achieved by the addition of dithiothreitol (DTT, final concentration of 25 mM) and incubation at 95°C for 5 min. To perform tryptic digestion, a volume of 1 µL of trypsin (0.5µg/µL) was added to the samples that were left at room temperature for 3h. Then another volume of 1µL was added afterward and digestion was performed overnight at 37°C. In order

to cleave the surfactant, formic acid (FA) was added to the samples at a final concentration of 1% (v/v) and samples were left at room temperature (RT) for 2h. Samples were finally diluted to a final protein concentration of 2.2 μ M using ammonium acetate 200 mM (pH 4.0).

2.3.3. Capillary Electrophoresis

All of the CE experiments have been done on a CESI8000 capillary electrophoresis system from Sciex Separation (Brea, CA, USA) hyphenated to a timsTOF Pro (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). For Intact and middle-up levels analysis, bare fused-silica capillary (total length 100 cm; 30 μ m i.d.) with porous tip on its end have been positively coated with polyethyleneimine (PEI) following Sciex protocols. A second capillary (total length 80 cm; 50 μ m i.d.) allowed electric contact after a filling step of both with 3% acetic acid background electrolyte (BGE). Before each run, capillaries were flushed 3 min at 50 psi with BGE. Samples were injected at 2 psi 10 sec and separations were performed at 30 kV during 15 min. No capillary wash was done between each run. For tryptic digests, analyses have been performed on a bare fused silica capillary (total length 100 cm; 30 μ m i.d.). BGE was acetic acid 10 % and 100 nL of 2.2 μ M of mAbs have been injected in the capillary. Runs length was set at 20 kV during 60 min each.

2.3.4 Mass spectrometry

For each analysis level of mAbs, CE was hyphenated to a timsTOF Pro (Bruker daltonics, Bremen, Germany). This equipment is a hybrid mass spectrometer composed of an ion mobility cell, a quadrupole followed by a time-of-flight (TOF) analyzers. Contrary to bottom-up level, ion mobility cell was switch off for intact and intermediate analysis levels. Nano-ESI source parameters were set as follow: nanoESI voltage +1.5 kV while dry gas supplies was 1.2 l/min, source heating temperature 150°C. Mass/charge (m/z) range was 1000 – 5000 in MS for intact mAbs analysis, 1000 – 4000 in MS for intermediate levels and 400 – 3000 for peptide level. Data processing was performed with DataAnalysis 5.1. Deconvolution of mass spectra was done using ESI Compass Maximum Entropy deconvolution option. All spectra were calibrated by external calibration using Peptide mix from Bruker.

2.3.5. Data analysis

MS data were analyzed with the dissect mode of DataAnalysis 5.1 software with an internal S/N threshold of 3 and a maximum of 10 overlapping compounds. Cut-off intensity of mass spectrum calculation was set at 0.1 %. After an automatic interpretation of the results, a manual validation has been performed on the results. MS spectra have been extracted from each peak represented on the base peak electropherogram. For intact mAbs analyses, each profile has been selected and deconvoluted between 140 and 160 kDa with the maximum entropy algorithm of DataAnalysis 5.1. to calculate the mass of corresponding compounds. Spectra obtained at the middle-up have been deconvoluted between 20 and 30 kDa for Fc/2, Fd and LC fragments and 90 to 100 kDa to identify f(ab)[']2 fragment. Finally, fragments earned with reduction step added to the partial digestion with IdeS were sought only between 20 and 30 kDa. Manual and automatic results have been confronted to theoretical masses to detect any mass modification and get additional information about the characterized compounds.

2.4. Results and discussion

2.4.1. Intact level

Regarding capillary zone electrophoresis (CZE)-based methods for the characterization of mAbs charges variants, until 2016, almost all literature described quality control application in terms of product heterogeneity using CZE with UV detection [17, 19]. However, strategies with optical detection didn't allow to obtain structural information for the basic and/or acidic variants representing the limitation of these methodologies. These last years, some reports revealed the usefulness of CZE-MS for the assessment of macro-heterogeneity [13, 18, 20]. MS resolving power coupled CZE efficiency exhibited the baseline separation as well of 2X-glycosylated, 1X-glycosylated and aglycosylated population as the characterization of various other PTMs such as deamidation, oxidation or lysine clipped forms. In each cases, CZE experimental conditions are based on the use of a neutral or positive coated capillaries to avoid protein adsorption on the inner surface of the capillary wall. Indeed, due to the negative charge surface of the silanol groups, electrostatic interactions imply peak tailing phenomena degrading separation efficiency. Different strategies as positive polyethylenimine (PEI) or uncharged polyacrylamide coatings have been investigated [18, 20]. In a previous study, our group detailed a CZE-MS methodology to perform the analysis of mAbs at the intact level. Based on the use of a PEI coated capillary, acidic background electrolyte (BGE) and acidic methanol/water sample buffer,

micro-variant separations of intact mAbs have been observed in less than 20 minutes. In the present study and in order to assess the methodology, this CZE-MS method has been applied to seven worldwide health authorities approved mAbs. Separation obtained (*Figure 5.1*), showed differences of profile depending on the nature of the mAbs. This expected result can be explained by the difference of heterogeneity of each mAbs added to the difference of pI values (from 7.1 to 9.1 [21]). However, a general profile can be observed with the main peak surrounded by acidic variants before and basic variants after. This order of separation is explained by the use of positive coated capillary which confers a reverse electroosmotic mode. MS data processing consisted to integrate and deconvolute each peak of the based peak electropherogram. Results of identified isoforms for the seven mAbs are given in the *Table 5.S1* of the supporting information. As a first PTMs characterization step about cyclisation of glutamine (Glu) or glutamic acid (E), seven mAbs have to be compared in two groups. Indeed, three analyzed mAbs (adalimumab, infliximab, trastuzumab) own N-terminal Glu residue while four others (nivolumab, palivizumab, natalizumab, rituximab) own N-terminal Gln. Concerning the Glu residue's group, no cyclisation has been observed while 100% of 2X-pyroGln have been identified for the Gln residue's group. These results mean that either the mAbs are not modified or MS sensitivity is not sufficient to detect small amounts of modified mAbs. Only the analysis at a lower level of complexity can answer this question. Concerning the other PTMs, adalimumab will be select as a representative example to illustrate these obtained MS results (*Figure 5.2*). For each peak, deconvoluted mass spectra exhibited a glycoform pattern corresponding to 2X-glycosylated and 1X-glycosylated forms. Focused on the 2X-glycosylation populations, measured average masses (*Table 5.1*) corresponding to G0F/G0F, G0F/G1F and G0F/G0F-GlcNac while G0F and G1F are identified for the 1X-glycosylated forms.

Fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
	G0F	146619	146635		10.55	16
	G1F	146781	146797		10.55	16
	G0F/G0F-GlcNac	147861	147877		10.45	16
	G0F/G0F-GlcNac	147867	147876		10.15	9
	G0F/G0F-GlcNac	147869	147877		10.05	8
	G0F/G0F-GlcNac	147871	147877		9.95	6
	G0F/G0F	148064	148080		10.45	16
	G0F/G0F	148070	148080		10.15	10
	G0F/G0F	148071	148080		10.05	9
	G0F/G0F	148075	148080		9.95	5
	G0F/G1F	148227	148242		10.45	15
	G0F/G1F	148232	148242		10.15	10
	G0F/G1F	148232	148242		10.05	10
	G0F/G1F	148236	148242		9.95	6

Table 5.1: Assignment of species observed for intact Adalimumab after CZE-ESI-MS analysis. Annotation: see supporting information Figure 5S1.

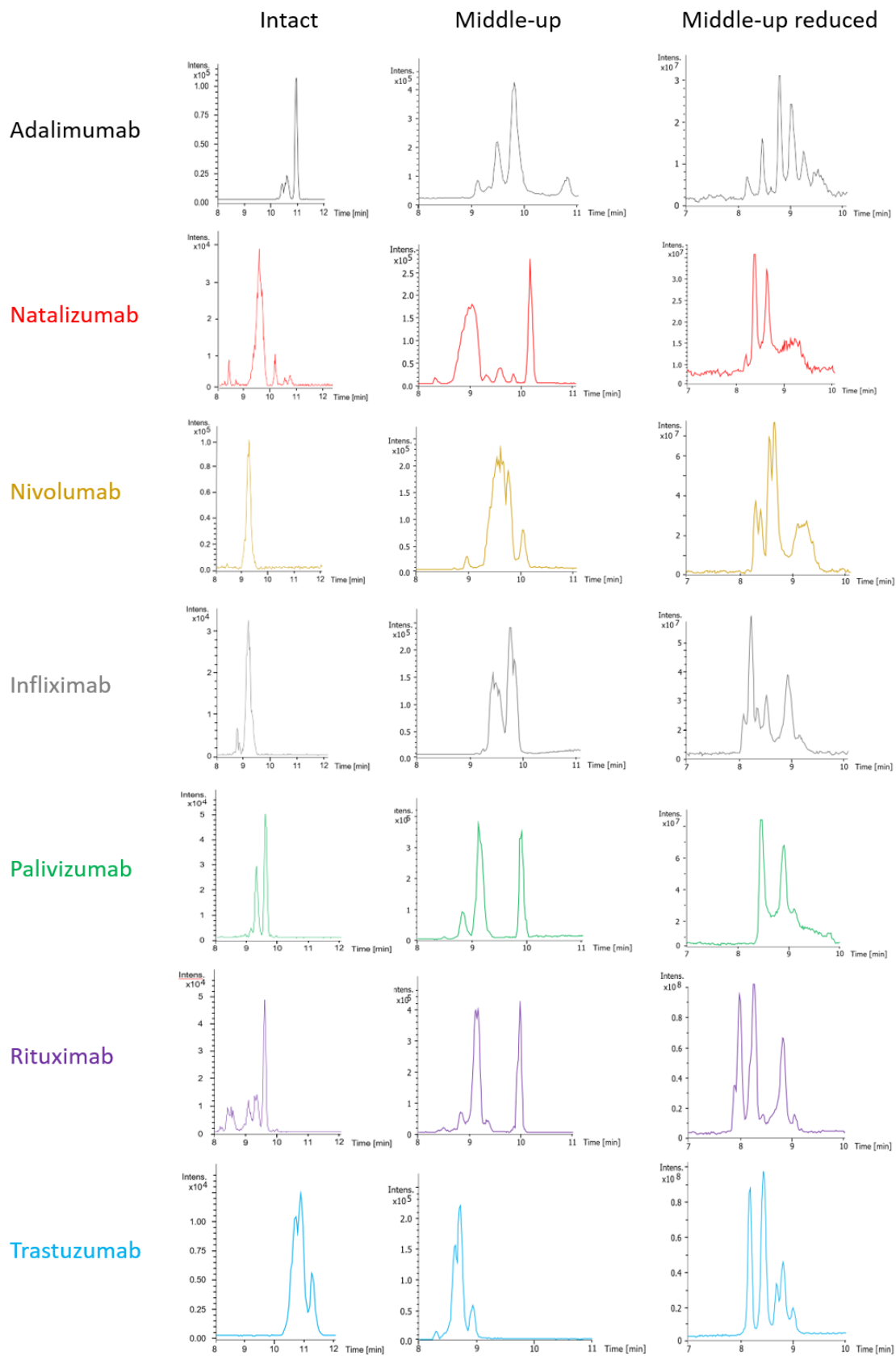


Figure 5.1: CZE-ESI-MS separation of intact, middle-up and reduced middle-up of the seven mAbs.

As expected, no separation of mAbs isoforms has been observed whereas separation obtained between 2X-glycosylated and 1X-glycosylated forms [18, 20]. Concerning possible acidic or basic variants, mass difference between 3 and 15 Da were observed. As already described in the literature, the most important antibody basic charge variants are iso-Asp modification, C-terminal Lys truncation, aglycosylation, incomplete cyclization of the N-terminal Gln to pyroGln or methionine oxidation; whereas sialylation, asparagine deamidation, glycation, cysteinylolation are the most commonly observed acidic variants [22]. Primary structure of adalimumab carries several residues (Asp, Asn, Met...) which can be potentially isomerized, deamidated or oxidized. However, due to the mass accuracy limitation of the mass spectrometer, it is impossible to conclude without any ambiguity on the exact modification. Only hypothesis can be formulated on the real nature of acidic and basic variant. To alleviate this limitation, only a multi-level analysis involving partial enzymatic digestion could be an alternative solution to ensure the identification and deeper characterize mAbs isoforms.

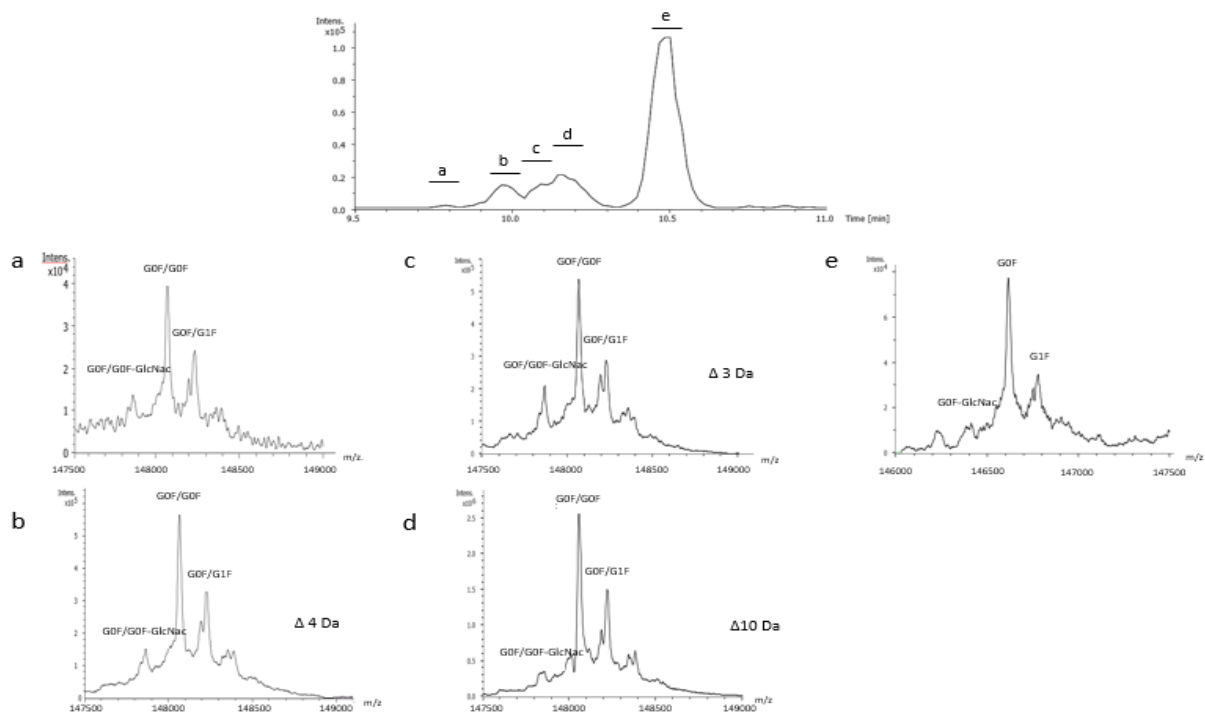


Figure 5.2: CZE-ESI-MS separation of intact adalimumab and corresponding deconvoluted mass spectra.

2.4.2. Middle-up level

An increasingly number of reports from worldwide drug agencies such as the FDA and the EMA highlight the importance of multi-level characterization of mAbs [23-25]. Middle-up analysis of mAbs involving IdeS partial digestion has been performed to get additional information and confirm results earned with the intact protein strategy. This intermediate level consists in cleaving the immunoglobulin (IgG) specifically under the hinge region to obtain F(ab)'₂ and Fc/2 fragments. The two fragments are respectively around 100 kDa and 25 kDa. Method development has been carried out to separate and analyze fragments with such a mass variance. CZE conditions have not been subject to modification between each level of analysis. After mAb infusion, the mass range has been fixed between 1000 and 4000 Thomson to incorporate the charge envelope of the two kinds of fragments. Separations have been performed in less than 11 minutes for each mAbs (*Figure 5.1*). In each case, 4 to 6 peaks have been separated, with 2 to 5 Fc/2 isoforms and 1 to 4 F(ab)'₂ isoforms (*Table 5S1*). After a comparison between theoretical masses and experimental ones, major glycoforms as Man₅, GlcNac, G0F, G1F and G2F already found at the intact molecule level are also recovered. Supplementary glycoforms are linked with Fc/2 fragments of the different mAbs. For example, G₀ glycoform has been found on each mAb except natalizumab, G₁ and G₂ forms have been identified on respectively 5 and 3 mAbs including natalizumab, nivolumab and trastuzumab (*Table 5S1*). In addition, each mAb spectra deconvolution highlighted the presence of lower mass PTMs well defined such as K-clip which is a loss of the terminal lysine on the HC, methionine oxidation but also potential asparagine deamidation. Concerning the Glu/PyroGlu and Gln/PyroGln groups of mAbs described in the intact level section, similar results have been observed at the middle-up level, namely, 100% N-terminal Glu and 100% PyroGln respectively. As at the intact level analysis, adalimumab was chosen to illustrate these results. Electropherogram in *Figure 5.3* shows a separation of the IdeS digest of adalimumab with several peaks, reflecting a separation of F(ab)'₂ and Fc/2 fragments. Deconvoluted spectra revealed a baseline separation of F(ab)'₂ and Fc/2 fragments and a partial separation of Fc/2 isoforms (*Table 5.2*). Results showed Fc/2 fragment with G0F-GlcNac, Man₅, Man₆, G0F, G1F and G2F glycoforms. These observation are in agreement with the main glycoforms observed at the intact level. Moreover, additional glycosylation has been obviously characterized due to the difference of weight between Fc/2 fragment (25 kDa) and intact mAbs (150 kDa).

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	non-glycosylated	23754.0	23754.6	Kclip	10.00	0.6
Fc/2	[H1N2F1]	24467.8	24468.3	Kclip + 1 deam *	9.55	0.5
Fc/2	[H2N2F1]	24631.0	24631.4	Kclip	9.55	0.4
Fc/2	[H2N3F1]	24833.6	24833.6	Kclip + 1 deam*	9.80	0.0
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25200.1	25199.9	Kclip	9.65	-0.2
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25328.1	25328.1	-	9.90	0.0
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25327.1	25327.1	deam*	10.30	0.0
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25361.0	25361.1	Kclip + 1 deam*	9.80	0.1
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25361.6	25362.1	Kclip	10.30	0.5
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25490.1	25490.2	-	10.00	0.1
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25524.3	25524.2	Kclip	9.55	-0.1
Fc/2	G0F-GlcNac [H3N3F1]	24995.7	24995.8	Kclip + 1 deam*	9.65	0.1
Fc/2	G0F-GlcNac [H3N3F1]	24996.3	24996.7	Kclip	10.30	0.5
Fc/2	G0F-GlcNac [H3N3F1]	25125.3	25124.9	-	10.00	-0.7
Fc/2	G0 [H3N4]	25052.6	25052.8	Kclip + 1 deam*	9.55	0.2
Fc/2	Man5 [H5N2]	24971.7	24971.7	Kclip	9.55	0.0
Fc/2	Man6 [H6N2]	25132.0	25132.8	Kclip + 1 deam *	9.55	0.8
f(ab)'2	-	97713	97712	4 deam *	10.00	1
f(ab)'2	-	97711	97711	5 deam *	10.30	0
f(ab)'2	-	97708	97708	8 deam *	10.70	0

Table 5.2: Assignment of species observed for IdeS digest of Adalimumab after CZE-ESI-MS analysis
Annotation: see supporting information Figure 5S1.

Another PTMs such as K-clip on C-term of Fc/2, correlated to a difference of mass of 128 Da, have been observed in a large number of glycoform. As at the upper level, low mass differences were detected on Fc/2 and F(ab)'2 fragments corresponding to acidic or basic variants. Regarding the Fc/2 fragments, difference of 1 Da corresponding to one deamidation of Asn have been observed in the majority of the identified glycoforms. Concerning F(ab)'2, difference between 4 to 8 Da have been observed which can correspond to several deamidation. However, despite the compatibility of results between theoretical and experimental data, same limitation of the mass accuracy of mass spectrometer can be underline for 100 kDa fragments. Even if there is sufficient Asn residues in F(ab)'2 fragment to obtain several deamidation, only hypothesis can be formulated on the real nature of the modification. A possibility to overcome this limitation is to reduce F(ab)'2 fragment. Indeed, reduction of disulfide bonds anchored in F(ab)'2 fragment could release the LC from the Fd part of the mAb and thus allow a deeper structural investigation.

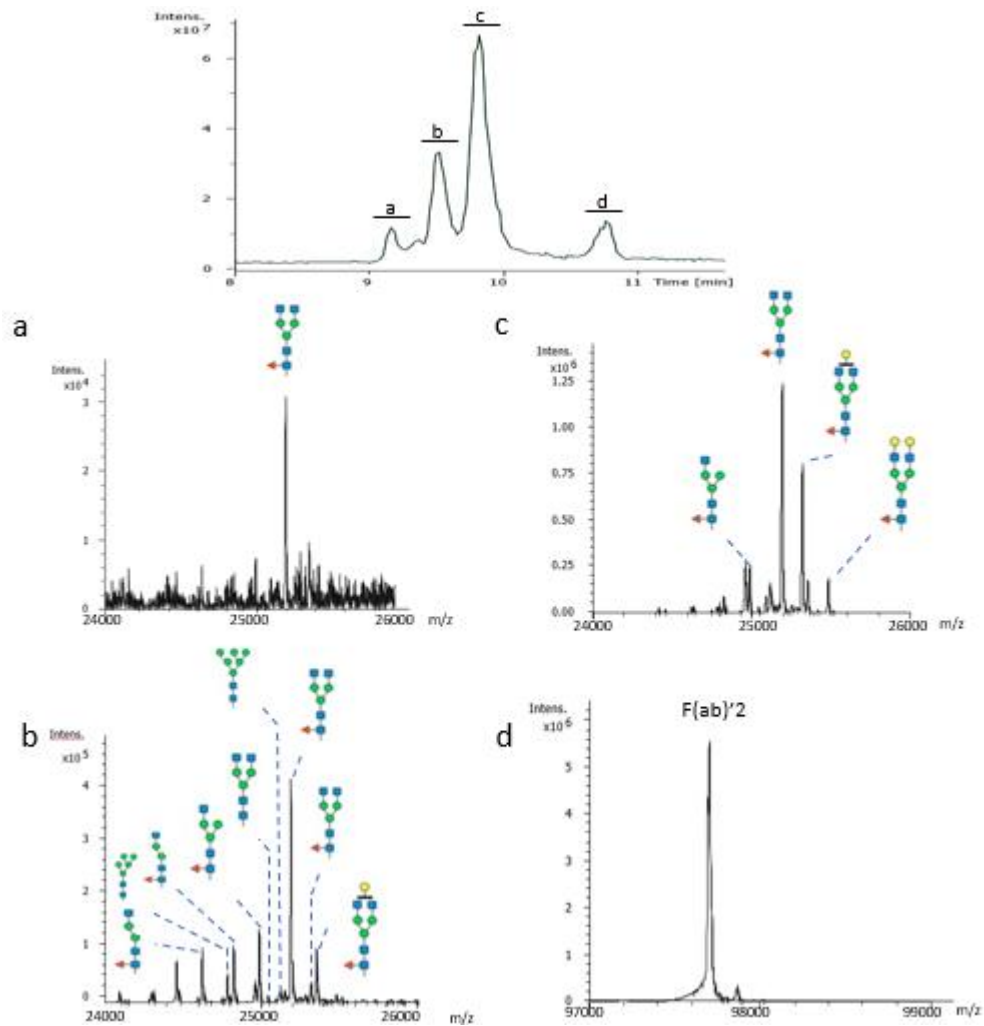


Figure 5.3: CZE-ESI-MS separation of IdeS digest of adalimumab and corresponding deconvoluted mass spectra.

2.4.3. Reduced middle-up level

Reduction workflow consisted to break the disulfide bonds with the reducing agent tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) to release the light chain LC from the Fd part. Hence, the masses of the three fragments earned with this sample treatment were all about 25 kDa and enabled a more comprehensive analysis of the F(ab)'2 fragment. MS analytical parameters have been optimized to redefine the m/z range and key factors such as the accumulation time of ions in the mass spectrometer but also the pre-pulse storage time in order to enhance both detection and mass accuracy. As expected at this lower level, for each mAbs, 3 to 7 peaks have been observed on the electropherogram in less than 10 minutes, thus proving the efficiency and fastness of the separation method (Figure 5.1). For each mAb, the quantity of peaks drawn by the total ion electropherogram is increasing and respective peaks' efficacy are better, more intense and better resolved than results at the upper levels.

Besides the presence of the three theoretical fragments, information has been obtained by deconvoluted spectra regarding the nature of PTMs found on the mAbs, such as low mass differences and oxidations. As shown at higher analytical levels, spectra interpretation of Fd fragments revealed pyroGln in Fd N-terminal position for mAbs bearing a Gln on N-term HC, and Glu in the same position for mAbs bearing a Glu on N-term HC. In addition, oxidation and deamidation have been clearly located on LC or Fd fragments, completing the characterization of PTMs at the different level. On a global basis of the seven mAbs, in respect of Fc/2 fragments, besides previously identified glycoforms, additional ones have been partially separated but unambiguously characterized such as Man5, Man6, G0F-GlcNac as indexed in [Table 5S1](#) with or without K-clip. Moreover, uncomplete glycosylation forms have been detected and separated, extending the characterization of PTMs on mAbs.

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25201.9	25202.0	Kclip + 2 deam *	8.90	0.1
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25199.7	25200.0	Kclip + 4 deam *	9.25	0.3
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25362.8	25363.2	Kclip + 3 deam *	9.05	0.4
Fc/2	G1F-GlcNac [H4N3F1]	25157.9	25157.9	Kclip + 1 deam *	9.25	0.0
Fc/2	G1 [H4N4]	25217.7	25218.0	Kclip + 2 deam *	9.25	0.3
LC	-	23409.7	23409.9	2 deam *	8.80	0.2
LC	-	23406.2	23406.0	6 deam *	9.35	-0.2
Fd	-	25456.2	25456.4	2 deam *	8.45	0.2
Fd	-	25454.3	25454.4	4 deam *	9.50	0.1
Fd	-	25472.3	25472.4	oxy + 2 deam *	8.45	0.1

Table 5.3: Assignment of species observed for reduced IdeS digest of Adalimumab Annotation: see supporting information Figure 5S1.

Using the example of adalimumab results illustrated in [Figure 5.4](#), numerous peaks are drawn on the TIE arising from a separation of LC, Fd and Fc/2 fragments. Some glycosylation forms like G1F, G0 or G1 already found at intact and middle-up levels are also recovered at this level. Low masses PTMs as asparagine deamidation and methionine oxidation are also found at this level, enhancing the interpretation of MS spectra and more widely mAbs characterization ([Table 5.3](#)). This secondary intermediate level led to new limitations concerning the identification of PTMs on the 3 formed fragments. Indeed, all three Fd, Fc/2 and LC fragments earned by an Ides digestion added with a reduction step have a molecular weight about 25 kDa. Hence, major peaks on MS spectra may interfere with some minor peaks representing fragments carrying PTMs with a lower intensity. More precisely, conglomeration of many species differing slightly on their mass can be co-eluted. Ions detection is

clearly dependent from ionization, transfer and detection so hidden peaks can sometimes reveal some strong present PTMs. Moreover, even if fragments have a reduced mass allowing a better characterization, they can possess numbers of different possible site of modification as Asn, Asp or Met for example. At this level of characterization and without fragmentation process, it is impossible to locate precisely the modification. At the moment, the bottom-up level remains the better alternative totally complementary with higher levels. This third mAb analytical level enables to get precise structural information on peptides. The protein backbone slicing with an enzymatic tool allows to isolate the PTMs and opens a way to characterize and relatively quantify their presence.

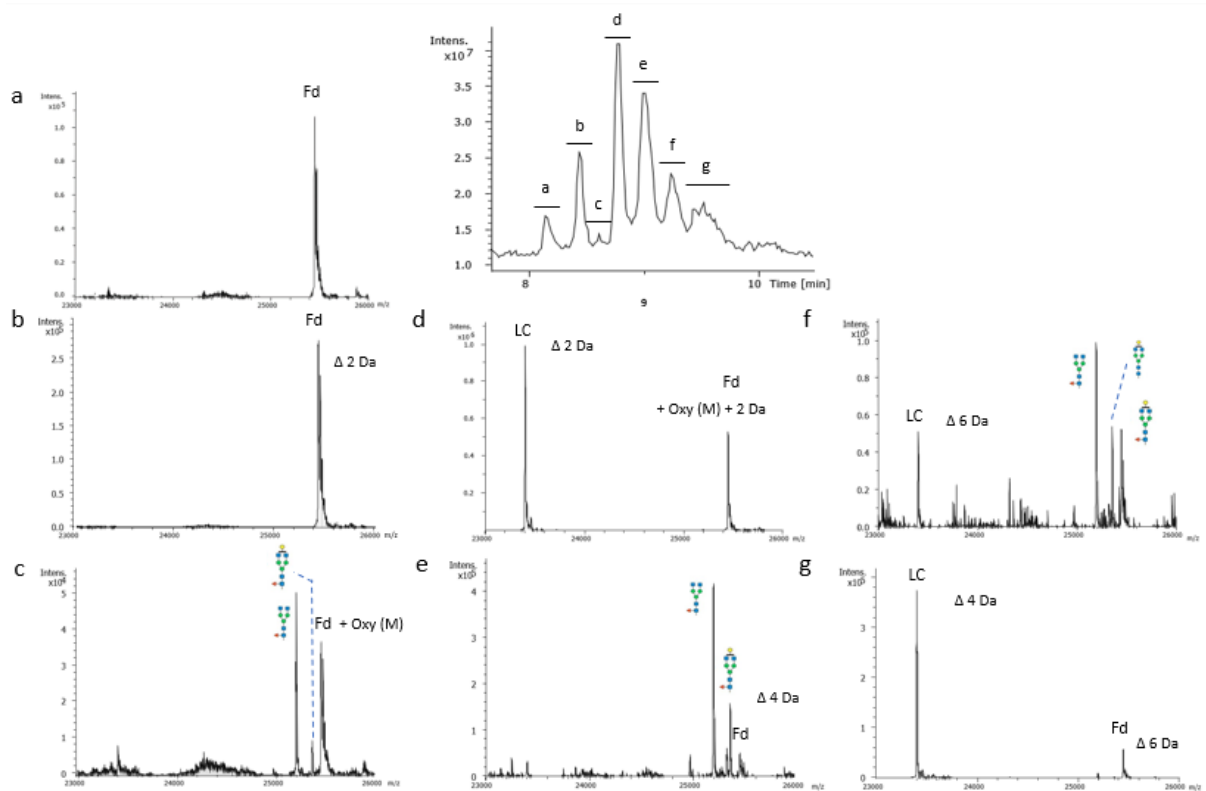


Figure 5.4: CZE-ESI-MS separation of reduced IdeS digest of adalimumab and corresponding deconvoluted mass spectra.

2.4.4. Bottom-up level

One of the reference method to determine protein amino acid sequence and to locate or quantify PTMs is the MS based bottom-up analysis. For primary structure characterization, this methodology is particularly crucial in early development of therapeutic antibodies as well as during long-term life cycle management of the biopharmaceutical products. This level 3 of mAb analysis allows to perform their characterization with respect to several aspects that define their primary structure,

including amino acid sequence, glycosylation and other types of PTMs such as oxidation of Met, deamidation of Asn, cyclisation of Gln/Glu an isomerization of Asp [15].

Based on previous work [26], mAbs samples were treated by an in solution tryptic digestion. Peptides earned had a length between two and about sixty amino acids. For each mAbs, tryptic peptide mixtures were separated using the sheathless CZE-ESI-MS/MS system based on their charge state in solution as well as their hydrodynamic radius. Peptides were identified from MS/MS spectra in an approach similar that used in bottom-up proteomic experiments.

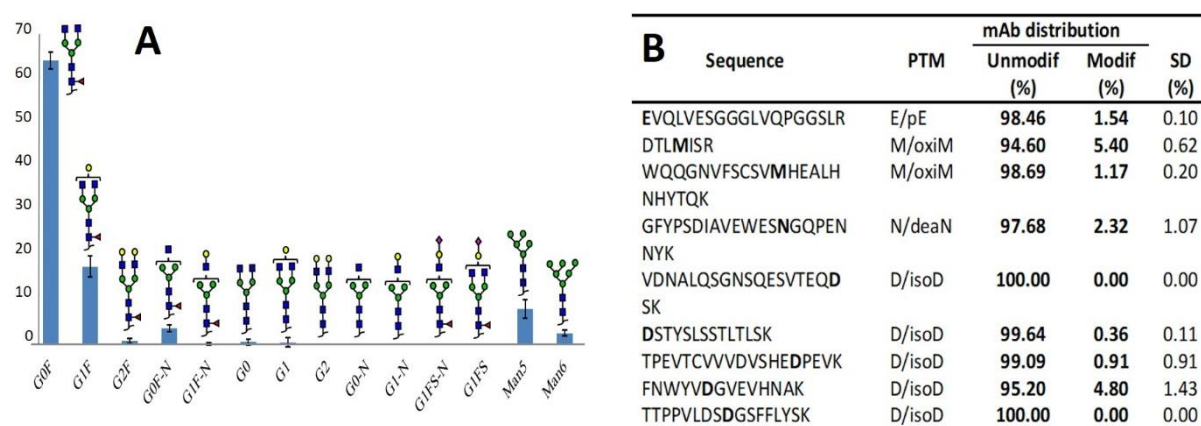


Figure 5.5: Glycoform semiquantitative analysis (A) and other PTMs occurrence levels (B) for adalimumab obtained by CE-ESI-MS.

For each mAbs, sequence coverage of 100% of both the heavy chain and light chain was obtained from a single injection of 200 fmol (Figure 5S2). Regarding MS/MS spectra, remarkable number of y and b ions allows peptide identification in peptide fragment fingerprinting strategy. Identification of more than 80% of the y and b ions composing the seven different mAbs are systematically obtained.

Concerning N-glycosylation characterization, using the same set of CZE-ESI-MS/MS data, 14 of the main Fc N-Glycan species typically found in therapeutic IgG mAbs produced in CHO, NS0 and SP2/0 cell lines were systematically identified. Peak assignment of glyco-structures was performed based on accurate mass measurement in MS1, provided by high resolution MS (mass accuracy below 2 ppm) and MS/MS spectra, respectively. As the intact and middle-up analysis, results of adalimumab have been selected to illustrate the CZE-ESI-MS method performance (Figure 5.5), however, results on the other six mAbs are done in the supporting information (Figure 5S2). The glycan profiling of Adalimumab (Figure 5.5a) has been designed using the evaluation of the relative occurrence levels of each glycopeptide. Reproducibility of the method has been already described in the literature by our group

[27]. Briefly, triplicates of mAbs digestion were performed using different experimenters and triplicates injections of each digested samples were carried out. Calculated values of standard deviation never exceeding 4% validated this CZE-ESI-MS/MS method as a powerful method to perform relative quantitation of N-glycan species for mAb characterization. Moreover, N-glycan species identified at this bottom-up level are in accordance with those forms characterized at intact and intermediate levels. G0F, G1F, G2F, G0, G1, G2, Man5, Man6, G0F-GlcNac are figured out at all levels but the bottom-up level allows to get the precise localization and relatively quantify them. Besides glycosylation, other PTMs must also be considered following potential influence in the affinity between a mAb and its corresponding antigen. Same protocol has been processed for the identification and the relative quantification of selected PTMs such as methionine oxidation, N-terminal glutamic acid cyclization, asparagine deamidation and isomerization of aspartic acid. Data showed in [Figure 5.5b](#) for adalimumab (supporting information [Figure 5S2](#) for the six other mAbs) that every single PTM monitored could be successfully characterized and relatively quantified. Advantages of bottom-up as compared to intact or middle-up approaches, is the faculty to locate precisely the modification on the backbone of the mAbs using MS/MS spectra. Moreover, the ability of CE to separate in each case the intact peptide to the modified peptide allowed to calculate the abundance level of the modification. It is interesting to note that for the 3 mAbs with N-terminal Glu in the HC, low abundance level of cyclisation is observed (<4%) while for the 4 mAbs with N-terminal Gln in the HC, peptide is almost totally modified (<90%). The presence or not of amino acid cyclization is in accordance with the other analytical levels however only bottom-up level has sufficient sensitivity to detect small amount of modified peptide. Concerning oxidation of methionine, focusing on DTLMISR peptide, which is common to every analyzed mAbs, less than 5% modified peptide was observed in each case. However, depending of the mAbs, other oxidized methionine could be characterized elsewhere on the protein backbone with relative abundance until 10%. This kind of occasional modification has also been found at the middle-up level, reinforcing the quality and robustness of the methods employed at the 3 levels. Finally, all deamidation of asparagine and isomerization of isoaspartic acid have been identified and characterized. Except for one peptide in rituximab bearing a D/isoD modification (abundance level of the modified peptide >20%), calculated abundance level is included between 0 to 12%. Just as the previous results, the bottom-up strategy corroborates the information gathered at the intact and middle-up levels, where identical masses proteins were separated, nonetheless.

The consistency of the cross checked-results of combined intact, intermediate and bottom-up levels demonstrate the power and robustness of the CZE-ESI-MS to fully characterize therapeutics. Highest levels could be used first to have a global illustration of the charge heterogeneity but also to get a qualitative information about the different N-glycosylations and PTMs attendance. Lower levels

and particularly the third level (bottom-up) should be preferred to get quantitative information and precise localization of the PTMs and to ensure the amino acid structure.

2.5. Conclusion:

In this work, seven commercial mAbs have been thoroughly characterized by a sheathless CZE-ESI-MS coupling. MAb are glycoproteins which can be analyzed at three complementary analytical levels known as intact level, middle-up level and bottom-up level. Based on a previous work from our group to separate intact mAbs isoforms, supplemental levels have been investigated to get a deeper characterization and detect additional information such as PTMs combination and location. Contrary to the bottom-up analysis performed on a BFS capillary, a PEI positive coating has been set up to avoid protein adsorption on the inner surface of the capillary at intact and middle-up levels. These upper levels analyses have been surveyed to get structural information as realistically as possible by avoiding artifactual modifications due to heavy sample preparation. A partial separation of intact isoforms has been obtained in less than 12 minutes. MS spectra interpretation of intact mAbs exposed the presence of major high molecular weight PTMs as N-glycosylations. Intermediate level has been investigated using an IdeS digestion to facilitate the characterization of low mass PTMs on mAbs. The separation of F(ab)'₂ and Fc/2 fragments induced by the cleavage (respectively of 100 kDa and 25 kDa) has been performed following the same separation conditions used at the intact level. In each case, isoforms separation has been obtained in less than 11 minutes and disclosed a separation between F(ab)'₂ and Fc/2 fragments. More precisely, isoforms of Fc/2 fragments have been elucidated carrying different N-glycosylations and other PTMs as methionine oxidations or K-clips. Mass accuracy enabled to get supplemental N-glycans structure. However, the F(ab)'₂ fragments were still too imposing to undoubtedly assign very low mass PTMs such as asparagine deamidation. The solution employed in this study was to add a reducing step to release LC from Fd part by breaking up interchain disulfide bonds. All fragments induced by this workflow are about 25 kDa each. The separation has been performed in less than 10 minutes and gave numerous peaks in each case, corresponding to various isoforms of fragments. Here, high accuracy provided by the CE-ESI-MS coupling enabled the assessment of macro and micro-heterogeneities from N-glycosylations to asparagine deamidation. Nevertheless, the precise location of PTMs could only provide from a peptidic level assessment. The bottom-up level has been examined to identify, locate and relatively quantify all kind of PTMs. The synergy of PTMs identified at this lower level and the upper levels underline the paramount importance of the combination of multi-level analyses to establish a comprehensive characterization of mAbs and get an illustration as close as possible to the real protein mix administered to patients.

2.6. Acknowledgements:

Authors would like to thank Yann Hebert, Pierre-Olivier Schmit, Jean-Charles Rocca and Manuel Chapelle from Bruker Daltonics for the fruitful collaboration and their support. The authors would like also to express their gratitude to Olivier Colas (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France) for helpful discussions. This work was supported by the CNRS (UMR 7140), the University of Strasbourg, and a doctoral fellowship from Bruker Daltonics and the General Council of Region Grand Est to JG.

2.7. Supporting information:

Table S1: Assignment of species and PTMs observed on natalizumab, nivolumab, palivizumab, infliximab, rituximab and trastuzumab at the three levels

intact Natalizumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
	G0F/G0F-GlcNac	148601	148610		9.60	9
	G0F/G0F-GlcNac	148604	148610		9.50	6
	G0F/G0F-GlcNac	148606	148610		9.40	4
	G0F/G0F	148802	148813		9.60	11
	G0F/G0F	148804	148813		9.50	9
	G0F/G0F	148805	148813		9.40	8
	G0F/G1F	148965	148975		9.60	10
	G0F/G1F	148966	148975		9.50	9
	G0F/G1F	148967	148975		9.40	7
	G1F/G1F	149126	149137		9.60	11
	G1F/G1F	149128	149137		9.50	9
	G1F/G1F	149129	149137		9.40	8
	G1F/G2F	149286	149299		9.60	13
	G1F/G2F	149288	149299		9.50	11
	G1F/G2F	149291	149299		9.40	8
	G2F/G2F	149442	149461		9.60	19
	G2F/G2F	149441	149461		9.50	20
	G2F/G2F	149442	149461		9.40	19

IdeS digest of Natalizumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	non-glycosylated	23770.1	23770.5	Kclip	9.30	0.4
Fc/2	[H1N2F1]	24484.5	24485.2	Kclip	8.80	0.7
Fc/2	[H2N2F1]	24647.0	24647.3	Kclip	8.75	0.3
Fc/2	[H2N3F1]	24849.6	24849.5	Kclip + 1 deam*	9.00	-0.1
Fc/2	[H2N3F1]	24850.2	24850.5	Kclip	9.10	0.3
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25212.9	25212.9	Kclip + 3 deam*	8.70	0.0
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25214.9	25214.9	Kclip + 1 deam*	8.75	0.0
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25215.9	25215.9	Kclip	8.95	0.0
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25213.8	25213.9	Kclip + 2 deam*	9.00	0.1
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25377.0	25377.0	Kclip + 1 deam*	8.90	0.00
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25375.9	25376.0	Kclip + 2 deam*	8.95	0.1
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25377.8	25378.0	Kclip	9.00	0.2
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25539.1	25539.2	Kclip + 1 deam*	8.70	0.1
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25539.3	25540.1	Kclip	8.75	0.8
Fc/2	G0F-GlcNac [H3N3F1]	25011.9	25012.7	Kclip	8.35	0.8
Fc/2	G0F-GlcNac [H3N3F1]	25011.7	25011.7	Kclip + 1 deam*	8.95	0.0
Fc/2	G1 [H4N4]	25231.7	25231.8	Kclip	8.35	0.1
Fc/2	G2 [H5N4]	25393.9	25394.0	Kclip	8.35	0.1
f(ab)'2	-	98417	98417	2x pyroQ	9.30	0
f(ab)'2	-	98413	98413	2x pyroQ + 4 deam *	9.60	0
f(ab)'2	-	98411	98411	2x pyroQ + 6 deam *	9.85	0
f(ab)'2	-	98410	98410	2x pyroQ + 7 deam *	10.25	0

Reduced IdeS digest of Natalizumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25220.7	25219.9	Kclip	8.45	-0.8
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25381.2	25382.0	Kclip	8.45	0.8
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25544.0	25544.2	Kclip	8.45	0.2
Fc/2	G1FS [H4N4F1S1]	25673.3	25673.3	Kclip	8.40	0.0
LC	-	23553.6	23554.1	Kclip + 2 deam *	8.55	0.5
Fd	-	25662.4	25662.6	pyroQ + 2 deam *	8.45	0.2
Fd	-	25660.5	25660.7	pyroQ + 4 deam *	8.70	0.2

intact Nivolumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
	Man6/Man6	146071	146087		9.20	16
	Man6/Man6	146072	146087		9.30	15
	G0F/G0F	146212	146220		9.20	8
	G0F/G0F	146213	146220		9.30	7
	G0F/G0F	146215	146220		9.05	5
	G0F/G1F	146374	146382		9.20	8
	G0F/G1F	146375	146382		9.30	7
	G0F/G1F	146377	146382		9.05	5
	G1F/G1F	146536	146544		9.20	8
	G1F/G1F	146538	146544		9.30	6
	G1F/G1F	146539	146544		9.05	5
	G1F/G2F	146696	146706		9.20	10
	G1F/G2F	146696	146706		9.30	10
	G1F/G2F	146699	146706		9.05	7

IdeS digest of Nivolumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	non-glycosylated	23769.2	23769.6	Kclip + 1 deam*	9.95	0.4
Fc/2	[H1N2F1]	24484.5	24485.2	Kclip	9.50	0.7
Fc/2	[H2N2F1]	24647.1	24647.3	Kclip	9.65	0.2
Fc/2	[H2N3F1]	24849.5	24849.5	Kclip + 1 deam*	9.65	0.00
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25215.8	25215.9	Kclip	9.80	0.1
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25377.0	25377.0	Kclip + 1 deam*	9.35	0.0
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25539.9	25540.1	Kclip	9.25	0.2
Fc/2	G0F-GlcNac [H3N3F1]	25011.6	25011.7	Kclip + 1 deam*	9.65	0.1
Fc/2	G1F-GlcNac [H4N3F1]	25172.6	25172.8	Kclip + 2 deam*	9.30	0.2
Fc/2	G0 [H3N4]	25067.5	25067.8	Kclip + 2 deam*	9.30	0.3
Fc/2	G1 [H4N4]	25231.5	25231.9	Kclip	9.30	0.4
Fc/2	G2 [H5N4]	25392.8	25393.0	Kclip + 1 deam*	9.30	0.2
Fc/2	Man5 [H5N2]	24985.3	24985.7	Kclip + 2 deam*	9.30	0.4
f(ab)'2	-	95822	95822	2x pyroQ + 2 deam *	9.95	0
f(ab)'2	-	95821	95821	2x pyroQ + 3 deam *	10.05	0

Reduced IdeS digest of Nivolumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25219.6	25219.9	Kclip	8.35	0.3
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25216.5	25217.0	Kclip + 3 deam *	9.10	0.5
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25215.7	25216.0	Kclip + 4 deam *	9.50	0.3
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25381.0	25381.0	Kclip + 1 deam *	8.40	0.1
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25378.0	25378.1	Kclip + 4 deam *	9.10	0.2
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25544.1	25544.2	Kclip	8.35	0.2
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25542.2	25542.2	Kclip + 2 deam *	8.65	0.0
Fc/2	Man6 [H6N2]	25152.7	25152.8	Kclip + 1 deam *	9.30	0.1
LC	-	23372.1	23372.8	1 deam *	8.55	0.7
LC	-	23370.7	23370.8	3 deam *	8.60	0.1
LC	-	23369.8	23369.8	4 deam *	9.00	0.0
Fd	-	24550.0	24550.4	pyroQ	8.25	0.4
Fd	-	24549.3	24549.4	pyroQ + 1 deam *	9.35	0.1
Fd	-	24565.0	24565.4	pyroQ + oxy + 1 deam *	8.65	0.4
Fd	-	24581.3	24581.4	pyroQ + 2 oxy + 1 deam *	8.65	0.1

intact Palivizumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
	G0F	146492	146509		9.85	17
	G1F	146658	146672		9.85	14
	G2F	146828	146834		9.85	6
	Man5/Man5	147486	147498		9.75	12
	G0F/G0F-GlcNac	147741	147752		9.85	11
	G0F/G0F-GlcNac	147745	147752		9.75	7
	G0F/G0F-GlcNac	147748	147752		9.35	4
	G0F/G0F-GlcNac	147748	147752		9.20	4
	G0F/G0F-GlcNac	147749	147752		9.10	3
	G0F/G0F	147941	147955		9.85	14
	G0F/G0F	147942	147955		9.75	13
	G0F/G0F	147949	147955		9.35	6
	G0F/G0F	147948	147955		9.20	7
	G0F/G0F	147950	147955		9.10	5
	G0F/G1F	148108	148117		9.85	9
	G0F/G1F	148105	148117		9.75	12
	G0F/G1F	148112	148117		9.35	5
	G0F/G1F	148111	148117		9.20	6
	G0F/G1F	148114	148117		9.10	3
	G1F/G1F	148265	148279		9.85	14
	G1F/G1F	148267	148279		9.75	12
	G1F/G1F	148273	148279		9.35	6
	G1F/G1F	148272	148279		9.20	7
	G1F/G1F	148274	148279		9.10	5
	G1F/G2F	148427	148441		9.85	14
	G1F/G2F	148428	148441		9.75	13
	G1F/G2F	148434	148441		9.35	5
	G1F/G2F	148434	148441		9.20	7
	G1F/G2F	148437	148441		9.10	4
	G2F/G2F	148589	148603		9.85	14
	G2F/G2F	148590	148603		9.75	13
	G2F/G2F	148598	148603		9.35	5
	G2F/G2F	148597	148603		9.20	6
	G2F/G2F	148601	148603		9.10	4

IdeS digest of Palivizumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	non-glycosylated	23786.7	23786.7	Kclip	9.35	0.0
Fc/2	GlcNac [N1]	23989.3	23989.8	Kclip	9.35	0.5
Fc/2	GlcNac+Fuc [N1F1]	24135.1	24135.0	Kclip + 1 deam *	9.35	-0.1
Fc/2	[H1N2F1]	24501.5	24501.3	Kclip	8.85	-0.2
Fc/2	[H2N2F1]	24663.1	24663.5	Kclip	8.85	0.4
Fc/2	[H2N3F1]	24865.8	24866.7	Kclip	9.25	0.9
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25231.9	25232.0	Kclip	9.15	0.1
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25393.6	25394.1	Kclip	8.85	0.5
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25393.2	25393.2	Kclip + 1 deam*	9.35	0.0
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25392.0	25392.2	Kclip + 2 deam*	9.45	0.2
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25555.7	25556.3	Kclip	9.35	0.5
Fc/2	G2F + Gal [H6N4F1]	25717.7	25718.4	Kclip	9.15	0.7
Fc/2	G0F - GlcNac [H3N3F1]	25027.9	25027.8	Kclip + 1 deam *	9.25	-0.1
Fc/2	G1F - GlcNac [H4N3F1]	25190.3	25190.9	Kclip	8.85	0.6
Fc/2	G0 [H3N4]	25084.4	25084.9	Kclip + 1 deam*	9.20	0.5
Fc/2	G1 [H4N4]	25246.0	25246.0	Kclip + 2 deam*	8.85	0.0
Fc/2	G0-GlcNac [H3N3]	24881.6	24881.7	Kclip + 1 deam*	8.85	0.1
Fc/2	G1FS-GlcNac [H4N3F1S1]	25481.9	25482.2	Kclip	9.40	0.3
Fc/2	G1FS [H4N4F1S1]	25685.1	25685.4	Kclip	9.20	0.3
Fc/2	Man5 [H5N2]	25003.6	25003.7	Kclip	9.35	0.1
Fc/2	Man5 [H5N2]	25131.3	25131.9	-	9.35	0.6
f(ab)'2	-	9751ç	97519.0	2x pyroQ + 8 deam *	9.95	0

Reduced IdeS digest of Palivizumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25234.0	25234.1	Kclip + 2 deam*	8.85	0.1
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25397.0	25397.2	Kclip + 1 deam*	8.85	0.2
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25395.9	25396.2	Kclip + 2 deam*	9.10	0.3
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25559.1	25559.3	Kclip + 1 deam*	10.10	0.2
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25558.3	25558.3	Kclip + 2 deam*	11.10	0.0
Fc/2	Man5 [H5N2]	25006.7	25006.8	Kclip + 1 deam*	9.05	0.1
Fc/2	Man5 [H5N2]	25005.6	25005.8	Kclip + 2 deam*	9.00	0.2
LC	-	23209.8	23209.8	3 deam *	8.50	0.0
LC	-	23209.8	23209.8	3 deam *	9.05	0.0
LC	-	23208.4	23208.8	4 deam *	9.10	0.4
Fd	-	25561.1	25561.8	pyroQ + 1 deam *	8.40	0.7
Fd	-	25559.5	25559.8	pyroQ + 3 deam*	8.50	0.3
Fd	-	25577.1	25577.8	pyroQ + oxy + 1 deam *	8.40	0.7
Fd	-	25593.5	25593.8	pyroQ + 2 oxy + 1 deam *	8.40	0.3
Fd	-	25607.5	25607.8	pyroQ + 3 oxy + 3 deam *	8.50	0.3

intact Infliximab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
	Man5/Man5	148071	148056		9.15	-15
	Man5/Man5	148070	148056		8.9	-14
	G0F/G0F-GlcNac	148301	148309		9.15	8
	G0F/G0F-GlcNac	148300	148309		8.8	9
	G0F/G0F-GlcNac	148302	148309		8.9	7
	G0F/G0F	148502	148512		9.15	10
	G0F/G0F	148503	148512		8.8	9
	G0F/G0F	148505	148512		8.9	7
	G0F/G1F	148661	148674		9.15	13
	G0F/G1F	148664	148674		8.8	10
	G0F/G1F	148665	148674		8.9	9
	G1F/G1F	148825	148836		9.15	11
	G1F/G1F	148826	148836		8.8	10
	G1F/G1F	148827	148836		8.9	9
	G1F/G2F	148988	148998		9.15	10
	G1F/G2F	148990	148998		8.8	8
	G1F/G2F	148992	148998		8.9	6

IdeS digest of Infliximab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	[H2N3F1]	24833.7	24833.6	Kclip + 1 deam *	9.75	-0.1
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25199.8	25199.9	Kclip	9.75	0.1
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25197.9	25198.0	Kclip + 2 deam*	9.85	0.1
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25361.8	25362.1	Kclip	9.75	0.3
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25489.7	25490.3	-	9.85	0.5
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25523.2	25523.2	Kclip + 1 deam*	9.75	0.0
Fc/2	G0F - GlcNac [H3N3F1]	24996.2	24996.7	Kclip	9.75	0.5
Fc/2	G0F - GlcNac [H3N3F1]	25124.5	25124.9	-	9.85	0.4
Fc/2	G1F - GlcNac [H4N3F1]	25157.7	25157.9	Kclip + 1 deam*	9.75	0.2
Fc/2	G0 [H3N4]	25052.8	25052.8	Kclip + 1 deam *	9.75	0.0
Fc/2	G0-GlcNac [H3N3]	24849.4	24849.6	Kclip + 1 deam*	9.75	0.2
fc/2	G1-GlcNac [H4N3]	25010.6	25010.8	Kclip + 2 deam*	9.75	0.2
Fc/2	G1FS-GlcNac [H4N3F1S1]	25448.4	25448.2	Kclip + 2 deam *	9.75	-0.2
Fc/2	G1FS [H4N4F1S1]	25651.4	25651.4	Kclip + 2 deam *	9.75	0.0
Fc/2	Man5 [H5N2]	24971.0	24971.7	Kclip	9.85	0.7
f(ab)'2	-	98148	98148	-	9.25	0
f(ab)'2	-	98145	98145	3 deam*	9.35	0

Reduced IdeS digest of Infliximab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25201.5	25202.0	Kclip + 2 deam *	8.90	0.5
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25200.9	25201.0	Kclip + 3 deam *	9.15	0.1
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25329.8	25330.2	2 deam *	8.90	0.4
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25363.7	25364.1	Kclip + 2 deam *	8.90	0.5
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25492.4	25492.3	2 deam *	8.90	-0.1
Fc/2	Man5 [H5N2]	24976.0	24975.7	Kclip	8.90	-0.3
LC	-	23437.8	23437.7	1 deam *	8.10	-0.1
LC	-	23436.6	23436.7	2 deam *	8.35	0.1
LC	-	23455.6	23454.7	1 oxy	8.10	-0.9
Fd	-	25647.3	25647.5	-	8.25	0.2
Fd	-	25646.2	25646.5	1 deam *	8.50	0.3
Fd	-	25663.5	25663.6	1 oxy	8.25	0.1

intact Trastuzumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
	G0F/G0F-GlcNac	147851	147853		10.50	2
	G0F/G0F-GlcNac	147851	147853		10.90	2
	G0F/G0F-GlcNac	147850	147853		11.30	3
	G0F/G0F	148055	148056		10.50	1
	G0F/G0F	148054	148056		10.90	2
	G0F/G0F	148053	148056		11.30	3
	G0F/G1F	148218	148218		10.50	0
	G0F/G1F	148218	148218		10.90	0
	G0F/G1F	148218	148218		11.30	0
	G1F/G1F	148378	148380		10.50	2
	G1F/G1F	148378	148380		10.90	2
	G1F/G1F	148380	148380		11.30	0
	G1F/G2F	148541	148543		10.50	2
	G1F/G2F	148542	148543		10.90	1
	G1F/G2F	148542	148543		11.30	1

IdeS digested Trastuzumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	[H1N2F1]	24501.2	24501.3	Kclip	8.60	0.1
Fc/2	[H2N2F1]	24663.2	24663.5	Kclip	8.60	0.3
Fc/2	[H3N2F1]	24825.6	24825.6	Kclip	8.65	0.0
Fc/2	[H3N3F1]	24866.0	24866.7	Kclip	8.65	0.7
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25232.0	25232.0	Kclip	8.65	0.0
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25393.6	25394.1	Kclip	8.65	0.5
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25555.5	25556.3	Kclip	8.65	0.8
Fc/2	G0F - GlcNac [H3N3F1]	25028.9	25028.8	Kclip	8.60	-0.1
Fc/2	G1F - GlcNac [H4N3F1]	25189.7	25190.0	Kclip + 1 deam*	8.65	0.3
Fc/2	G0 [H3N4]	25085.1	25085.9	Kclip	8.65	0.8
Fc/2	G1 [H4N4]	25248.5	25248.0	Kclip	8.65	-0.5
Fc/2	G2 [H5N4]	25410.6	25410.1	Kclip	8.65	-0.5
Fc/2	G0-GlcNac [H3N3]	24881.6	24882.7	Kclip + 1 deam*	8.65	1.1
Fc/2	G1-GlcNac [H4N3]	25044.4	25044.8	Kclip	8.65	0.4
Fc/2	Man5 [H5N2]	25003.4	25003.7	Kclip	8.65	0.3
f(ab)'2	-	97627	97628	Kclip	8.55	1
f(ab)'2	-	97625	97625	Kclip + 3 deam *	8.75	0
f(ab)'2	-	97624	97624	Kclip + 4 deam *	8.90	0

IdeS digested and reduced Trastuzumab

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25233.9	25234.1	Kclip + 2 deam *	8.75	0.2
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25232.9	25233.1	Kclip + 3 deam *	9.05	0.2
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25396.7	25397.2	Kclip + 1 deam *	8.85	0.5
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25557.9	25558.3	Kclip + 2 deam *	8.85	0.4
Fc/2	G0 [H3N4]	25087.9	25087.9	Kclip + 2 deam *	8.85	0.0
LC	-	23441.6	23441.9	1 deam *	8.85	0.3
LC	-	23438.1	23438.0	5 deam *	8.85	0.1
LC	-	23458.5	23458.9	oxy	8.45	0.4
Fd	-	25382.8	25383.3	-	8.25	0.5
Fd	-	25380.7	25381.4	2 deam *	8.45	0.7
Fd	-	25399.8	25399.3	oxy	8.25	-0.5
Fd	-	25415.3	25415.3	2x oxy	8.45	0.0

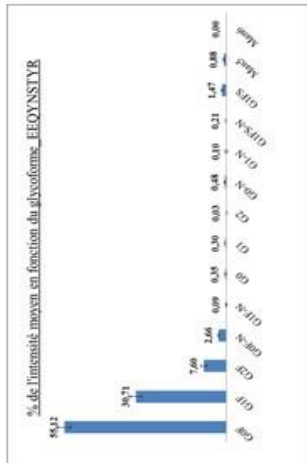
Fig. S1: Schematic representation of the main glycoforms

classification	schematic representation	classification	schematic representation
[H2N2F1]		[H3N4F1] G0F	
[H2N3F1]		[H4N4] G1	
[H5N2] Man5		[H4N3F1] G1F-GlcNac	
[H6N2] Man6		[H4N4F1] G1F	
[H3N3] G0-GlcNac		[H4N4F1S1] G1FS	
[H3N4] G0		[H5N4] G2	
[H3N3F1] G0F-GlcNac		[H5N4F1] G2F	

Fig. S2: Relative quantitation of N-glycosylation (A) and other PTMs (B) for natalizumab, nivolumab, palivizumab, infliximab and trastuzumab

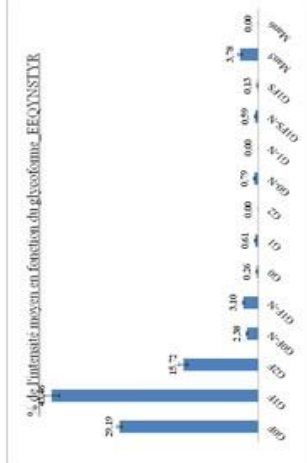
Natalizumab

Sequence	PTM	mAb distribution		SD
		Unmodified (%)	Modified (%)	
QVQLVSGGGLVQPGGSLR	Q/pQ	2.34	97.66	0.08
DTLMMR	M/oaM	96.05	1.95	0.08
WQGGNYPKSYMHEALH	N/oaN	98.03	1.97	0.16
NHYTK				
VNALGSGSGSVEYTCGD	D/oaD	100.00	0.00	0.00
SK				
DYYSLSSTLSK	D/oaD	99.31	0.69	0.34



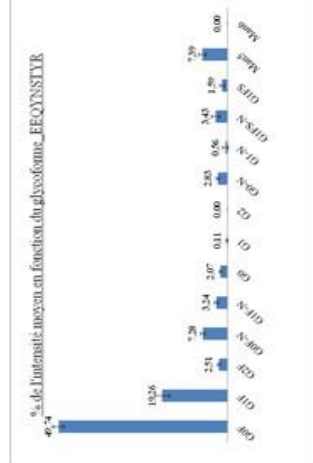
Palivizumab

Sequence	PTM	mAb distribution		SD
		Unmodified (%)	Modified (%)	
QVQLVSGGGLVQPGGSLR	Q/pQ	0.00	100.00	0.00
DTLMMR	M/oaM	97.22	2.78	0.12
WQGGNYPKSYMHEALH	N/oaN	95.39	4.61	0.85
NHYTK				
VNALGSGSGSVEYTCGD	D/oaD	93.30	6.70	0.34
SK				
DYYSLSSTLSK	D/oaD	100.00	0.00	0.00
DYYSLSSTLSK	D/oaD	99.74	0.26	0.04
TPKCVVDSHEDPEYK	D/oaD	95.83	4.17	0.70
FMWVQGVVHNAK	D/oaD	95.05	4.95	0.17
TPPVLDSGGSFVYK	D/oaD	100.00	0.00	0.00



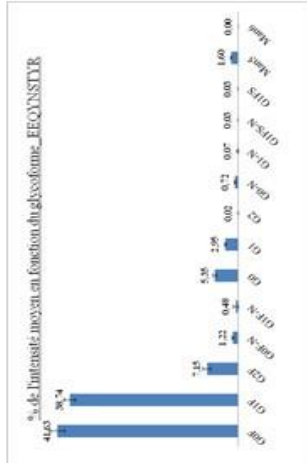
Infliximab

Sequence	PTM	mAb distribution		SD
		Unmodified (%)	Modified (%)	
EYK	Q/pQ	96.40	3.60	0.12
DTLMMR	M/oaM	98.44	1.56	0.04
WQGGNYPKSYMHEALH	N/oaN	96.90	1.10	0.29
NHYTK				
VNALGSGSGSVEYTCGD	D/oaD	92.42	7.58	0.36
SK				
DYYSLSSTLSK	D/oaD	100.00	0.00	0.00
DYYSLSSTLSK	D/oaD	99.35	0.65	0.37
TPKCVVDSHEDPEYK	D/oaD	97.63	2.37	0.22
FMWVQGVVHNAK	D/oaD	92.60	7.40	0.90
TPPVLDSGGSFVYK	D/oaD	100.00	0.00	0.00



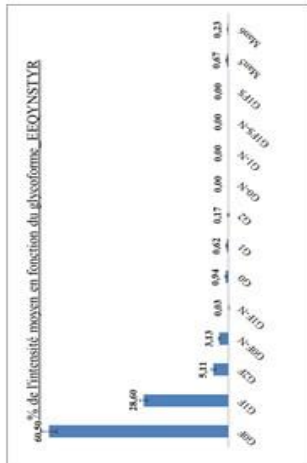
Trastuzumab

Sequence	PTM	mAb distribution		SD
		Unmodified (%)	Modified (%)	
EVQLVGGGGLVQPGGSLR	E/GE	97.85	2.15	0.60
DTLMMR	M/oaM	94.74	5.26	0.17
WQGGNYPKSYMHEALH	M/oaM	88.61	11.39	4.63
NHYTK				
ASGDVTAFAWVQDQPS	N/oaN	95.34	4.66	0.07
K				
IPPTNGYR	N/oaN	90.67	9.33	1.22
GYPSDAVVEVNGDPEN	N/oaN	96.73	3.27	1.43
NK				
VNALGSGSGSVEYTCGD	D/oaD	100.00	0.00	0.00
SK				
DYYSLSSTLSK	D/oaD	99.84	0.16	0.11
VGGDPAFAVWVNGGT	D/oaD	100.00	0.00	0.00
LVTYSASTL				
TPKCVVDSHEDPEYK	D/oaD	96.52	3.48	0.11
FMWVQGVVHNAK	D/oaD	95.90	4.10	0.91
TPPVLDSGGSFVYK	D/oaD	100.00	0.00	0.00



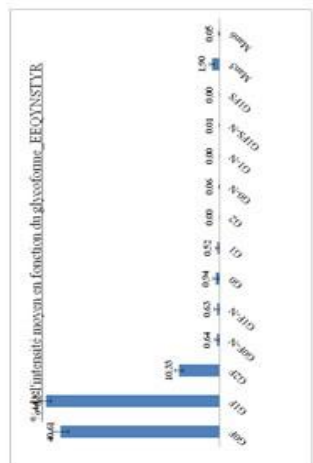
Nivolumab

Sequence	PTM	mAb distribution		SD
		Unmodified (%)	Modified (%)	
QVQLVGGGGLVQPGGSLR	Q/pQ	9.49	90.51	0.89
DTLMMR	M/oaM	95.52	4.48	0.44
VNALGSGSGSVEYTCGD	D/oaD	94.79	5.21	1.12
SK				
DYYSLSSTLSK	D/oaD	100.00	0.00	0.00
DYYSLSSTLSK	D/oaD	99.62	0.38	0.20



Rituximab

Sequence	PTM	mAb distribution		SD
		Unmodified (%)	Modified (%)	
QVQLVGGGGLVQPGGSLR	Q/pQ	0.00	100.00	0.00
DTLMMR	M/oaM	94.40	5.60	0.36
WQGGNYPKSYMHEALH	M/oaM	96.40	3.60	0.74
NHYTK				
VNALGSGSGSVEYTCGD	D/oaD	88.69	11.31	1.67
SK				
DYYSLSSTLSK	D/oaD	100.00	0.00	0.00
DYYSLSSTLSK	D/oaD	99.77	0.23	0.04
TPKCVVDSHEDPEYK	D/oaD	79.31	20.69	5.77
FMWVQGVVHNAK	D/oaD	92.46	7.54	0.36
TPPVLDSGGSFVYK	D/oaD	100.00	0.00	0.00



2.8. References

1. Beck, A., et al., *Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 345-352.
2. Reichert, J.M., *Marketed therapeutic antibodies compendium*. mAbs, 2012. **4**(3): p. 413-415.
3. Berger, M., V. Shankar, and A. Vafai, *Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies*. The American Journal of the Medical Sciences, 2002. **324**(1): p. 14-30.
4. Kaplon, H. and J.M. Reichert, *Antibodies to watch in 2018*. mAbs, 2018. **10**(2): p. 183-203.
5. Beck, A., et al., *Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(2): p. 715-736.
6. Reusch, D., et al., *Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 1: Separation-based methods*. Mabs, 2015. **7**(1): p. 167-179.
7. Lossel, P., M. van de Waterbeemd, and A.J.R. Heck, *The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology*. Embo Journal, 2016. **35**(24): p. 2634-2657.
8. Rosati, S., et al., *Detailed mass analysis of structural heterogeneity in monoclonal antibodies using native mass spectrometry*. Nat. Protocols, 2014. **9**(4): p. 967-976.
9. Fekete, S., et al., *Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(1): p. 480-507.
10. Reusch, D., et al., *Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 2: Mass spectrometric methods*. Mabs, 2015. **7**(4): p. 732-742.
11. Redman, E.A., et al., *Integrated Microfluidic Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Devices with Online MS Detection for the Separation and Characterization of Intact Monoclonal Antibody Variants*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(4): p. 2264-2272.
12. Belov, A.M., et al., *Analysis of Proteins, Protein Complexes, and Organellar Proteomes Using Sheathless Capillary Zone Electrophoresis - Native Mass Spectrometry*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2017. **28**(12): p. 2614-2634.
13. Haselberg, R., et al., *Heterogeneity assessment of antibody-derived therapeutics at the intact and middle-up level by low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2018. **1044**: p. 181-190.
14. Zhao, Y., et al., *Fast separation and analysis of reduced monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry*. Talanta, 2016. **148**: p. 529-533.
15. Gahoual, R., et al., *Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*. Mabs, 2013. **5**(3): p. 479-490.
16. Han, M., et al., *Intact mass analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis—Mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2016. **1011**: p. 24-32.
17. Lechner, A., et al., *Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016–2018*. Journal of Chromatography B, 2019. **1122-1123**: p. 1-17.
18. Giorgetti, J., et al., *Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry*. European Journal of Mass Spectrometry, 2018. **25**(3): p. 324-332.
19. Gahoual, R., et al., *Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products*. Journal of Chromatography B, 2016. **1032**: p. 61-78.
20. Belov, A.M., et al., *Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis – mass spectrometry*. Electrophoresis, 2018. **39**(16): p. 2069-2082.
21. Goyon, A., et al., *Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies*. Journal of Chromatography B, 2017. **1065**(Supplement C): p. 119-128.

22. Du, Y., et al., *Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies*. *mAbs*, 2012. **4**(5): p. 578-585.
23. Resemann, A., et al., *Full validation of therapeutic antibody sequences by middle-up mass measurements and middle-down protein sequencing*. *mAbs*, 2016. **8**(2): p. 318-330.
24. Fornelli, L., et al., *Middle-Down Analysis of Monoclonal Antibodies with Electron Transfer Dissociation Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(6): p. 3005-3012.
25. Dai, J. and Y. Zhang, *A Middle-Up Approach with Online Capillary Isoelectric Focusing/Mass Spectrometry for In-Depth Characterization of Cetuximab Charge Heterogeneity*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(24): p. 14527-14534.
26. Gahoual, R., et al., *Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(18): p. 9074-9081.
27. Giorgetti, J., et al., *Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis – Mass spectrometry: Assessment and method validation*. *Talanta*, 2018. **178**(Supplement C): p. 530-537.

Conclusion générale et perspectives

L'objet des travaux de ces 3 années de thèse consistait en une analyse des anticorps monoclonaux (mAbs) à différents niveaux : bottom-up, middle-up et molécule intacte à l'aide d'un couplage d'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse (CE-MS).

La première partie de ce manuscrit était consacrée à l'étude bibliographique de l'origine des anticorps jusqu'à leur arrivée sur le marché en tant que traitements ainsi que les méthodes électrophorétiques permettant de les caractériser. Cette étude permet de comprendre l'évolution des traitements d'immunothérapie pour avoir aujourd'hui des traitements plus efficaces, plus spécifiques et propres à un plus grand nombre de pathologies dont différents de types de cancers. L'identification des molécules de type anticorps issues du système immunitaire et de leur fonctionnement a permis leur sélection, leur production par différents moyens puis leur optimisation afin de réduire l'innocuité des traitements. La croissance exponentielle des molécules candidates comme nouveaux traitements a nécessité le développement d'outils analytiques rapides et précis afin d'orienter la sélection des molécules candidates lors des phases précliniques et cliniques. Bien que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse soit la technique de référence des biomolécules et notamment des protéines thérapeutiques, le développement de techniques orthogonales est requis afin de pouvoir valider les informations obtenues sur les mAbs et éventuellement compléter la caractérisation. Le couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse s'est déjà révélé comme particulièrement efficace dans la séparation et l'identification des biomolécules thérapeutiques et apparaît comme une solution complémentaire afin d'étayer la caractérisation fine des biomolécules. En effet, l'efficacité de séparation et la grande quantité d'informations rendues accessibles par les différents niveaux d'étude des mAbs confèrent à cette technique une pertinence dans son application afin d'élucider la structure des mAbs ainsi que les éventuelles modifications associées.

Pour la deuxième partie du manuscrit, nous nous sommes intéressés à la validation de la technique CE-MS pour caractériser et quantifier de manière relative les N-glycosylations portées par la chaîne lourde des mAbs. Depuis plusieurs décennies, la technique de référence pour la quantification des N-glycosylation est la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) avec une détection par fluorescence (FD). Cependant, cette technique nécessite le clivage des N-glycosylations de la partie protéique afin de pouvoir les analyser par la suite. L'information quant à la localisation de ces N-glycosylations et leur représentation relative sur les mAbs nécessite donc d'autres techniques et nuit à la caractérisation à haut débit des mAbs étudiés. Contrairement à la HILIC, la CE-

MS permet d'obtenir davantage d'informations structurales sur ces glycoprotéines de forte masse moléculaire, notamment sur l'hétérogénéité de charge, les isoformes présentes ou encore les PTMs ou dégradations des mAbs. L'objectif de cette partie était de démontrer la capacité du couplage CE-MS à caractériser et quantifier les N-glycosylations en plus des autres informations structurales, le tout en une seule injection d'un très faible volume d'échantillon (200 fmoles). Pour mener à bien cette validation, différents critères ont été étudiés pour nous assurer de la réelle efficacité de la méthode. En effet, la répétabilité, la reproductibilité ainsi que la non-spécificité de la méthode pour 1 seul mAb ont été étudiées. La méthode développée est basée sur une stratégie bottom-up utilisée classiquement en protéomique et a permis de dresser les profils de glycosylations de 10 mAbs commerciaux différents. Pour chaque mAb, 14 glycoformes ont été identifiées et quantifiées relativement. Les résultats obtenus par CE-MS ont été confrontés avec ceux obtenus en HILIC-FD ainsi que ceux de la littérature où les profils des mêmes mAbs ont été élaborés à partir d'un couplage nanoLC-MS. La superposition des tous les profils obtenus en CE-MS et avec les autres techniques est très satisfaisante et a permis de valider la méthode de CE-MS pour l'identification et la quantification relative de N-glycosylation des mAbs. La liste des informations disponibles en une seule injection par CE-MS en vue de la caractérisation fine d'un digest de mAb est donc agrémentée de modifications post-traductionnelles (PTMs) présentes et notamment des N-glycosylations.

Bien qu'apportant beaucoup d'informations sur la structure primaire d'un mAb, la technique dite « bottom-up » ne permet pas à elle seule de caractériser un mAb. Les informations obtenues ne permettent pas d'avoir la combinaison des PTMs sur une seule molécule d'anticorps, qui peuvent être dépendantes des conditions de production et de stockage des mAbs. C'est pourquoi l'analyse des mAbs à d'autres niveaux moléculaires doivent être explorés. La dernière partie de cette thèse a donc consisté à développer des méthodes basées sur le couplage CE-MS afin d'obtenir d'étayer les informations structurales des mAbs et illustrer de manière plus précise la composition des traitements en termes de variants de mAbs. L'hétérogénéité présente dans un traitement nécessite une analyse fine afin de s'assurer de la qualité du traitement administrée au patient et éventuellement orienter les processus de fabrication ou de stockage afin d'optimiser l'efficacité des traitements tout en assurant leur innocuité. L'étude des molécules de taille conséquente telles que les mAbs étant plus fastidieuse que celles des peptides, nous avons étudié un grand nombre de conditions afin de séparer les mAbs au niveau de la molécule intact mais également à un niveau intermédiaire, le « middle-up ». La séparation de mAb au niveau intact en électrophorèse étant très récente, il nous a fallu étudier chaque paramètre impliqué dans la séparation électrophorétique ainsi que les conditions adéquates afin d'obtenir une séparation partielle des isoformes des mAbs. D'abord, différents greffages de capillaire ont été investigués afin de limiter voire annuler tout effet d'adsorption des mAbs sur la paroi interne

du capillaire. L'étape suivante a consisté à étudier les solvants permettant une séparation sous un champ électrique mais compatible avec une détection en MS dès la sortie du capillaire de CE. Enfin, des additifs ont été ajoutés à ces solvants jusqu'à obtenir une séparation partielle d'isoformes de plusieurs mAbs en un temps inférieur à 12 minutes. Les isoformes ainsi séparées et détectées en MS ont alors pu être caractérisées à l'aide de logiciels bio-informatiques. La chaîne protéique ainsi que les différentes PTMs ont pu être élucidées avec confiance au regard des faibles erreurs de masses obtenues entre les calculs expérimentaux et théoriques. Les étapes de préparation d'échantillon étant limitées pour l'étude au niveau intact, les résultats obtenus sont les plus proches possible de ce qu'il y a réellement dans les échantillons. Cependant, pour nous assurer de la fiabilité des résultats, nous avons complété notre analyse au niveau « middle-up ». Ce niveau intermédiaire a consisté en la digestion enzymatique partielle de l'anticorps afin d'obtenir 2 types de fragments, Fc et F(ab)'₂. Le fragment F(ab)'₂ possède une masse proche de 100 kDa, nous avons donc ajouté une étape de réduction afin d'obtenir des fragments Fd et LC de l'ordre de 25 kDa, pour lesquels la précision de masse est meilleure. Enfin, après étude de ces fragments pour les mAbs étudiés préalablement aux niveaux bottom-up et intact, nous nous sommes assurés de la concordance des résultats afin de fournir une caractérisation complète fiable de ces mAbs.

Bien que les résultats exposés dans cette thèse aient été valorisés sous la forme de plusieurs publications dans des revues scientifiques, des perspectives sont envisagées pour cette étude de mAbs à différents niveaux, notamment en ce qui concerne les niveaux intact et middle-up. En effet, les conditions de séparation étudiées lors de ces travaux ne sont pas exhaustives et certaines semblent prometteuses au vue des résultats décrits dans la littérature.

Par exemple, différents types de greffages sont développés tels que d'autres greffages positifs, des greffages neutres ou encore super hydrophobes et pourraient être utilisées pour tenter de séparer et analyser d'autres isoformes de mAbs. De plus, les solvants et additifs explorés durant ces travaux sont les plus utilisés en électrophorèse, or d'autres solvants conducteurs compatibles avec la MS pourraient être étudiés et les ajustements plus précis pourraient être exécutés.

Nos études ont été réalisées sur un seul type de capillaire (30 µm de diamètre interne) et à l'aide d'une source sheathless. Des sources CE-MS ainsi que des dimensions de capillaires alternatives permettent l'utilisation de greffages dynamiques ou covalents ayant des propriétés différentes qui permettraient la séparation de variants de mAbs différents que ceux obtenus lors de ces travaux de thèse.

D'autre part, une meilleure compréhension de la solvatation des glycoprotéines telles que les mAbs avec les différents solvants permettrait certainement d'augmenter la séparation des variants de mAbs et ainsi découvrir d'éventuelles modifications additionnelles.

Lors de nos études nous avons travaillé sur des biosimilaires or, l'ampleur du marché de molécules « génériques » étant croissant, l'étude de plusieurs biosimilaires et les données thérapeutiques permettraient de cibler de nouveaux attributs critiques de qualité et garantir l'amélioration des traitements.

Les traitements de types Antibody-Drug Conjugates (ADCs) basés sur la conjugaison d'une cytotoxine à un mAb semblent particulièrement intéressants d'un point de vue thérapeutique. Le verrou majeur réside dans la complexité des glycoprotéines accrue par la conjugaison et cela nécessite un développement de méthode adapté afin de pouvoir caractériser ces molécules à tous les niveaux.

Annexes

Liste des communications scientifiques

Publications avec comité de lecture

Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016-2018, A. Lechner, **J. Giorgetti**, R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, YN. Francois, *Journal of Chromatography B*, acceptée,

D. O. I. 10.1016/j.jchromb.2019.05.014

Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry, **J. Giorgetti**, A. Lechner, E. Del Nero, A. Beck, YN. Francois, E. Leize-Wagner, *European Journal of Mass Spectrometry*, 2018, acceptée,

D.O.I. 10.1177/1469066718807798

Book Chapter: Biopharmaceutical applications of capillary electromigration methods, R. Gahoual, **J. Giorgetti**, A. Beck, E. Leize-Wagner, YN Francois, *Capillary Electromigration Separation Methods*, edited by Colin Poole, Elsevier, 2018,

D.O.I. 10.1016/B978-0-12-809375-7.00021-6

Monoclonal Antibody N-Glycosylation Profiling using Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry: Assessment and Method Validation, **J. Giorgetti**, V. D'Atri, J. Canonge, A. Lechner, D. Guillarme, O. Colas, E. Wagner-Rousset, A. Beck, E. Leize-Wagner, YN. François, *Talanta*, 2018, 178, 530-53

D.O.I. 10.1016/j.talanta.2017.09.083

Publications sans comité de lecture

Advanced antibody-drug conjugate structural characterization by sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry using complementary approaches, N. Said, **J. Giorgetti**, L. Kuhn, A. Beck, E. Leize-Wagner, R. Gahoual, YN. François, *LCGC North America*, 2017, 15, 15-21

Liste des présentations

Communications orales :

2019, mai 7, Journée de l'UMR 4140, Strasbourg : *Separation and analysis of monoclonal antibodies at intact and middle-up levels by sheathless capillary electrophoresis – mass spectrometry*. **Jérémie Giorgetti**, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François

2019, mars 27, SEP (Congrès des Sciences Séparatives), Paris : *Analyse d'anticorps monoclonaux à différents niveaux par un couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse*. **Jérémie Giorgetti**, Antony Lechner, Elise Del Nero, Alain Beck, Yannis-Nicolas François, Emmanuelle Leize-Wagner

2018, avril 17, Journée de l'UMR 7140, Strasbourg : *Analysis of Monoclonal Antibody Fc-glycosylation profiles using Capillary electrophoresis – mass spectrometry, assessment and validation*. **Jérémie Giorgetti**, Julie Canonge, Valentina D'Atri, Davy Guillaume, Olivier Colas, Elsa Wagner-Rousset, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François

2017, novembre 30, International Workshop "Enzyme reactivities and their applications", Strasbourg : *Analysis of Monoclonal Antibody Fc-glycosylation profiles using Capillary electrophoresis – mass spectrometry, assessment and validation*. **Jérémie Giorgetti**, Julie Canonge, Valentina D'Atri, Davy Guillaume, Olivier Colas, Elsa Wagner-Rousset, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François

2017, octobre 03, SMMAP (Congrès de spectrométrie de masse, métabolomique, et analyses protéomiques), Paris : *Analyse de profils de glycosylation d'anticorps monoclonaux par un couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse, étude et validation* - **Jérémie Giorgetti**, Julie Canonge, Valentina D'Atri, Davy Guillaume, Olivier Colas, Elsa Wagner-Rousset, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François

Communications par affiche :

2019, mars 26, EuPA (European Proteomics Association), Potsdam (Germany): *High-order structural characterization of monoclonal antibodies by combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry*. **Jérémie Giorgetti**, Nassur Saïd, Rabah Gahoual, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François, Pierre-Olivier Schmit

2018, juin 06, ASMS (American Society of Mass Spectrometry), San Diego (California, USA): [High-order structural characterization of 10 monoclonal antibodies by combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry](#). **Jérémie Giorgetti**, Nassur Saïd, Rabah Gahoual, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François

Enseignements délivrés en tant que moniteur

Année universitaire 2017 - 2018 (I. U. T. Louis Pasteur de Schiltigheim)

- Travaux pratiques de Biochimie Structurale – 1^{ère} année de D. U. T. Génie Biologique option Génie de l'Environnement
- Travaux pratiques de Traitements des Eaux Usées – 2^{ème} année de D. U. T. Génie Biologique option Génie de l'Environnement

Année universitaire 2018 - 2019 (I. U. T. Louis Pasteur de Schiltigheim)

- Travaux pratiques de Biochimie Structurale – 1^{ère} année de D. U. T. Génie Biologique option Génie de l'Environnement
- Travaux pratiques de Traitements des Eaux Usées – 2^{ème} année de D. U. T. Génie Biologique option Génie de l'Environnement

Formations supplémentaires :

- Participation aux 22èmes rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse (RCJSM) – du 20 au 24 mars 2017 – Trélon (59)
- Participation aux Doctoriales d'Alsace 2018 – du 14 au 18 mai – La villa Mathis – Breitenbach (67)

Annexe 1 : Poster présenté au congrès SMAP 2019 (Strasbourg)

Separation and analysis of monoclonal antibodies at intact and middle-up levels by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry



Jérémie GIORGETTI¹, Alain BECK², Emmanuelle LEIZE-WAGNER¹, Yannis-Nicolas FRANCOIS¹

¹ Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes (LSMIS), CNRS – UMR7140, University of Strasbourg, Strasbourg (France),
² Centre d'immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien-en-Genevois (France)



Introduction

Biotherapeutic proteins (biologics), although introduced only since two decades, represents the class of therapeutic agent having the fastest growth regarding market shares and are nowadays available in different format: fusion proteins, monoclonal antibodies (mAbs), biosimilars or antibody-drug conjugates (ADC). The complexity of such molecules requires advanced and comprehensive characterization in order to guarantee their potency and safety, therefore urging the development of innovative analytical strategies involving mass spectrometry. Here we present an overview of different methodologies involving innovative capillary electrophoresis tandem mass spectrometry coupling for the characterization of biologics' structure and post-translational modifications (glycosylation, asparagine deamidation, aspartic acid racemization) at different level (intact, middle-up and bottom-up). Such level of characterization is permitted by cumulating the specificities of both CE and high resolution MS therefore renewing the interest for this type of coupling.

Methods

Intact mAb sample preparation. Each mAb was buffer exchanged with milliQ water using Amicon centrifugal filters (cut off = 10,000 Da) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Three desalting steps were performed at 10°C and 14,000 g for 20 min each step. Sample was finally diluted to a final concentration of 1 µg/µL using Formic Acid 1% MeOH (70/30) (v/v).

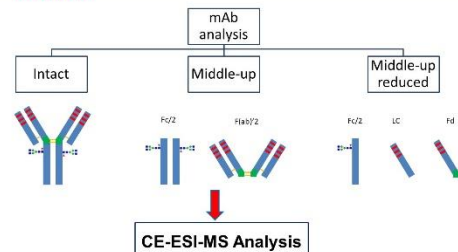
MABs IdeS digestion. Each mAb was cleaved under the hinge region using proteolysis by IdeS enzyme (FABRICATOR, Genovis) to obtain two Fc/2 fragments and one F(ab)2 fragment.

Reduction step. 20 mM TCEP were added to IdeS digested mAbs then desalting steps were applied to earn Fc, LC and Fc/2 fragments in milliQ water.

CE conditions. CE system was equipped with a bare-fused silica capillary cartridge (90 cm, 30 µm i.d.) to characterize peptides. PEI positively coated capillaries were used for both intact and middle-up analyses [1].

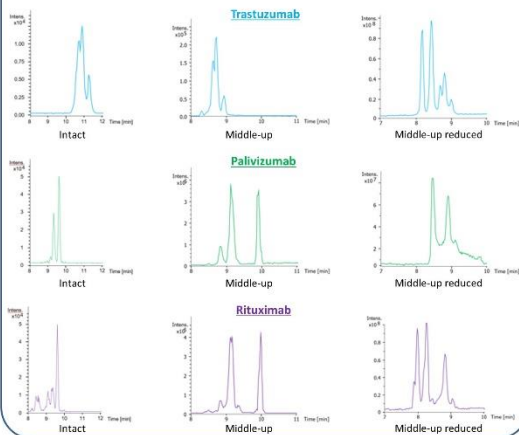
Mass Spectrometry. Capillary electrophoresis system was coupled to a tims-TOF Pro (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) by a sheathless interface.

Workflow



Results

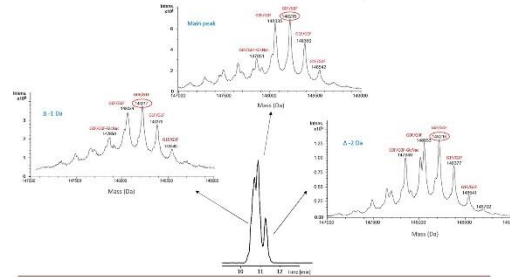
Separation of mAbs charge variants



[1] Giorgetti et al. European Journal of Mass Spectrometry, 2018

Results

Characterization of Intact trastuzumab charge variants

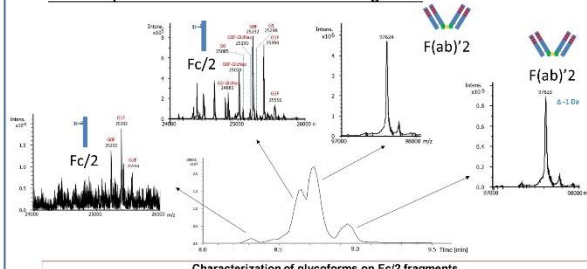


Structural information on:

- Intact mass of the mAb
- Major glycoform
- Hypothesis about separation due to Asn deamidation
- Hypothesis about separation due to Asp isomerization

Results

Middle-up characterization of trastuzumab fragments



Characterization of glycoforms on Fc/2 fragments
 Characterization of potential PTMs (N deamidation, D isomerization) on Fc/2 and F(ab)2 fragments

Results

Middle-up characterization of trastuzumab PTMs at the middle-up level

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	[H1N2F1]	24501.18	24501.32	Kclip	8.60	0.14
Fc/2	[H1N2F1]	24603.88	24603.86	Kclip	8.60	-0.02
Fc/2	[H3N2F1]	24825.60	24825.60	Kclip	8.65	0.00
Fc/2	[H3N3F1]	24866.00	24866.65	Kclip	8.65	0.65
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25232.03	25231.99	Kclip	8.65	-0.04
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25393.57	25394.13	Kclip	8.65	0.56
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25555.49	25556.27	Kclip	8.65	0.78
Fc/2	G0F-GlcNAc [H3N3F1]	25028.87	25028.79	Kclip	8.60	-0.08
Fc/2	G1F-GlcNAc [H4N3F1]	25189.69	25189.96	Kclip + 1 deam*	8.65	0.27
Fc/2	G0 [H3N4]	25095.07	25095.85	Kclip	8.65	0.78
Fc/2	G1 [H4N4]	25248.51	25247.99	Kclip	8.65	-0.52
Fc/2	G2 [H5N4]	25410.64	25410.13	Kclip	8.65	-0.51
Fc/2	G0-GlcNAc [H3N3]	24881.60	24882.65	Kclip + 1 deam*	8.65	1.05
Fc/2	G1-GlcNAc [H4N3]	25044.58	25044.79	Kclip	8.65	0.41
Fc/2	Man5 [H5N2]	25003.44	25003.74	Kclip	8.65	0.30
F(ab)2	-	97628.55	97628.13	Kclip	8.55	-0.42
F(ab)2	-	97624.53	97625.19	Kclip + 3 deam*	8.75	0.66
F(ab)2	-	97623.51	97624.21	Kclip + 4 deam*	8.90	0.70

Middle-up characterization of trastuzumab PTMs at the middle-up reduced level

fragment	glycan species	observed mass (Da)	theoretical mass (Da)	assigned PTM	migration time (min)	Δ mass (Da)
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25233.88	25234.06	Kclip + 2 deam*	8.75	0.18
Fc/2	G0F [H3N4F1]	25232.94	25233.08	Kclip + 3 deam*	9.05	0.14
Fc/2	G1F [H4N4F1]	25396.65	25397.18	Kclip + 1 deam*	8.82	0.53
Fc/2	G2F [H5N4F1]	25557.94	25558.34	Kclip + 2 deam*	8.85	0.40
Fc/2	G0 [H3N4]	25087.94	25087.92	Kclip + 2 deam*	8.85	-0.02
LC	-	23442.56	23442.88	1 deam*	8.35	0.32
LC	-	23438.13	23437.96	3 deam*	8.85	-0.17
LC	-	23458.54	23458.85	oxy	8.45	0.31
Fd	-	25382.75	25383.31	2 deam*	8.25	0.56
Fd	-	25380.70	25381.35	1 deam*	8.45	0.65
Fd	-	25399.81	25399.31	oxy	8.25	-0.50
Fd	-	25415.25	25415.31	2x oxy	8.45	0.06

Conclusion

CE-MS coupling allowed the characterization of 3 worldwide approved mAbs (trastuzumab, palivizumab and rituximab) at the intact and the middle-up levels. Here, a partial separation of isoforms has been performed in a short time (<12 min) for each mAb. Relevant PTMs like N-glycosylations, oxidations and deamidations have been assigned with a high accuracy. Overlapped results earned at the 2 levels allow to ensure the confidence of mAbs characterization.

Acknowledgement

Authors would like to thank the Bruker society and the general council of Region Grand Est for fruitful collaboration and Ph. D. grant

