



HAL
open science

Caractérisation de protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Yann Leblanc

► **To cite this version:**

Yann Leblanc. Caractérisation de protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASF041 . tel-03720193

HAL Id: tel-03720193

<https://theses.hal.science/tel-03720193v1>

Submitted on 11 Jul 2022

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.

Caractérisation de protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

*Coupling of chromatographic methods with mass spectrometry for
the characterization of therapeutic proteins*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale : Sciences chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et
Biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Graduate School : Chimie. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institut de Chimie Physique (Université
Paris-Saclay, CNRS)**, sous la direction de **Frédéric HALGAND**, Chargé de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 14 juin 2022, par

Yann LEBLANC

Composition du Jury

Guillaume VAN DER REST Professeur, Université Paris-Saclay	Président
Sarah CIANFERANI Directrice de recherche, Université de Strasbourg	Rapporteur & Examinatrice
Emmanuelle SACHON Maîtresse de conférences, HDR Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur & Examinatrice
Human REZAEI Directeur de recherche, INRAe	Examineur
Rabah GAHOUAL Maître de conférences Université Paris Descartes	Examineur
Frédéric HALGAND Chargé de recherche, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

Titre : Caractérisation de protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Mots clés : Spectrométrie de masse, Chromatographie, Protéines thérapeutiques, Biochimie

Résumé : Les protéines thérapeutiques occupent une place déterminante dans le traitement de pathologies graves tels les cancers, l'hémophilie ou les déficits immunitaires, et constituent souvent l'unique alternative thérapeutique disponible. La chromatographie liquide et la spectrométrie de masse constituent les méthodes de référence pour la caractérisation structurale des protéines. Cette thèse rassemble des travaux portant sur le développement de méthodes de chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse pour la caractérisation de différents types de protéines thérapeutiques. La première partie des résultats décrit le développement de méthodes de chromatographie liquide de phase inverse couplées à la spectrométrie de masse pour la caractérisation de modifications post-traductionnelles

d'anticorps polyclonaux, telles que l'oxydation et la glycation, et permettant l'évaluation de l'intégrité de ponts disulfures d'anticorps monoclonaux. La seconde partie présente le développement de méthodes de spectrométrie de masse native pour la caractérisation des isoformes d'anticorps monoclonaux et de l'albumine, notamment par le couplage de méthodes de chromatographie d'échanges d'ions à la spectrométrie de masse. En dernier lieu, la relation structure/fonction entre une protéine thérapeutique et un récepteur est évaluée par l'étude de l'impact des modifications post-traductionnelles de l'albumine sur son interaction au récepteur néo natal Fc et l'impact de la lysine en position C-terminale d'un anticorps monoclonal sur son interaction aux récepteurs néo natal Fc et FcγRIIIa.

Title : Coupling of chromatographic methods with mass spectrometry for the characterization of therapeutic proteins

Keywords : Mass spectrometry, Chromatography, Therapeutic proteins, Biochemistry

Abstract : Therapeutic proteins play a determinant role in the treatment of rare pathologies such as cancers, hemophilia, or immunodeficiency, and are often the unique therapeutic alternative available. Proteins are complex molecules with up to four different levels of structure and can suffer from numerous modifications that must be characterized before injection to patients. Liquid chromatography and mass spectrometry are the gold standard methods for the structural characterization of proteins. This thesis presents the development of liquid chromatography methods coupled to mass spectrometry for the characterization of different types of therapeutic proteins. The first part of the results describes the development of reverse phase liquid chromatography methods coupled to mass

spectrometry for the characterization of post-translational modifications of polyclonal antibodies, such as oxidation and glycation, and the evaluation of the integrity of monoclonal antibodies disulfide bonds. The second part presents the development of native mass spectrometry methods for the characterization of monoclonal antibodies and albumin isoforms by the coupling of ion exchange chromatographic methods to mass spectrometry. Finally, the structure / function relationship between a therapeutic protein and a receptor is evaluated by studying the impact of post-translational modifications of albumin on its interaction with the neonatal Fc receptor and the impact of lysine in the C-terminal position of a monoclonal antibody on its interaction with neonatal Fc and FcγRIII receptors.

Remerciements

En premier lieu je souhaite témoigner toute ma reconnaissance à Frédéric Halgand qui a accepté d'encadrer cette thèse un peu particulière. Merci pour la bienveillance et la disponibilité dont tu as fait preuve lors de la rédaction de ce manuscrit, et surtout pour l'expertise scientifique que tu m'as apportée.

Je souhaite remercier Madame Sarah Cianféroni et Madame Emmanuelle Sachon d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Monsieur Human Rezaei et Monsieur Rabah Gahoual d'avoir accepté d'évaluer mes travaux, ainsi que Monsieur Guillaume Van Der Rest d'avoir examiné ce mémoire et présidé mon jury de thèse.

Je remercie très sincèrement Guillaume Chevreux qui a encadré mon travail au sein du laboratoire de caractérisation et de méthodes séparatives de la société LFB. La rigueur, l'exigence et la créativité scientifique qui te caractérisent nous ont permis de concrétiser de nombreux projets présentés dans cette thèse et ont participé à mon évolution scientifique et professionnelle. Merci pour la confiance que tu m'as accordé au cours de ces années.

Je tiens également à remercier Alexander Seifert et Ludovic Burlot pour leur soutien dans ma démarche de validation de ce doctorat, ainsi que Marie Romanin et Nicolas Bihoreau qui m'ont permis d'intégrer la société LFB.

Un grand merci à Valegh Faid. Dès mes premiers pas au sein de la société LFB, et même lors de la rédaction de cette thèse, tu as toujours été d'un grand soutien. Nos échanges scientifiques et ton expertise ont toujours été précieux, nous permettant souvent de venir à bout des problématiques les plus complexes.

Violaine, merci pour tes précieux conseils en spectrométrie de masse et pour ton amitié, je sais pouvoir toujours compter sur toi.

Je souhaite remercier Nolwenn dont la connaissance des spectromètres de masse a toujours été d'un grand secours.

Je remercie les membres du département analytique, Catherine, Katia, Jean-Marc, Christine, Arthur et Clément, ainsi que les membres du département des procédés, Frédéric, Damien,

Stéphane et surtout Michel pour ses conseils et son expertise des protéines plasmatiques et de leurs procédés de fabrication.

J'ai également une pensée pour tous les collègues avec qui j'ai travaillé ces dernières années et qui ont quitté le LFB, Mélanie, Cynthia, Maxime, Xavier, Magali et Bruno.

Je remercie mes parents pour leur soutien et ma sœur jumelle dont j'admire la détermination qu'elle emploie à réussir tout ce qu'elle entreprend.

Damien et David, quinze ans après, c'est « retour à la fac ». Merci pour votre amitié.

Finalement, mes plus grands remerciements reviennent à mon épouse Deniz, dont le calme et la douceur cachent une force qui pourrait déplacer des montagnes. Ton exemple me pousse à être meilleur chaque jour, rien ne serait possible sans toi. Merci pour tout le soutien que tu m'apportes.

À mes fils, Evrim et Aksel,

À Deniz,

« Le succès n'est pas final, l'échec n'est pas fatal, c'est le courage de continuer qui compte »

Winston Churchill

Liste des abréviations

α -gal : Galactose- α -1,3-galactose
ADC : *Antibody Drug Conjugate*
ADCC : *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*
ADCP : *Antibody-dependent cellular phagocytosis*
AGE : *Advanced Glycated End-products*
BEH : *Ethylene Bridged Hybrid*
BHK : *Baby Hamster Kidney*
CCS: *Collision Cross-Section*
CDC : *Complement-dependent cytotoxicity*
CDR : *Complementary determining regions*
CHO : *Chinese Hamster Ovary*
CID : *Collision Induced Dissociation*
CIU : *Collision Induced Unfolding*
CQA : *Critical Quality Attributes*
CSD : *Charge State Distribution*
DAR : *Drug-to-antibody Ratio*
DDA : *Data Dependent Acquisition*
DEAE : *Diéthylaminoéthyl*
DIA : *Data Independent Acquisition*
DTIMS : *Drift Tube Ion Mobility Spectrometry*
ESI : *Electrospray Ionization*
ECD : *Electron Capture Dissociation*
ETD : *Electron Transfert Dissociation*
Fab : *Fragment, antigen-binding*
FDA : *Food and drug administration*
Fc : *Fragment cristallisable*

FcγR : Récepteur gamma Fc

FcRn : Récepteur Fc néo-natal

FPOP : *Fast Photo-Oxidation of Proteins*

GlcNAc : N-acétylglucosamine

HILIC : *Hydrophilic interaction liquid chromatography*

HOS : *Higher order structure*

HPLC : *High performance liquid chromatography*

HSA : Sérumalbumine humaine

IEX : *Ion Exchange chromatography*

IGIV : Immunoglobulines intra-veineuses

IMAC : *Immobilized Metal Affinity Chromatography*

IMS: *Ion Mobility Spectrometry*

LC-MS : *Liquid chromatography coupled to mass spectrometry*

Neu5Ac : Acide N-acétylneuraminique

Neu5Gc : Acide N-glycolylneuraminique

MALDI : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

MAM : *Multi-attribute Monitoring*

MPT : Modification post-traductionnelle

MS : *Mass spectrometry*

PEG : Polyéthylène glycol

pI : Point isoélectrique

PPSB : Prothrombine, Proconvertine, facteur Stuart, facteur antihémophilique B

PTT : Purpura Thrombotique Thrombocytopénique

ROS : *Reactive oxygen species*

RPC : *Reversed phase chromatography*

SEC : *Size Exclusion Chromatography*

Serpines : *serine protease inhibitor*

TFA : *Trifluoroacetic acid*

TFPI : *Tissue Factor Pathway Inhibitor*

TnBP : tri *n*-butyl phosphate

TOF : *Time of Flight*

TWIMS : *Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry*

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

XIC : *Extracted Ion Chromatogram*

Liste des définitions

Ascite : Epanchement (ou accumulation) de liquide non-sanglant dans la cavité péritonéale, c'est-à-dire à l'intérieur de la membrane qui entoure les viscères abdominaux.

Asialoglycoprotéines : Glycoprotéines dont l'acide sialique terminal a été clivé par des sialidases, avec pour conséquence une élimination rapide de la circulation sanguine à travers les récepteurs hépatiques.

Biosimilaire : Un médicament biologique similaire (« biosimilaire ») est un médicament biologique de même composition qualitative et quantitative en substance active et de même forme pharmaceutique qu'un médicament biologique de référence.

Clairance : La clairance est la capacité d'un tissu, organe ou organisme à débarrasser un liquide biologique (le sang, la lymphe, etc.) d'une substance donnée.

Cosmotropicité : Les ions cosmotropiques contribuent à la stabilité et à la structure des interactions entre molécules d'eau. Ce type d'ion stabilisent les interactions intramoléculaires de macromolécules telles que les protéines.

Cristalloïdes et Colloïdes : Solutés de remplissage vasculaire visant à maintenir le volume sanguin. Les cristalloïdes sont des solutions salines (sérum physiologique ou Ringer Lactate) à petites molécules et peu coûteuses mais ayant un pouvoir d'expansion volémique limité. Les colloïdes sont constitués de plus grosses molécules (naturelles ou synthétiques) permettant une augmentation du volume sanguin plus efficace.

Dégradation des protéines : Toute modification structurale indésirable (modification chimique, dénaturation, clivage...) subi *in vivo* ou *in vitro* par une protéine est considérée comme une dégradation.

Formulation pharmaceutique : La formulation correspond à la composition qualitative et quantitative des excipients et du (des) principe(s) actif(s) contenu(s) dans un médicament.

Structure et conformation des protéines : Dans cette thèse, le terme structure désigne l'ensemble des caractéristiques structurales d'une protéine (structure primaire, secondaire,

tertiaire et quaternaire). Le terme conformation se réfère à des structures n'impliquant pas de modifications covalentes et/ou de variation de la masse des protéines.

Hypovolémie : Diminution du volume sanguin efficace, c'est-à-dire de celui qui est physiologiquement nécessaire au maintien d'une fonction circulatoire normale.

Maladie de Kawasaki : Maladie inflammatoire rare caractérisée par une vascularite fébrile aiguë, systémique, autolimitée et de taille moyenne, qui touche principalement les enfants.

Paracentèse : Ponction à travers une paroi de l'organisme ayant pour but d'évacuer du pus ou un liquide anormal dans une cavité naturelle du corps (par exemple, cavité péritonéale).

Protéoforme : Les protéoformes désignent toutes les formes sous lesquelles une protéine donnée produite par un même gène peut être présente. Ces protéoformes peuvent avoir pour origines des variations génétiques ou des modifications post-traductionnelles.

Syndrome de Guillain Barré : Le syndrome de Guillain-Barré est une atteinte des nerfs périphériques (polyneuropathie) se manifestant brutalement par une faiblesse musculaire qui prédomine dans les régions proximales des membres, pouvant s'accroître jusqu'à la paralysie.

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations	4
Liste des définitions	7
Table des matières	9
Introduction générale et présentation de la thèse	13
Partie I : Introduction bibliographique	15
Chapitre I : Les protéines thérapeutiques	15
1. Les protéines thérapeutiques plasmatiques	15
I. La production de médicaments à partir de plasma humain	15
i. Le plasma sanguin	15
ii. Le fractionnement du plasma et la purification des protéines plasmatiques	16
iii. La sécurisation biologique des produits dérivés du plasma	19
II. Les protéines plasmatiques et leurs indications thérapeutiques	22
i. Les facteurs de la coagulation	22
ii. Les inhibiteurs de protéases et anticoagulants	24
iii. Les immunoglobulines G	25
iv. L'albumine	26
2. Les protéines thérapeutiques recombinantes	27
I. Les systèmes d'expression et de production	27
i. Les procaryotes et eucaryotes inférieurs	27
ii. Les cellules de mammifères	28
iii. Les animaux et plantes transgéniques	33
II. Les protéines recombinantes et leurs indications thérapeutiques	34
i. Les anticorps et protéines thérapeutiques dérivées	34
ii. Les enzymes, hormones et autres protéines thérapeutiques recombinantes	38
3. La structure des protéines thérapeutiques	39
I. Les 4 niveaux de structure des protéines	39
II. Les modifications post-traductionnelles des protéines	40
III. La relation/structure fonction des protéines	46

IV. L'importance de la caractérisation des protéines thérapeutiques dans le contexte réglementaire et pharmaceutique _____	47
Chapitre II : Les méthodes de caractérisation structurale des protéines thérapeutiques _____	49
1. La chromatographie liquide appliquée à l'analyse de protéines thérapeutiques _____	49
I. La chromatographie d'exclusion stérique _____	49
II. La chromatographie d'échange d'ions _____	51
III. La chromatographie d'affinité _____	53
IV. La chromatographie d'interaction hydrophobe _____	55
V. La chromatographie en phase inverse _____	56
VI. La chromatographie liquide ultra/haute performance _____	58
VII. La chromatographie bidimensionnelle _____	60
VIII. Le couplage de méthodes chromatographiques à la spectrométrie de masse _____	61
2. La spectrométrie de masse appliquée à la caractérisation des protéines thérapeutiques _____	63
I. Les sources d'ionisation _____	63
i. L'ionisation par électronébulisation _____	63
ii. La désorption/ionisation laser assistée par matrice _____	66
II. Les analyseurs _____	68
i. Les analyseurs quadripolaires _____	69
ii. Les analyseurs à temps de vol _____	71
iii. Les analyseurs à trappes ionique et orbitale _____	73
III. La spectrométrie de masse en tandem _____	75
i. La fragmentation des ions _____	77
ii. Les méthodes de dissociation _____	80
3. Les stratégies d'analyse de protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse _____	81
I. Caractérisation de la structure primaire et des modifications post-traductionnelles des protéines _____	81
i. L'analyse de protéines entières _____	82
ii. L'analyse de sous-unités protéiques _____	84
iii. L'analyse de peptides _____	86

II.	L'analyse conformationnelle des protéines par spectrométrie de masse _____	89
i.	La spectrométrie de masse native _____	90
ii.	Les méthodes d'analyses complémentaires _____	95
a.	La mobilité ionique _____	95
b.	Les échanges Hydrogène/Deutérium _____	98
c.	Les stratégies de marquages chimiques ciblés _____	100
III.	L'utilisation de dégradations forcées pour la caractérisation de protéines thérapeutiques _____	102
i.	Les stress chimiques _____	103
ii.	Les stress physiques _____	105
iii.	Les dégradations enzymatiques _____	106
Partie II : Résultats _____		107
Chapitre III : Caractérisation d'anticorps par chromatographie en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse _____		107
1.	Introduction _____	107
2.	Caractérisation de formes oxydées d'anticorps polyclonaux en condition de stress forcé _____	108
I.	Résumé de l'article _____	108
II.	Publication _____	111
3.	Etude de l'effet d'excipients saccharidiques sur la glycation d'IgG polyclonales et de leur stabilité _____	116
I.	Résumé de l'article _____	116
II.	Publication _____	118
4.	Investigation du niveau de réduction des ponts disulfures d'anticorps monoclonaux par protéolyses enzymatiques _____	125
I.	Résumé de l'article _____	125
II.	Publication _____	127
5.	Conclusion _____	134
Chapitre IV : Caractérisation de protéines thérapeutiques par spectrométrie masse native : Couplage IEX-MS _____		136
1.	Introduction _____	136

2. Caractérisation des isoformes d'un anticorps monoclonal par couplage de la chromatographie d'échange d'ions à la spectrométrie de masse native	137
I. Résumé de l'article	137
II. Publication	141
3. Optimisation d'une méthode de chromatographie d'échange d'ions couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse d'anticorps monoclonaux	152
I. Résumé de l'article	152
II. Publication	156
4. Caractérisation de l'albumine par chromatographie d'échange d'ions couplée à la spectrométrie de masse	168
I. Résumé de l'article	168
II. Publication	172
5. Conclusion	180
<i>Chapitre V : Etude de la relation Structure / Fonction de protéines thérapeutiques</i>	182
1. Introduction	182
2. Investigation de l'impact des modifications post-traductionnelles de l'albumine sur son interaction avec le récepteur néonatal Fc	183
I. Résumé de l'article	183
II. Publication	187
3. Etude de l'impact du clivage des lysines en position C-terminale d'un anticorps monoclonal sur son interaction aux récepteurs FcγRIII et FcRn	199
I. Résumé de l'article	199
II. Publication	203
4. Conclusion	214
<i>Discussion et perspectives</i>	215
<i>Conclusion générale</i>	225
<i>Références</i>	229

Introduction générale et présentation de la thèse

Les protéines sont utilisées depuis plusieurs décennies pour le traitement de pathologies telles que les déficits immunitaires, l'hémophilie, l'anémie ou le cancer, et sont aujourd'hui considérées comme une classe de médicaments à part entière. Ces médicaments biopharmaceutiques peuvent être produits à partir de sources naturelles (plasma, placenta, organes...) ou, depuis les années 1980, grâce aux technologies de l'ADN recombinant dans des systèmes de production cellulaires ou animaux. Comme tout produit pharmaceutique, les protéines thérapeutiques sont soumises à des exigences réglementaires strictes pour s'assurer de leur efficacité et de leur innocuité. Cela nécessite une caractérisation approfondie de leur structure malgré la complexité et la taille de ce type de biomolécules. Il est notamment important d'identifier les modifications post-traductionnelles pouvant affecter les propriétés biologiques des protéines. Pour cela, il est indispensable de développer des outils analytiques performants tels que la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse permettant leur caractérisation.

La société LFB est un acteur européen majeur en biopharmacie qui commercialise des protéines thérapeutiques d'origine plasmatique ou recombinante pour le traitement de maladies graves, et souvent rares, dans les domaines de l'immunologie, de l'héméostasie et des soins intensifs. J'occupe depuis 2010 un poste d'ingénieur d'études au sein du département analytique de cette société, avec pour principale mission la caractérisation structurale de protéines thérapeutiques par le développement de techniques de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse. La rédaction de cette thèse s'inscrit dans une démarche de validation des acquis de l'expérience pour l'obtention d'un doctorat, et rassemble les travaux de recherche que j'ai eu l'opportunité de publier entre 2014 et 2019.

La première partie de cette thèse est constituée d'une revue bibliographique détaillant les modes de production et les indications thérapeutiques des principales classes de protéines thérapeutiques d'origine plasmatique et recombinante. Nous abordons également l'importance de l'étude de la structure des protéines pour leur utilisation comme produits pharmaceutiques et pour la compréhension de leurs fonctions biologiques. Enfin, nous dressons un état de l'art des différentes techniques de chromatographie liquide et de

spectrométrie de masse pour la caractérisation des protéines, ainsi que des différentes stratégies analytiques permettant l'élucidation de leur structure.

La seconde partie regroupe huit articles publiés dans des journaux internationaux à comité de lecture et traitant de la caractérisation structurale de protéines par chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse, ainsi que de l'impact biologique de modifications affectant des protéines. Ces résultats sont répartis en trois thématiques correspondant chacune à un chapitre :

- La caractérisation d'anticorps par chromatographie de phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (RP-LC/MS). Le développement d'une méthode RP-LC/MS associée à une approche *middle-up* a rendu possible la caractérisation des modifications post-traductionnelles d'IgG polyclonales et a permis d'évaluer l'intégrité des ponts disulfures d'anticorps monoclonaux.
- Le couplage de la chromatographie d'échange d'ions avec la spectrométrie de masse native (IEX-MS). L'utilisation de sels volatils dans les phases mobiles de la chromatographie d'échange d'ions a permis pour la première fois un couplage direct avec la spectrométrie de masse native pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux et de l'albumine.
- L'étude de la relation structure/fonction de protéines thérapeutiques. L'association de méthodes d'analyses structurales (LC-MS) et de test d'activité *in vitro* (chromatographie d'affinité et résonance plasmonique de surface) a permis de déterminer l'impact de modifications chimiques affectant l'albumine et un anticorps monoclonal sur leurs fonctions biologiques.

Partie I : Introduction

bibliographique

Chapitre I : Les protéines thérapeutiques

1. Les protéines thérapeutiques plasmatiques

Il existe plus d'une vingtaine de protéines thérapeutiques, dérivées du plasma, utilisées dans des traitements médicaux critiques en immunologie, hépatologie, neurologie, chirurgie, hématologie et de nombreuses autres spécialités cliniques. C'est la raison pour laquelle ces protéines sont inscrites sur la liste des médicaments essentiels de l'organisation mondiale de la santé [1].

I. La production de médicaments à partir de plasma humain

i. Le plasma sanguin

Le plasma correspond à la partie liquide du sang, constituant 55% du volume sanguin. Il sert au transport des cellules sanguines, des hormones et de nombreuses protéines essentielles à la régulation des processus physiologiques de l'organisme (croissance, inflammation, coagulation...). L'albumine (≈ 40 g/l) et les immunoglobulines (≈ 10 g/l) sont les protéines plasmatiques les plus abondantes représentant environ 80% des protéines totales du plasma. Les autres protéines sont présentes en plus faibles quantités dans le plasma telles que l' α -1-antitrypsine (≈ 1 g/l) et l'antithrombine (< 1 mg/l) qui sont des inhibiteurs de protéases ou les facteurs de la coagulation comme le facteur VIII (quelques ng/l) [2].

Le plasma constitue donc la matière première pour la fabrication de nombreuses protéines thérapeutiques utilisées dans le traitement de pathologies graves telles que les troubles de la coagulation, les déficits immunitaires, les maladies auto-immunes ou pour la prise en charge de patient en situation critique (hypovolémie, hémorragie sévère, thrombose...).

Cette matière première biologique est collectée auprès de donneurs, et récupérée soit par centrifugation de sang total (on parle de plasma récupéré) soit par aphérese (ou

plasmaphérèse). Le plasma fractionné pour la production de protéines thérapeutiques est principalement obtenu par plasmaphérèse. Cette technique consiste à séparer les différents composés du sang par centrifugation pour isoler le plasma. Une fois le plasma collecté, les cellules sanguines sont réinjectées au donneur. Ce mode de collecte présente l'avantage de recueillir deux à quatre fois plus de plasma que lors d'un don du sang classique. Par ailleurs, cette technique permet la congélation du plasma seulement quelques minutes après sa collecte limitant les risques d'activation de la coagulation, du complément ou des systèmes fibrinolytiques. Le plasma récupéré à partir de sang total présente des délais avant congélation plus longs, nécessitant d'ajouter une quantité plus importante d'anticoagulant et un niveau plus important de contamination cellulaire pouvant conduire à la libération de protéases affectant la stabilité des facteurs de la coagulation [3].

Au regard des risques de contamination virales, plusieurs mesures de précaution sont nécessaires pour s'assurer de la qualité du plasma collecté. Ainsi, les donneurs sont sélectionnés selon des critères d'exclusion stricts et actualisés, des études épidémiologiques des populations de donneurs sont effectuées, et une mise en quarantaine du plasma est réalisée avant approbation de son utilisation. Des tests de marqueurs viraux sont également effectués sur les lots de plasma pour s'assurer de l'absence de virus (hépatites, VIH).

ii. Le fractionnement du plasma et la purification des protéines plasmatiques

Le fractionnement du plasma fut développé au cours de la seconde guerre mondiale par Edwin. J. Cohn pour la purification d'albumine utilisée pour maintenir le volume intravasculaire de soldats victimes de traumatismes ou de brûlures graves [4]. Le procédé de Cohn est basé sur la précipitation éthanolique séquentielle des protéines du plasma à basse température en combinant l'action de différents paramètres tels que le pH, la force ionique, la température et la concentration en solvant organique. Le schéma du procédé de fractionnement développé par Cohn, présenté Figure 1, décrit les différentes étapes et paramètres du procédé aboutissant à l'obtention de cinq fractions enrichies avec différentes protéines du plasma. La fraction V, obtenue en fin de procédé et enrichie en albumine, est alors la principale fraction valorisée pour le traitement de patients. Des sous-produits obtenus en cours de procédé sont également valorisés, comme les immunoglobulines présentes dans la

fraction II + III, produites à partir de plasma de convalescence issu de personnes immunisées et utilisées pour le traitement de maladie infectieuses comme la rougeole.

Au cours des décennies suivantes, le fractionnement du plasma fut régulièrement amélioré notamment par l'ajout d'une étape de cryoprécipitation précédant les précipitations éthanoliques [5,6]. Ainsi, une décongélation lente du plasma permet l'obtention d'un cryoprécipité enrichi en facteurs de la coagulation dont le facteur VIII et le facteur Von Willebrand. L'utilisation thérapeutique de ce cryoprécipité a constitué l'un des premiers traitements contre l'hémophilie A [6]. Des améliorations significatives furent apportées au procédé de Cohn par Kistler et Nitschmann permettant la réduction des coûts de fabrication et une augmentation du rendement et de la pureté de l'albumine et des immunoglobulines produites [7]. De même, des traitements chimiques ou enzymatiques furent développés pour l'élimination des agrégats d'IgG générés par les précipitations éthanoliques et à l'origine de chocs anaphylactiques chez les patients. Cela permis l'administration par voie intra-veineuse des immunoglobulines, plus confortable pour les patients et rendant possible l'injection de doses plus importantes et de manière plus efficace que par voie intra-musculaire qui était jusque-là le seul mode d'administration toléré [8,9].

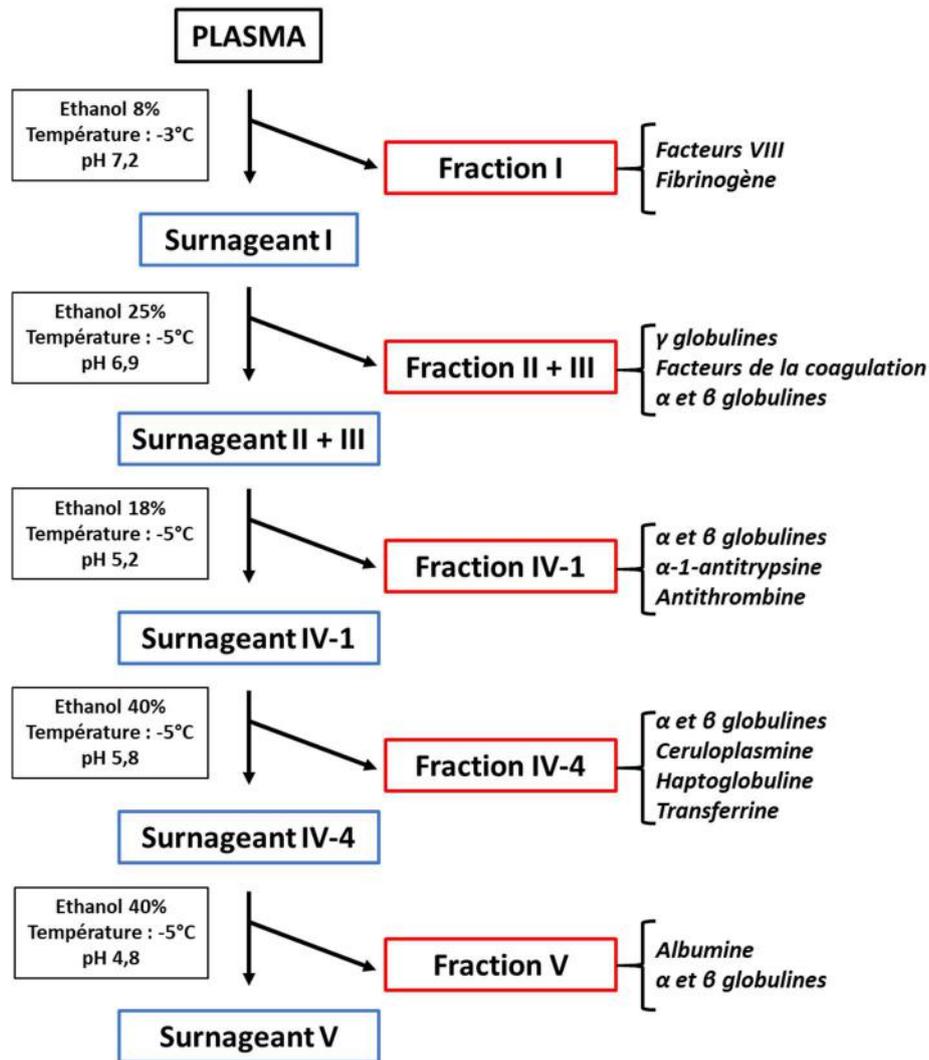


Figure 1 : Schéma du procédé de fractionnement du plasma développé par Cohn [4].

Le fractionnement éthanolique reste encore aujourd'hui le procédé de base de l'industrie moderne de fractionnement du plasma. Cependant, les améliorations de procédés de purification les plus récentes concernent l'ajout d'étapes de chromatographie permettant la production de nouvelles protéines à des niveaux de pureté élevés [10]. Les méthodes chromatographiques les plus utilisées sont les chromatographies d'échange d'ions, d'exclusion stérique et d'affinité (héparine ou anticorps monoclonaux) puisqu'elles peuvent être employées à pH physiologique et sans solvant organique pour maintenir l'intégrité fonctionnelle et structurale des protéines [11]. Ainsi, la chromatographie est le principal outil de purification des facteurs de la coagulation, des inhibiteurs de protéases et des anticoagulants [12]. Des étapes de chromatographie sont également intégrées dans le but de remplacer certaines étapes de fractionnement éthanolique et pour augmenter le degré de

pureté dans le cas par exemple de la production d'IgG à haute concentration pour une administration sous-cutanée. Enfin, la chromatographie est essentielle pour l'élimination d'agents toxiques ajoutés lors des étapes d'inactivation virale tels que les solvants-détergents. Les principales techniques chromatographiques utilisées pour la purification de produits plasmatiques sont présentées dans le Tableau 1.

Méthodes	Principes	Applications
Chromatographie d'échange d'ions	Séparation basée sur la charge des protéines Elution par palier de sels ou de pH	La majorité des facteurs de la coagulation, inhibiteurs de protéases et anticoagulants G (élimination des agrégats d'IgG)
Chromatographie d'exclusion stérique	Séparation basée sur le rayon hydrodynamique (la masse moléculaire) des protéines	α -1-antitrypsine, Facteur VIII
Chromatographie d'affinité	Utilisation de ligands ayant une affinité spécifique aux protéines (héparine) Elution par palier de sels	Antithrombine, Facteur Von Willebrand, Facteur IX
Immunoaffinité	Supports avec anticorps spécifiques d'une protéine cible Elution par palier de sels	Facteur VIII, Facteur IX, Protéine C

Tableau 1 : Principales techniques chromatographiques utilisées pour la purification des protéines plasmatiques [10,12].

Bien que la majorité des protéines thérapeutiques plasmatiques soient produites à partir de plasma, ces dernières peuvent également être produites par des technologies recombinantes dans des cellules de mammifères ou des animaux transgéniques [13]. Le facteur VIII, le facteur IX, le facteur VII activé ou l'antithrombine sont produits par ce type de technologies et commercialisées depuis les années 1990. L'intérêt de ce type de production réside dans l'absence de risque de contamination par des virus humains, des coûts de production pouvant être plus faibles et certaines difficultés à répondre à la demande en produit liées aux contraintes de matière première (approvisionnement en plasma ou faible concentration plasmatique de la protéine d'intérêt).

iii. La sécurisation biologique des produits dérivés du plasma

Malgré toutes les précautions prises lors de la collecte du plasma, le risque de contamination virale ne peut être complètement écarté du fait d'erreurs techniques ou

humaines, d'un don provenant de sujet récemment contaminé (« fenêtre silencieuse »), d'un don infectieux séronégatif chez un porteur asymptomatique ou plus rarement, d'un variant non reconnu par certains réactifs. C'est la raison pour laquelle des procédés d'inactivation/élimination virale ont été intégrés à la fabrication des produits plasmatiques, dont les principales spécificités sont présentées dans le Tableau 2.

Les étapes de congélation/décongélation, de précipitations éthanoliques et de filtrations stérilisantes des procédés de fabrication constituent une première étape d'élimination des pathogènes de grandes tailles tels que les bactéries, les parasites ou les cellules infectées. Seuls les virus présentent potentiellement une véritable menace de sécurité, et doivent être éliminés par plusieurs étapes orthogonales de réduction/inactivation virale. Ces étapes peuvent intervenir en cours de procédé, ou lors d'un traitement final du produit, par inactivation virale (destruction du virus) ou par élimination virale (séparation des virus des fractions protéiques).

Les étapes d'inactivation virale, thermiques ou chimiques, visent à détruire les virus les plus pathogènes comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et les virus des hépatites B et C (VHB et VHC) [10]. Les traitements thermiques d'inactivation virale telle que la pasteurisation ont démontré leur efficacité contre les virus enveloppés (VIH, VHB, VHC...) et non-enveloppés (hépatite A) [14]. Le procédé chimique d'inactivation virale le plus utilisé est le traitement solvant-détergents (S/D) combinant le tri *n*-butyl phosphate (TnBP) à un ou deux détergents. Ce procédé est particulièrement efficace pour l'inactivation des virus à enveloppe lipidique (VIH, VHB et VHC) et n'induit pas d'altération de la plupart des protéines, mais nécessite des étapes supplémentaires d'élimination des agents chimiques [15]. Ces traitements peuvent également être employés lors de l'étape finale de fabrication comme c'est le cas pour l'albumine qui subit une pasteurisation en fin de procédé ou pour certains facteurs de la coagulation qui subissent un chauffage à sec (chauffage du produit final lyophilisé).

Mécanismes d'élimination	Procédés	Principes	Virus ciblés	Caractéristiques
Inactivation thermique	Pasteurisation	Chauffage d'une solution pendant 10 h à 60°C en présence de stabilisants	Enveloppés Non-enveloppés	Résistance de certains virus non-enveloppés (parvovirus B19) Appliqué aux fractions coagulantes et aux immunoglobulines Appliqué en fin de procédé de purification de l'albumine
	Chauffage sec	Chauffage d'un produit lyophilisé à 80°C pendant 72 h ou 30 min à 100°C en présence de stabilisants	Enveloppés Certains virus non-enveloppés	Résistance de certains virus non-enveloppés (parvovirus B19) Appliqué aux facteurs de la coagulation en fin de procédé
Inactivation chimique	Solvant-détergent	Incubation de quelques heures en présence de TnBP et de détergents (Tween 80) à 20-37°C	Enveloppés	Inefficace contre les virus non-enveloppés Elimination nécessaires des agents S/D Applicable à la majorité des produits plasmatiques
	pH acide	Incubation à pH acide plusieurs heures à 25-37°C	Enveloppés Certains virus non-enveloppés	Réservé aux immunoglobulines
	Acide caprylique	Incubation à pH < 5,5 pendant 30 à 60 min à 20-22°C	Enveloppés	Réservé aux immunoglobulines
Elimination basée sur la taille	Nanofiltration	Filtration sur membranes multicouches (15 à 35 nm)	Enveloppés Non-enveloppés	Elimination par exclusion stérique Applicable à tous les produits plasmatiques

Tableau 2 : Spécificité des principaux procédés de réduction virale des produits plasmatiques [12].

Le principal traitement d'élimination virale spécifique reconnu pour sa robustesse est la nanofiltration sur des membranes de 15 à 35 nm permettant une rétention efficace des virus, notamment des virus non-enveloppés plus résistants aux traitements d'inactivation virale. Elle présente l'avantage de ne pas altérer les protéines et des rendements élevés.

Les étapes de sécurisation biologique doivent aussi permettre d'éliminer des agents pathogènes non-viraux tels que les prions. Le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jacob (vMCJ), transmis à l'homme via l'ingestion d'aliments contaminés par le prion responsable de

l'encéphalite spongiforme bovine, est transmissible par transfusion de concentrés de globules rouges (concentrés globulaires) [12]. Des études basées sur des épreuves de surcharge ont établi l'élimination de prions lors d'étapes de précipitation éthanolique, de filtrations en profondeur, de chromatographies et de nanofiltrations [16–18]. Cependant, ces démonstrations expérimentales doivent être appréhendées avec prudence du fait de la méconnaissance de cet agent infectieux et de la difficulté technique de pouvoir démontrer des capacités d'élimination élevées avec des modèles infectieux endogènes.

II. Les protéines plasmatiques et leurs indications thérapeutiques

i. Les facteurs de la coagulation

La coagulation sanguine est le processus biologique conduisant à la formation de caillots sanguins et constitue une partie essentielle de l'hémostase prévenant ou permettant l'arrêt de l'écoulement du sang. La cascade de coagulation, dont un schéma simplifié est présenté Figure 2, est classiquement divisée en trois voies : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque qui activent toutes les deux la voie commune finale menant à la formation d'un caillot de fibrine qui permet d'obstruer une brèche vasculaire. La voie intrinsèque comporte les facteurs présents dans la circulation et la voie extrinsèque, les facteurs tissulaires non présents normalement dans la circulation mais qui sont libérés lors d'une lésion vasculaire.

Ces trois voies sont des séries de réactions dans lesquelles un zymogène (producteur d'enzymes) appartenant à la famille des protéases à sérine et son cofacteur glycoprotéique sont activés pour ensuite catalyser la réaction suivante. Les facteurs de coagulation sont généralement des protéases à sérine, à l'exception par exemple des facteurs VIII et V qui sont des glycoprotéines, et du facteur XIII qui est une transglutaminase. Les facteurs de coagulation circulent sous formes de zymogènes inactifs dans le sang.

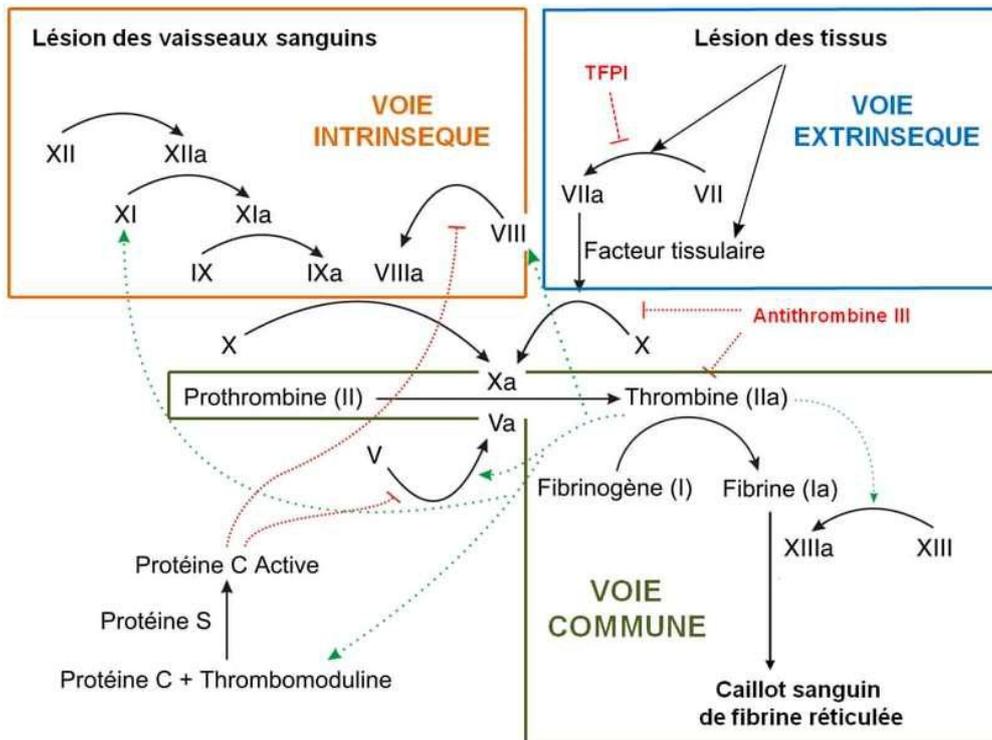


Figure 2 : Schéma simplifié de la cascade de la coagulation. Les facteurs de coagulation sont identifiés par des chiffres romains, avec un a minuscule pour distinguer la forme activée (TFPI : *Tissue Factor Pathway Inhibitor*).

Les troubles de la coagulation (hémophilie) sont dus à une déficience en facteurs de la coagulation et mènent à des risques importants de saignements. Les fractions coagulantes purifiées à partir du plasma sont utilisées en thérapeutique substitutive, pour la prévention ou le traitement des hémorragies associées à des déficits constitutionnels en facteur de la coagulation. Des concentrés de facteur VIII (hémophilie A), Facteur IX (hémophilie B) ou facteur VII sont utilisés dans le traitement et la prophylaxie des épisodes hémorragiques chez des patients souffrant d'un déficit d'un de ces facteurs de la coagulation. Le complexe prothrombique (ou PPSB : Prothrombine, Proconvertine, facteur Stuart, facteur antihémophilique B) qui renferme les facteurs II, VII, IX, et X est utilisé dans la prévention ou le traitement des accidents hémorragiques en cas de déficit en facteurs vitamino-K-dépendants. Le PPSB est également utilisé pour des patients souffrant d'un déficit constitutionnel en facteurs II et X, car ces concentrés spécifiques ne sont pas disponibles.

Les concentrés de fibrinogène sont prescrits dans certaines complications associées à l'afibrinogénémie constitutionnelle, des syndromes hémorragiques associés à une

hypofibrinogénémie profonde et dans le cadre de traitement de prophylaxie de risques hémorragiques. Des « colles » biologiques sont également produites à partir des fractions coagulantes du plasma et reproduisent la dernière phase de la coagulation par mélange de concentrés de fibrinogène et de thrombine. Ces « colles » sont utilisées en chirurgie pour favoriser l'hémostase locale lors d'interventions chirurgicales [19].

Une des principales complications liées à l'administration de facteurs de la coagulation est le développement d'anticorps inhibiteurs chez les patients traités. Ce risque est particulièrement élevé dans le cas de l'hémophilie A sévère où jusqu'à 30% des patients traités avec du facteur VIII développent des anticorps anti-facteur VIII qui vont inactiver la protéine rendant le traitement inefficace. Ce type de complication peut être résolu par l'administration de doses plus importantes de facteur VIII si le taux d'anticorps inhibiteurs est faible. Cette complication peut être aussi évitée par l'utilisation du complexe prothrombique activé et du facteur VIIa pour stimuler la coagulation en « contournant » le facteur VIII ou par l'utilisation de facteurs VIII recombinants. Ces deux alternatives se sont montrées efficaces dans le traitement d'hémophiles avec de forts taux d'anticorps inhibiteurs [20].

ii. Les inhibiteurs de protéases et anticoagulants

Les protéines anticoagulantes telles que l'antithrombine et la protéine C sont prescrites dans des cas de déficit constitutionnels. L'utilisation d'antithrombine est indiquée pour le traitement d'accidents thrombo-emboliques ou en prévention des thromboses veineuses en cas de situation à risque (chirurgie ou grossesse). L'antithrombine agit principalement sur la thrombine et le facteur Xa. La protéine C est indiquée dans les déficits constitutionnels sévères du nouveau-né responsable d'une thrombose veineuse sévère et massive et de l'adulte lors du relais héparine/antivitamines K pour éviter la nécrose cutanée. La protéine C peut aussi être prescrite dans la prévention de la thrombose lors d'interventions chirurgicales et de césariennes, en cas d'inefficacité ou de contre-indication du traitement héparine/antivitamines K [19]. Les facteurs de la coagulation inactivés par la protéine C sont les facteurs Va et VIIIa.

L'alpha-1-antitrypsine est un inhibiteur de protéase à sérine, appartenant à la famille des serpins. Sa supplémentation est indiquée dans le traitement substitutif des formes graves de déficit primitif en alpha-1 antitrypsine chez les sujets avec emphysème pulmonaire. L'alpha-1-

antitrypsine permet aussi d'inhiber l'action de l'élastase libérée par les leucocytes en cas d'infection et donc delimitier la destruction des tissus pulmonaires par cette dernière [21].

iii. Les immunoglobulines G

Emil von Behring, premier prix Nobel de médecine, utilisa pour la première fois du sérum immun pour le traitement de la diphtérie il y a plus d'un siècle [22]. Les immunoglobulines furent donc d'abord utilisées pour la prophylaxie et le traitement de maladies infectieuses, avant que Bruton ne démontre en 1952 leur efficacité dans le traitement des déficits immunitaires primitifs chez des patients souffrant d'agammaglobulinémie congénitale [23]. Au début des années 1980, les propriétés immunomodulatrices des immunoglobulines furent observées lors du traitement de Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT) chez des enfants souffrant d'hypogammaglobulinémie [24]. Des études complémentaires confirmèrent les effets immunomodulateurs des immunoglobulines pour le traitement d'une large gamme de maladies auto-immunes. Le mode d'action des immunoglobulines dans le cadre de traitements immunomodulateurs et anti-inflammatoires sont encore partiellement inconnus mais plusieurs mécanismes sont proposés dont l'interaction des fragments Fc avec des récepteurs spécifiques (inhibition des récepteurs Fc), le contrôle de la voie du complément, la modulation de la production de cytokines ou le catabolisme des IgG [25].

Aujourd'hui, les autorisations de mise sur le marché des immunoglobulines intra-veineuses (IGIV) ne s'appliquent qu'à un nombre restreint d'indications comme les thérapies substitutives chez des patients souffrant d'immunodéficience primaire et secondaire ou pour des traitements d'immunomodulation dans le cas de maladies auto-immunes ou de syndromes inflammatoires systémiques (Tableau 3). Cependant, la pratique médicale a élargi progressivement leur application à de nombreuses indications qui disposent de recommandation de bon usage, notamment en neurologie, en hématologie, en immunologie, en dermatologie et en rhumatologie.

Mode d'action	Indication thérapeutique	Spécialité clinique
Thérapie substitutive	Déficits immunitaires primitifs (DIP) avec défaut de production d'anticorps	Immunologie
	Déficits immunitaires secondaires (DIS) chez des patients souffrant d'infections sévères ou récurrentes	Immunologie
	Défaut de production d'anticorps spécifiques (DPAS)	Immunologie
Immunomodulation	Thrombocytopénie immune primaire (TIP)	Hématologie
	Syndrome de Guillain Barré	Neurologie
	Maladie de Kawasaki	Pédiatrie/ Immunologie
	Polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC)	Neurologie
	Neuropathie motrice multifocale (NMM)	Neurologie
	Poussées myasthéniques aiguës sévères (Adultes uniquement)	Neurologie

Tableau 3 : Indications thérapeutiques des immunoglobulines intra-veineuses recommandées par l'agence nationale de sécurité du médicament (février 2020).

iv. L'albumine

L'albumine est impliquée dans le transport de nombreux composés endogènes et exogènes tels que des hormones, des lipides ou des médicaments et constitue le principal capteur de radicaux libres dans le plasma, mais sa principale fonction physiologique est de maintenir et réguler la pression oncotique dans le sang.

L'une des principales indications thérapeutiques de l'albumine est le remplissage du volume intravasculaire en cas de choc hémorragique lorsque les cristalloïdes et colloïdes non-protéiques sont inefficaces ou contre-indiqués [25].

L'albumine étant synthétisée uniquement dans le foie, son utilisation en hépatologie clinique est essentielle et a démontré son efficacité pour traiter et prévenir les dysfonctionnements circulatoires post-paracentèse, les péritonites bactériennes spontanées avec insuffisance rénale et le syndrome hépatorénal entraînant des hypovolémies sévères chez des patients souffrant de cirrhose [26].

Bien que l'utilisation thérapeutique de l'albumine soit amenée à s'élargir, comme pour l'hémodialyse de patients souffrant de défaillance hépatique [27] ou l'exploitation de ses propriétés antioxydantes, certaines prescriptions de l'albumine s'appuyant sur peu d'études cliniques ou scientifiques restent controversées comme le traitement des ascites, du syndrome néphrotique, des pancréatites, du syndrome de détresse respiratoire aiguë ou en chirurgie abdominale [28].

2. Les protéines thérapeutiques recombinantes

A l'origine, les premières protéines d'intérêt thérapeutique étaient produites à partir de sources naturelles telles que le plasma pour l'albumine, du placenta pour la production de glucocérébroside ou des extraits de pancréas pour l'insuline. Cependant, l'obtention de protéines à partir d'une matière première biologique présente des inconvénients comme des quantités limitées de production et des risques d'allergies ou de contamination par des pathogènes (virus, prions...), rendant nécessaire le développement de procédés alternatifs pour la production de protéines thérapeutiques.

En 1972, Paul Berg obtint le premier ADN recombinant [29] grâce aux enzymes de restriction puis, un peu plus tard, Stanley Cohen et Herbert Boyer parvinrent à introduire des gènes d'amphibien dans la bactérie *Escherichia coli* [30]. Le premier organisme transgénique était né. Ainsi, l'essor du génie génétique débuté dans les années 1970 permit le développement de nouveaux procédés de production de protéines thérapeutiques en utilisant différents systèmes d'expressions. L'identification et le clonage des gènes codant pour la synthèse de protéines humaines d'intérêt thérapeutique permirent la production par des organismes hétérologues de protéines dites recombinantes, constituant une alternative aux protéines d'extraction. Aujourd'hui, une large majorité des protéines thérapeutiques commercialisées dans le monde sont recombinantes [31].

I. Les systèmes d'expression et de production

i. Les procaryotes et eucaryotes inférieurs

Les systèmes d'expression bactériens comme *Escherichia coli* furent les premiers à être utilisés pour la production de protéines comme l'insuline (première protéine recombinante humaine) ou les hormones de croissance, et de nombreux produits biopharmaceutiques sont

encore aujourd'hui produits dans des bactéries. Ces systèmes d'expression présentent l'avantage de permettre une production rapide et peu coûteuse de protéines avec de très bons rendements. Cependant, le principal obstacle à la production de protéines avec des systèmes procaryotiques est l'absence d'une machinerie enzymatique permettant l'expression de modifications post-traductionnelles (MPTs) humaines telles que la glycosylation, la phosphorylation, les clivages protéolytiques ou la formation de ponts disulfures, indispensables à la stabilité structurale et à la fonction biologique des protéines. C'est la raison pour laquelle seule de petites protéines sans modifications post-traductionnelles (type polypeptides) comme des asparaginases ou collagénases sont produites dans ce type de cellules. Par ailleurs, les protéines produites dans des bactéries sont rarement sécrétées, nécessitant une lyse cellulaire pour extraire la protéine d'intérêt. La production de protéines en grande quantité avec un repliement partiel peut conduire à la formation de corps d'inclusions par des phénomènes d'agrégation qui peuvent réduire les rendements et complexifier les procédés de production pour obtenir des protéines avec la bonne conformation [32].

Des micro-organismes unicellulaires eucaryotes comme les levures sont également des systèmes d'expression très utilisés pour la production de protéines. Comme pour les bactéries, les levures permettent une production rapide et peu coûteuse de protéines, mais se différencient par leur capacité à intégrer des modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations ou des ponts disulfures. Cependant, les profils de N/O-glycosylation produits par les levures sont caractérisés par une haute teneur en mannose (nombre d'unités mannosidiques supérieur à neuf) pouvant être immunogène chez les humains et conduisant à une baisse d'efficacité et de demi-vie des protéines produites. Pour contrecarrer les limitations dues à la glycosylation, des levures génétiquement modifiées ont été développées pour exprimer des gènes codant pour la synthèse d'enzymes de la voie de la glycosylation humaine, permettant d'obtenir des protéines avec des structures glycaniques hybrides plus proches de leurs homologues humains [33,34].

ii. Les cellules de mammifères

Les cellules de mammifères sont les lignées cellulaires de choix pour les plateformes de productions de produits biopharmaceutiques puisqu'elles permettent d'obtenir des protéines complexes de grandes tailles avec des MPTs similaires à celles produites chez l'humain. Ces

cellules ont également la capacité de sécréter les protéines d'intérêt, évitant l'étape de lyse cellulaire. Ainsi, malgré des coûts de fabrication élevés, environ 70% des protéines recombinantes sont produites dans ce type de cellules [35].

Parmi les cellules de mammifères non-humaines les plus utilisées pour produire des protéines, on retrouve les cellules de hamster (CHO : *Chinese Hamster Ovary* et BHK : *Baby Hamster Kidney*) et, dans une moindre mesure, les cellules de souris (NS0 et Sp2/0).

Les cellules CHO sont de loin les plus utilisées puisqu'environ $\approx 60\%$ des protéines recombinantes approuvées et mises sur le marché depuis 2010 sont produites dans ce type de lignée cellulaire [36]. Cela s'explique par les nombreux avantages de ces cellules, comme une culture en suspension dans des milieux sans sérum animal (conditions de culture plus reproductibles et plus sûres), ou une tolérance élevée aux variations de pH, de niveaux d'oxygène, de pression et de température lors de la culture cellulaire. Ces cellules sont également peu sensibles aux virus humains, réduisant les risques biologiques. Mais leur principal intérêt réside dans leur capacité à produire des protéines avec des modifications post-traductionnelles proches de celles observées pour les protéines humaines, notamment des profils de glycosylation complexes. Malgré tout, la lignée CHO reste incapable de produire certains types de glycosylations humaines puisque qu'elle ne dispose pas d'enzymes telle que l' $\alpha[2-6]$ sialyltransferase, alors qu'elle peut produire des sucres comme l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) et le galactose- α -1,3-galactose (α -gal) qui sont immunogènes et peuvent réduire les propriétés pharmacologiques des protéines d'intérêt chez l'homme. La sélection des clones est donc primordiale lors de la culture cellulaire pour choisir ceux ayant les meilleurs rendements mais aussi les profils de glycosylation les plus adaptés [37].

Les cellules CHO ayant une capacité limitée de γ -carboxylation des protéines en raison d'une faible expression de la γ -glutamyl carboxylase, les cellules BHK sont privilégiées pour la production de facteurs de la coagulation dont la γ -carboxylation est essentielle pour leur activité biologique. Ainsi, les deux seules glycoprotéines commercialisées produites dans ce type de cellules sont du Facteur VIIa et du Facteur VIII [32].

Historiquement, les cellules murines sont utilisées pour la production d'anticorps monoclonaux et sont obtenues grâce à la technique des hybridomes par fusion de cellules tumorales avec

des lymphocytes B provenant d'une souris immunisée produisant un anticorps contre un antigène donné. Plusieurs anticorps monoclonaux commerciaux sont produits par ce type de cellules (Sp2/0 et NS0), mais les systèmes d'expression murins présentent l'inconvénient de produire des glycanes immunogènes de type α -gal et Neu5Gc à des niveaux considérablement plus élevés que les cellules de hamster [32].

Le développement de la glyco-ingénierie permet d'optimiser l'expression des modifications post-traductionnelles des lignées cellulaires pour pallier l'absence de celles qui présentent un intérêt ou éliminer celles qui sont indésirables. En modifiant la composition des milieux de cultures ou en intégrant des gènes codant pour certaines enzymes, les lignées modifiées sont capables de produire des protéines avec des MPTs d'intérêt comme des taux de sialylation élevés (demi-vie prolongée) ou inhiber certaines enzymes pour obtenir des anticorps à faible taux de fucose (activité cytotoxique à médiation cellulaire augmentée) [32,34].

Pour s'affranchir des contraintes liées à la présence de modifications post-traductionnelles immunogènes (glycosylation) ou à l'absence de certaines modifications indispensables à la fonction biologique des protéines (γ -carboxylation), des systèmes d'expression dérivés de cellules humaines ont été développés. Les cellules humaines, même si elles ne permettent pas toujours d'avoir des profils de glycosylation parfait, permettent a minima d'éviter les risques d'immunogénicité. Les principales lignées cellulaires humaines utilisées pour la production de protéines sont HEK293 et HT-1080 provenant respectivement de cellules rénales embryonnaires humaines et de fibrosarcomes. La première glycoprotéine thérapeutique produite par des cellules humaines (HEK293) mise sur le marché en Europe et aux Etats-Unis était une protéine C activée recombinante utilisée pour le traitement des septicémies graves. Ces dernières années, plusieurs protéines produites en HEK293 et HT-1080 ont été approuvées par les agences réglementaires américaines et européennes, dont des protéines de fusion ayant un fragment Fc lié à un facteur de la coagulation (HEK293) ou de l'époétine delta (érythropoïétine) recombinante pour le traitement d'anémies symptomatiques associées à l'insuffisance rénale chronique. Les avantages de l'utilisation des cellules humaines ont été démontrés par la production de Facteur IX recombinant avec un meilleur taux de γ -carboxylation du domaine Gla (facilitant sa fixation aux phospholipides membranaires) en HEK293 par rapport aux cellules CHO [38]. De même, des taux plus faibles d'Ig(A), IgM et IgG

anti-Neu5Gc ont été observés chez des patients traités avec de l'époétine delta produite en HT-1080 par rapport à ceux traités avec son homologue produite en CHO [33].

Il existe également plusieurs autres lignées cellulaires humaines utilisées dans le cadre de développements cliniques ou précliniques comme PER.C6 créée à partir de cellules rétiniennes embryonnaires humaines ayant la capacité de produire des taux élevés d'IgG ou HKB-11 dérivée de HEK293 et ayant la capacité de produire de plus importante quantité de protéines sans agrégats [32].

Systèmes d'expression	Avantages	Inconvénients	Protéines produites
Bactéries	Faibles coûts de production Très bons rendements Absence de risques biologiques Croissance rapide	Pas de sécrétion des protéines Pas de MPTs	Cytokines Enzymes Peptides
Levures	Faibles coûts de production Très bons rendements MTP possibles Protéines sécrétées Absence de risques biologiques Croissance rapide	Glycanes avec haute teneur en mannose Ne produit pas toutes les MPTs humaines	Cytokines Enzymes Peptides Facteurs de la coagulation
Cellules de mammifères non-humaines	Milieu de culture sans sérum MPTs complexes Risque biologique faible Protéines sécrétées Bonne caractérisation (avantage réglementaire)	Coûts de production élevés Présence possible de glycanes immunogènes Absence de certaines glycosidases et glycosyltransférases humaines Difficultés à produire certaines MPTs humaines	Anticorps monoclonaux Cytokines Enzymes Facteurs de la coagulation Hormones
Cellules Humaines	Milieu de culture sans sérum MPTs Humaines Protéines sécrétées	Coûts de production élevés Risque biologique Rendements faibles	Anticorps monoclonaux Cytokines Enzymes Facteurs de la coagulation Hormones
Animaux transgéniques	Coûts de production réduits Bons rendements MPTs complexes	Transgénèse Présence possible de glycanes immunogènes Risques biologiques Cycles de reproduction longs	Anticorps monoclonaux Facteurs de la coagulation Enzymes
Plantes transgéniques	Coûts de production réduits Flexibilité de production Bons rendements MPTs complexes Croissance rapide Absence de risques biologiques	Extraction des protéines Problèmes environnementaux Obstacles réglementaires Problèmes de tolérance Glycanes immunogènes	Taliglucerase alfa

Tableau 4 : Spécificités des différents systèmes d'expression de protéines recombinantes.

Toutefois, l'utilisation de cellules humaines présente des risques d'infection par des virus humain potentiellement transmissibles aux patients. Des étapes de sécurisation virale sont donc requises lors de la fabrication de produits bio-thérapeutiques dans ce type de cellules.

iii. Les animaux et plantes transgéniques

Les animaux transgéniques présentent l'avantage de fournir des protéines de qualité en grande quantité et avec des modifications post-traductionnelles proches des protéines humaines. Les coûts de production de grandes quantités de protéines sont plus faibles qu'en culture cellulaire, bien que l'utilisation d'animaux transgéniques présente un certain nombre de difficultés comme des procédés de purification plus complexes, la transmission possible d'agents pathogènes, des cycles de reproduction longs et des difficultés liées à la transgénèse pour les animaux de grande taille. Le choix de l'espèce et le lieu de sécrétion de la protéine sont donc primordiaux. Si les animaux transgéniques peuvent produire des protéines recombinantes dans le sang ou l'urine, ce sont les glandes mammaires qui semblent le système d'expression le plus performant et reste le seul autorisé pour la production de produit thérapeutiques humains. En effet, de grandes quantités de protéines sont produites dans le lait qui peut être collecté facilement et de manière répétée. Enfin, les effets potentiellement délétères de la protéine recombinante pour l'animal auront moins d'impact dans le lait plutôt que dans le sang [39].

La chèvre est le modèle traditionnellement le plus utilisé pour l'expression de protéines dans le lait, mais le lapin est de plus en plus apprécié car la transgénèse par micro-injection est aisée et seulement 7 mois sépare la transgénèse des premières collectes de laits contenant la protéine recombinante. Le lapin présente également l'avantage de produire de faible quantité de Neu5Gc immunogène contrairement à la chèvre (faible expression de la CMP-NeuAc hydroxylase dans les glandes mammaires de lapin) [40].

Le premier produit biopharmaceutique produit dans un animal transgénique (la chèvre) est une antithrombine humaine mise sur le marché européen en 2006 [41]. Depuis, d'autres protéines recombinantes produites dans des animaux transgéniques ont été commercialisées dont un Facteur VIIa (dans le lapin) ou un inhibiteur de la C1 estérase, ces produits étant tous sécrétés dans le lait des animaux. Les animaux transgéniques constituent donc une alternative crédible pour la production de protéines difficiles à exprimer en cellule, ou pour la fabrication à moindre frais des biosimilaires [39].

Les plantes constituent également des bioréacteurs performants pour la production de grandes quantités de protéines recombinantes à moindre coût. La production de plantes

transgéniques implique de faibles coûts de revient, une grande flexibilité, peu d'investissement et une sécurité totale vis-à-vis du risque infectieux (virus, prion). De plus, la transgénèse des plantes est très facile. Cependant, les protéines stockées dans les graines et les feuilles peuvent être difficiles à extraire et à purifier, et les extraits peuvent contenir des substances toxiques pour l'homme. Si les plantes disposent d'une machinerie cellulaire permettant l'expression de modifications post-traductionnelles complexes proches de celle des mammifères, elles produisent des profils de glycosylation incomplets (sans acide sialique) voir immunogènes (α -1,3-fucose ou α -1,2-xylose). Le développement de la glyco-ingénierie permettrait de palier aux manques d'enzymes de glycosylation humaines des plantes et d'éliminer les enzymes responsables de la production de sucres immunogènes [34].

Une taliglucerase alfa utilisée pour le traitement de la maladie de Gaucher et produite dans des cellules de racine de carotte fut la première protéine produite dans des cellules végétales et approuvée par l'agence américaine du médicament (FDA) en 2012 [38]. Malgré le fort potentiel des plantes transgéniques pour la production de protéines thérapeutiques, cela reste le seul produit bio-thérapeutique dérivé des plantes sur le marché [42].

II. Les protéines recombinantes et leurs indications thérapeutiques

i. Les anticorps et protéines thérapeutiques dérivées

Les anticorps monoclonaux représentent environ 20% du marché global de l'industrie pharmaceutique et leur part de marché est en croissance constante depuis plus de deux décennies [43]. Ces produits biopharmaceutiques couvrent une large gamme d'indications thérapeutiques (oncologie, inflammation et auto-immunité, transplantation, hématologie, infectiologie...) et près d'une centaine d'entre eux ont été approuvés par les agences réglementaires américaines et européennes [44]. A l'heure actuelle les seuls anticorps ayant reçus une autorisation de mise sur le marché appartiennent à la classe des immunoglobulines G (IgG), elle-même divisée en quatre sous-classes. Les IgG sont des glycoprotéines tétramériques composées de deux Fab (*Fragment, antigen-binding*) liant l'antigène et d'une partie de deux chaînes lourdes composant le Fc (*Fragment cristallisable*) se liant aux récepteurs Fc γ R à la surface des cellules immunitaires. Les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Les chaînes lourdes sont composées de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3) et d'un domaine variable (VH) alors que les chaînes

légères sont constituées d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL). Les chaînes lourdes possèdent un site de N-glycosylation et sont reliées entre elles par des ponts disulfures au niveau de la région charnière située entre les domaines CH1 et CH2. Les domaines variables des chaînes lourdes et légères sont constitués de trois régions hypervariables (CDR : *Complementary determining regions*) impliquées dans la spécificité de reconnaissance à l'antigène. La région Fc est impliquée dans les fonctions effectrices de l'anticorps en liant les récepteurs FcγR pour recruter les cellules immunocompétentes (ADCC : *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCP : *antibody-dependent cellular phagocytosis*) et en interagissant avec des protéines plasmatiques pour déclencher la cascade du complément (CDC : *Complement-dependent cytotoxicity*). Par ailleurs, l'interaction de la région Fc au récepteur Fc néonatal (FcRn) confère une demi-vie prolongée aux anticorps, de l'ordre d'une vingtaine de jours pour les IgG1, IgG2 et IgG4 [45].

En 1975, Georges Kohler et César Milstein publièrent la technique dite des hybridomes permettant de créer des anticorps monoclonaux de souris ciblant une très grande variété d'antigènes [46]. Cette technique révolutionnaire, qui leur permit d'obtenir le prix Nobel en 1984, consiste à fusionner des lymphocytes B de souris immunisée, produisant des anticorps contre un antigène spécifique, avec des cellules de myélome ayant la capacité de proliférer indéfiniment. Cette découverte aboutit à la commercialisation en 1986 du premier anticorps monoclonal murin (Muromonab, OKT3, anti-CD3) utilisé pour le traitement des épisodes de rejet aigu en transplantation d'organe. Néanmoins, les anticorps murins ont rapidement présenté un certain nombre de limites comme des fonctions effectrices limitées, une demi-vie très courte après injection ou la production d'anticorps anti-souris par les patients [47]. Cette xéno-immunisation diminue l'efficacité de l'anticorps et peut conduire à des réactions allergiques. Pour remédier aux problèmes liés aux anticorps murins, une seconde génération d'anticorps « chimériques » fut développée en substituant les domaines constants des anticorps murins par les domaines de leurs homologues humains. Ces anticorps présentent alors une meilleure affinité aux récepteurs FcγR, une demi-vie proche des IgG humaines et voient leur caractère immunogène diminué sans toutefois être éliminé. Au début des années 1990, une troisième génération d'anticorps dits « humanisés » fut développée, correspondant à des IgG humaines dont seules les parties hypervariables (CDR) sont d'origine murine.

Finalement, une dernière génération d'anticorps totalement humains fut développée à partir de la fin des années 1990. L'obtention d'hybridomes humains étant très délicate, d'autres méthodologies furent utilisées pour le développement des anticorps chimériques, humanisés et humains comme les technologies de l'ADN recombinant, des souris transgéniques humaines (les gènes d'anticorps humains sont substitués au matériel génétique immunitaire de la souris) ou les banques combinatoires d'anticorps exprimés à la surface de bactériophages (*phage display*) [47]. Actuellement, une large majorité des anticorps sur le marché et en développement sont des IgG humanisées ou humaines [43].

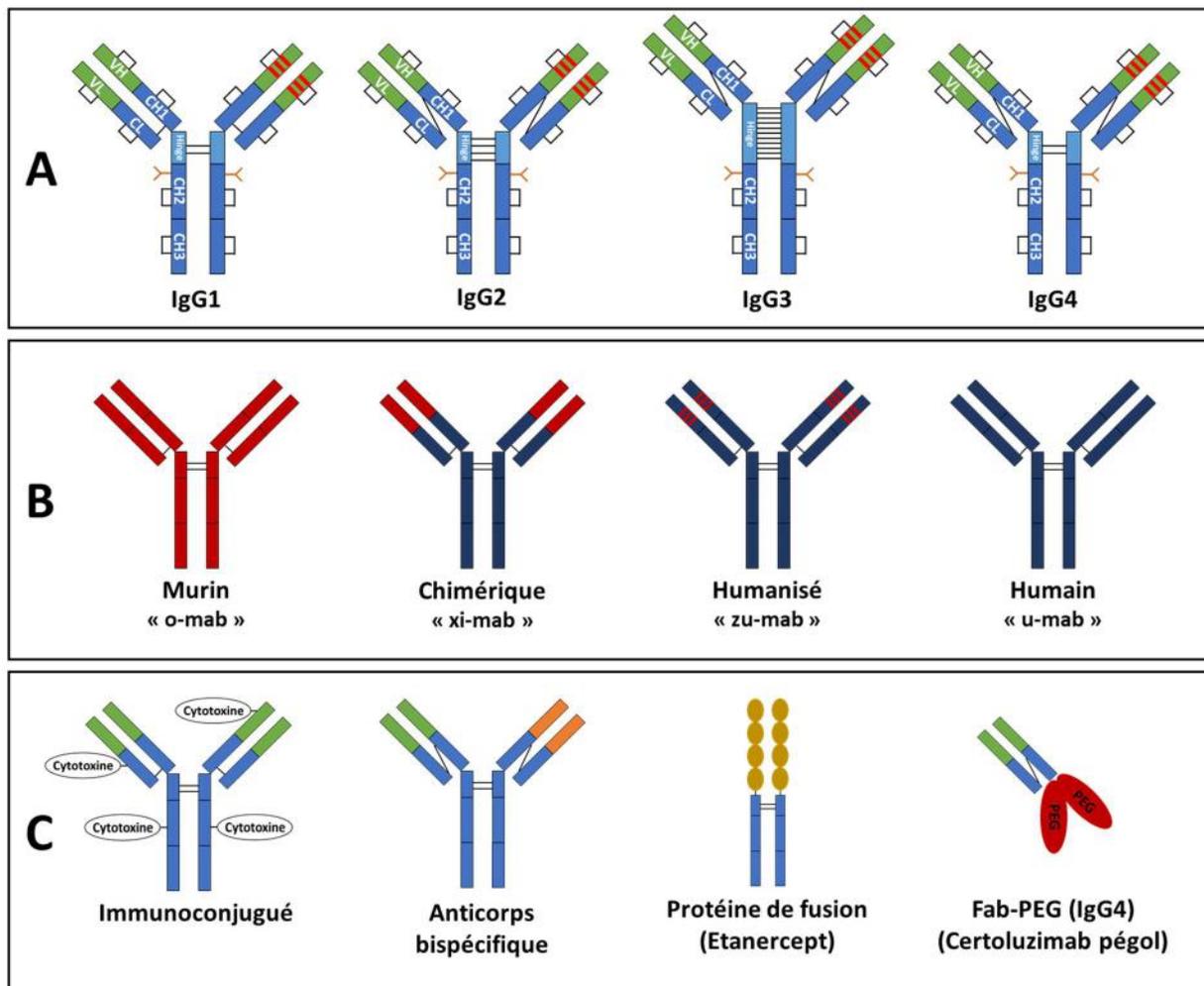


Figure 3 : Les structures des quatre sous-classes d'IgG sont présentées Panel A, les domaines constants sont représentés en bleu, les domaines variables en vert et les régions hypervariables (CDR) en rouge. Panel B sont présentés les différents types d'anticorps monoclonaux, les parties d'origine murine sont représentées en rouge et les parties humaines en bleu. Panel C sont présentés des exemples de produits biopharmaceutiques dérivés des anticorps.

La plupart des anticorps à visée thérapeutique sont des IgG1, qui possèdent de fortes fonctions effectrices de types ADCC, ADCP ou CDC, et ont la capacité de détruire les cellules possédant un antigène cible à la surface membranaire sur lequel ils se fixent pour induire la lyse cellulaire. Ce format d'anticorps est donc souvent utilisé en oncologie pour cibler et détruire les cellules tumorales. Les IgG2 et IgG4 présentent de plus faibles fonctions effectrices que les IgG1 et sont choisies lorsque, par exemple, l'inhibition d'un récepteur est recherchée sans que les fonctions effectrices ne soient souhaitées. En effet, Les fonctions effectrices des IgG, lorsqu'elles ne sont pas désirées, peuvent conduire à des réactions indésirables comme des syndromes grippaux sévères (observés avec Muromonab-CD3) [47]. Une fragilité au niveau de la région charnière des IgG4 peut conduire à d'importants taux de « demi-anticorps » les rendant inactifs si le mécanisme d'action nécessite une bivalence. Cette fragilité conduit également à des phénomènes de « *Fab arm exchange* » des IgG4, permettant de former des anticorps bispécifiques (ciblant deux antigènes différents) [48]. Les IgG3 ne sont pas développés à des fins thérapeutiques, essentiellement en raison de leur faible demi-vie (8 jours), malgré de fortes capacités de recrutement des effecteurs de l'immunité.

Les technologies actuelles permettant d'obtenir des anticorps humains, s'orientent plutôt vers l'ingénierie structurale pour optimiser leur mode d'action grâce à une connaissance fine des relations structure-fonction de ces derniers. Ainsi, des mutations sont effectuées pour accroître ou diminuer la fixation des anticorps aux récepteurs Fc (impact sur les fonctions effectrices et la demi-vie), augmenter l'affinité pour un antigène ou stabiliser leur structure (dans le cas des IgG4). La glycosylation ayant un fort impact sur la fixation de la région Fc aux récepteurs FcγR, l'optimisation des profils glycaniques est également très étudiée (Ex : Faible fucosylation). Pour augmenter la cytotoxicité des anticorps, des immunoconjugués (ADC : *Antibody Drug Conjugate*) et radio-immunoconjugués ont été développés, consistant à conjuguer à un anticorps des radioéléments ou des molécules cytotoxiques permettant de cibler des cellules tumorales. Dans le cas où la bivalence n'est pas requise et où une demi-vie prolongée sans fonction effectrice peut limiter la toxicité, le format Fab peut être retenu. C'est le cas d'Abciximab qui fut le premier Fab approuvé pour lutter contre la thrombose des prothèses lors d'interventions d'angioplastie [45]. Le fragment Fab peut également être conjugué à deux

macromolécules de polyéthylène glycol (PEG, 40 kDa) pour accroître significativement sa demi-vie plasmatique.

Enfin, un certain nombre de protéines de fusions ont été développées pour valoriser la partie Fc des IgG en la fusionnant génétiquement à des protéines ou peptides d'intérêt. L'objectif est de diminuer l'immunogénicité, d'augmenter la solubilité, et surtout d'améliorer la demi-vie de ces molécules (via la fixation au récepteur FcRn). Des enzymes, cytokines, peptides, récepteurs et facteurs de la coagulation conjugués à un fragment Fc ont été approuvés ou sont en développement pour le traitement de cancers, de maladies auto-immunes ou de troubles de la coagulation. En général, ces protéines sont attachées à la partie N-terminale de la région Fc pour mimer les IgG natives. Suivant le type de groupement attaché, les fonctions effectrices de fixation aux récepteurs FcγR sont conservées contrairement à l'activation du complément [44].

ii. Les enzymes, hormones et autres protéines thérapeutiques recombinantes

Depuis la première insuline recombinante humaine produite par génie génétique et commercialisée en 1982, une grande diversité de protéines recombinantes a été développée et mise sur le marché. Ce sont par exemple, des hormones pour traiter les troubles endocriniens, des facteurs de la coagulation pour le traitement de l'hémophilie ou des enzymes pour traiter les déficiences métaboliques. Si les anticorps monoclonaux représentent à eux seuls plus de la moitié des produits biopharmaceutiques recombinants récemment approuvés par l'agence américaine du médicament (FDA) [49], une part importante des protéines recombinantes ayant reçu une autorisation de mise sur le marché appartiennent à la classe des enzymes, hormones, cytokines ou facteur de la coagulation qui sont aussi utilisées dans des domaines aussi variés que l'ophtalmologie, la néphrologie ou la cardiologie.

A titre d'exemple, une liste des protéines thérapeutiques recombinantes approuvées par la FDA sur la période 2011-2016, autres que les protéines de fusion ou anticorps monoclonaux, est présentée dans le tableau 5.

Classe de protéine	Protéine	Spécialité médicale	Indications thérapeutiques
Enzyme	Asparaginase	Hématologie/Oncologie	Leucémie
	Glucarpidase	Néphrologie	Défaillance rénale
	β -glucocerebrosidase	Endocrinologie/Gastroentérologie	Maladie de Gaucher
	Ocriplasmine	Ophtalmologie	Traitement des trous maculaire
	Lipase acide lysosomale	Cardiologie	Déficience en lipase acide lysosomale
Facteur de croissance	Filgrastim (G-CSF)	Hématologie/Oncologie	Neutropénie
Hormone	Metreleptine	Immunologie	Lipodismorphie
	Hormone parathyroïdienne	Endocrinologie/Hématologie	Hypoparathyroïdie
Cytokine	Interféron Beta-1a Pegylé	Immunologie	Sclérose en plaque
Facteur de la coagulation	Facteur IX (3 produits)	Hématologie	Hémophilie B
	Facteur VIII (7 produits)	Hématologie	Hémophilie A
	Facteur Von Willebrand	Hématologie	Maladie de Von Willebrand
	Facteur XIIIa	Hématologie	Déficience congénitale en FXIII
Inhibiteur de protéase	Inhibiteur de C1 estérase	Hématologie	Angio-oedèmes héréditaires

Tableau 5 : Protéines recombinantes approuvées par la FDA sur la période 2011-2016 (à l'exception des anticorps monoclonaux et des protéines de fusion) [50].

3. La structure des protéines thérapeutiques

I. Les 4 niveaux de structure des protéines

D'un point de vue chimique, les protéines sont des polymères d'acides aminés liés par la formation de liaisons peptidiques covalentes entre le groupe α -carboxylique d'un acide aminé et le groupe α -aminé de l'acide aminé suivant. La séquence en acides aminés constitue la structure primaire des protéines.

La structure secondaire des protéines est déterminée par la conformation spatiale que prend localement la chaîne peptidique. Les liaisons hydrogènes résultant des interactions entre les atomes d'oxygène et d'azote des groupements amides du squelette peptidique à l'intérieur du biopolymère peuvent lui imposer deux dispositions spatiales caractéristiques, l'une hélicoïdale et l'autre plissée. Les deux motifs dominants des structures secondaires sont l'hélice α et le

feuillet β . Les coudes sont un troisième type de structure secondaire. Il s'agit de structures non périodiques correspondant à un repliement particulier du squelette carboné localisé à 3 ou 4 résidus consécutifs. Les coudes permettent le plus souvent de relier 2 structures secondaires périodiques (hélices et/ou brins).

Quand les chaînes polypeptidiques se recourbent et se replient de façon à prendre une forme tridimensionnelle plus compacte, elles engendrent un niveau supérieur de structure, la structure tertiaire. Cette structure représente la forme globulaire des protéines en solution et est maintenue grâce à différents types d'interactions : liaisons covalentes (ponts disulfures), interactions électrostatiques (liaisons ioniques, liaisons hydrogènes), interactions de Van der Waals ou interactions avec le solvant et l'environnement (ions, lipides...). La structure tertiaire est dépendante de la séquence en acides aminés et de l'environnement dans lequel évolue la protéine.

De nombreuses protéines, comme les anticorps, sont constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques en interaction et ayant leur propre structure tertiaire. Chaque chaîne est considérée comme une sous-unité de la protéine. Ce type d'organisation constitue un nouveau degré dans la hiérarchie des structures des protéines, la structure quaternaire. L'étude des structures quaternaires s'intéresse aux différents types de sous-unités présentes dans la protéine, à leur nombre et à la nature des interactions qui s'établissent entre elles [51].

II. Les modifications post-traductionnelles des protéines

Les modifications apportées à une protéine après sa synthèse sont appelées modifications post-traductionnelles (MPTs). Elles sont impliquées dans des mécanismes biologiques essentiels utilisés par les cellules eucaryotes pour diversifier les fonctions de leurs protéines, leur donner leur forme mature et les diriger vers les compartiments cellulaires adéquats. Ces modifications peuvent être divisées en trois classes : 1) l'addition covalente d'une ou plusieurs molécules (phosphorylation, glycosylation...), 2) le clivage protéolytique d'une ou plusieurs liaisons peptidiques et 3) la formation de liaisons intra- ou intermoléculaires (pont disulfure). Les MPTs jouent un rôle clé dans la fonction des protéines puisqu'elles régulent l'activité enzymatique, les interactions avec d'autres molécules (protéines, acides nucléiques, lipides...) et la localisation dans la cellule [52]. Si les MPTs sont réalisées le plus souvent par des

enzymes dans les compartiments cellulaires, des réactions chimiques induites par une exposition à des éléments exogènes peuvent également moduler les propriétés physicochimiques des protéines en dehors de tout processus physiologique. *In vivo*, elles peuvent être la conséquence de notre mode de vie (alimentation, environnement...) ou de maladies dont nous souffrons (diabète, cirrhose), et *in vitro*, les modifications induites peuvent être intentionnelles (modification volontaire de la fonction d'une protéine) ou accidentelles (artéfact d'analyse, impact de la production). Il existe plusieurs centaines de MPTs de protéines décrites, telles que l'acétylation ou l'ubiquitination, qui peuvent être impliquées dans la régulation de processus cellulaires, l'expression de gènes ou la transduction du signal mais qui sont rarement caractéristiques de produits biopharmaceutiques. C'est la raison pour laquelle, nous nous focaliserons seulement sur les MPTs les plus souvent observées chez les protéines thérapeutiques et pouvant influencer leur stabilité ou leur activité biologique [53].

La glycosylation représente la MPT la plus répandue puisque plus de 50% des protéines humaines sont glycosylées. C'est également l'une des modifications les plus complexes qui peut impacter le repliement, la stabilité, la solubilité, l'immunogénicité et la fonction des protéines. Les unités oligosaccharidiques vont se fixer sur des asparagines spécifiques pour les N-glycanes et sur des sérine/thréonine pour les O-glycanes. Concernant la N-glycosylation, une séquence consensus de type Asn-X-Ser/Thr (X étant un amino-acide autre que la proline) est essentielle à la fixation d'oligosaccharides, en plus d'une structure secondaire locale adaptée. Alors que la protéine traverse les différents compartiments cellulaires, un précurseur oligosaccharidique est transféré sur une asparagine spécifique de la protéine dans le réticulum endoplasmique puis une série de glycosidases et de glycosyltransférases présentes dans l'appareil de Golgi vont enlever ou ajouter des unités saccharidiques conduisant à la formation de chaînes N-glycanniques de type « oligomannose », « hybride » ou « complexe ». Ces trois structures sont composées d'un noyau (« core ») commun composé de deux N-acétylglucosamines (GlcNAc) et trois mannoses. La famille des oligomannoses (ou « *high-mannose* ») regroupe les N-glycanes les plus immatures constitués du « core » et d'un nombre variable de mannoses supplémentaires (généralement supérieur à cinq et inférieur à neuf). Les formes dites « complexes » sont modifiées par un nombre variable d'antennes trisaccharidiques (composée d'une N-acétylglucosamine (GlcNAc), d'un Galactose (Gal) et d'un

acide N-Acétylneuraminique (NeuAc)), et les formes hybrides sont intermédiaires et sont composées d'au moins une antenne et d'un mannose sur leur « core » (Figure 4) [54].

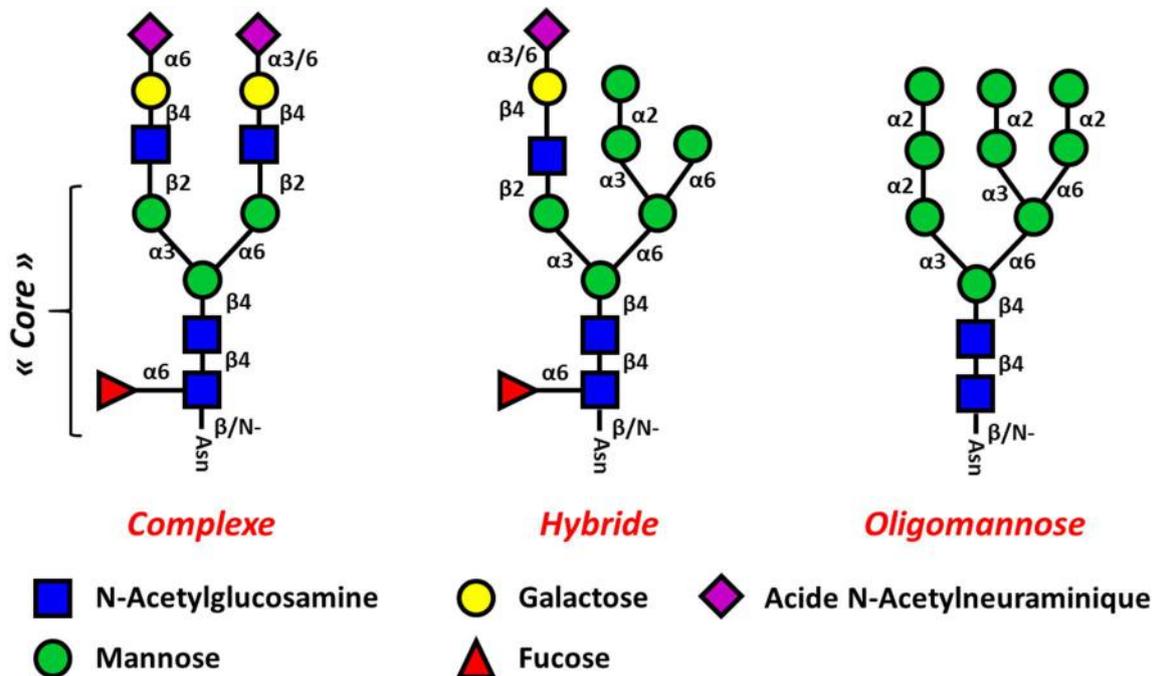


Figure 4 : Schéma représentant les 3 principaux types de N-glycanes (complexe, hybride et oligomannose) partageant un noyau commun (« core ») composé des deux premières N-acétylglucosamine et des trois premiers mannoses.

Dans le cas de protéines comme les IgG, un fucose proximal est présent sur la première N-acétylglucosamine du noyau commun des structures N-glycanniques de type complexe et hybride. Le type de structure N-glycannique va dépendre du type de protéines, du lieu d'expression et de la conformation locale du site de N-glycosylation (accessibilité des glycosidases et glycosyltransférases). A titre d'exemple, la plupart des protéines plasmatiques ont des profils de N-glycosylation de type complexe.

La « O-glycosylation » correspond à la modification d'un résidu thréonine (Thr) ou sérine (Ser) d'une protéine par un O-glycane au niveau du groupement hydroxyle libre de leur chaîne latérale. Contrairement à la N-glycosylation, les O-glycosylations ne nécessitent généralement pas d'être impliquées dans une séquence consensus particulière. Ce sont généralement des structures à chaînes courtes très hétérogènes. Une même protéine peut posséder plusieurs sites de N/O-glycosylation conduisant à une très forte hétérogénéité de structure.

La γ -carboxylation et la β -hydroxylation sont deux exemples de MPTs naturelles caractéristiques de la famille des facteurs de la coagulation, qui constituent une part significative des produits biopharmaceutiques. Ces deux modifications sont effectuées par des enzymes spécifiques de type carboxylase et hydroxylase, et sont impliquées dans la fixation du calcium qui est un élément primordial de leur fonction biologique. Il existe de nombreuses autres MPTs naturelles de protéines thérapeutiques plus ou moins fréquentes avec ou sans impact fonctionnel telles que la phosphorylation, la sulfatation ou l'amidation [53].

Si beaucoup de MPTs naturelles sont d'origine enzymatique, les MPTs dites « induites » sont souvent l'œuvre de phénomènes physico-chimiques. Les protéines thérapeutiques étant le plus souvent des protéines globulaires, elles sont particulièrement sensibles à des dégradations chimiques en solution, et à l'oxydation. Des radicaux libres (ou ROS : *Reactive oxygen species*) générés par divers stress cellulaires vont conduire à l'oxydation de certains acides aminés tels que les histidines, les tryptophanes et plus particulièrement les méthionines et les cystéines [55]. La sensibilité à l'oxydation d'un acide aminé est directement corrélée à son accessibilité au solvant [56]. Une autre MPT intervenant en solution est la déamidation des asparagines. Cette réaction, se produisant à pH neutre ou basique, est initiée par la formation d'un intermédiaire cyclique succinimide consécutif à la perte d'un groupement ammoniac. L'hydrolyse de cet intermédiaire instable conduit à la formation de résidus d'acide aspartique ou isoaspartique [57,58]. La réaction de déamidation est généralement favorisée par certaines séquences de type Asn-Gly (NG), Asn-Ser (NS), Asn-Thr (NT) et Asn-Asn (NN), mais également par d'autres facteurs comme la température, la conformation locale ou la concentration saline [59]. Les glutamines sont susceptibles d'être déamidées, mais la réaction est plus lente que pour les asparagines. La formation d'un intermédiaire cyclique imide conduit à la formation d'acides isoaspartiques. Cette isomérisation a pour conséquence d'introduire un groupement méthyle dans le « squelette » carboné de la protéine et d'impacter sa structure. Par ailleurs, cet intermédiaire cyclique instable peut fragiliser les liaisons peptidiques, c'est pourquoi certaines liaisons peptidiques en position C-terminale d'acides aspartiques sont particulièrement sensibles à l'hydrolyse, notamment les motifs Asp-Pro [60].

Il existe également des MPT induites par des éléments exogènes. Des enzymes de type carboxypeptidase B peuvent être produites par des lignées cellulaires comme avec la lignée

CHO et induire le clivage de la lysine C-terminale des chaînes lourdes d'anticorps monoclonaux, conduisant à une hétérogénéité de charge et pouvant impacter les fonctions effectrices (CDC) de l'anticorps [61]. Le phénomène de glycation est une autre MPT liée à un élément exogène couramment observée chez les protéines thérapeutiques. Il s'agit de la réaction chimique entre la fonction aldéhyde d'un sucre réducteur et la fonction amine d'un résidu lysine d'une protéine (réaction de Maillard). Cette réaction est observée *in vivo*, par exemple, lorsqu'une molécule de glucose interagit avec une protéine plasmatique. Chez des personnes diabétiques avec une glycémie non-contrôlée, un fort taux de glycation peut entraîner la formation d'AGE (*Advanced Glycated End_products*) ayant des conséquences pathologiques graves [62], notamment pour des protéines comme les IgG et l'albumine, abondantes dans le plasma et ayant une demi-vie prolongée. Dans le cas des protéines thérapeutiques, cette MPT est observée lorsque du glucose entre dans la composition du milieu de culture et réagit avec la protéine recombinante d'intérêt [63] ou lorsqu'un sucre réducteur comme le glucose ou le maltose est choisi comme excipient pour stabiliser une protéine thérapeutique comme c'est le cas pour plusieurs IGIV commerciales.

Acide aminé	Modification Post-Traductionnelle	Impact structural	Impact fonctionnel
Asparagine	Déamidation	Modification charge nette, conformation	Affinité site actif*, pharmacocinétique
	N-Glycosylation	Conformation, stabilité, solubilité, hétérogénéité	Fonctions effectrices anticorps (ADCC, CDC), pharmacocinétique
Acide aspartique	Isomérisation	Conformation	Affinité site actif*
	β -Hydroxylation	Formation de β -hydroxyaspartate	Fonction biologique des facteurs de la coagulation
	Clivage liaison peptidique	Fragmentation	Perte d'activité
Glutamine	Déamidation	Modification charge nette	Affinité site actif*
	γ -Carboxylation	Formation de γ -carboxyglutamate	Fonction biologique des facteurs de la coagulation
	Cyclisation	Formation acide pyroglutamique	Affinité site actif*
Méthionine	Oxydation	Modification de la distribution de charge locale	Affinité site actif (diminution de l'affinité au FcRn des anticorps)
Tryptophane	Oxydation	Modification cycle aromatique, conformation	Affinité site actif*
Cystéine	Oxydation	Acide sulfonique, conformation, réaction avec thiols libres circulants (cystéinylation)	Affinité site actif (diminution de l'affinité au FcRn), perte propriétés antioxydantes de l'albumine
	Pont disulfure	Maturation structurale des protéines (structure quaternaire)	Indispensable à la fonction des protéines
Histidine	Oxydation	Réaction histidine oxydée avec autres acides aminés	Affinité site actif*
Lysine	Glycation	Modification de la charge nette et conformation, formation d'AGE	Affinité site actif*, pharmacocinétique
	Clivage C-Terminal	Hétérogénéité de charge	Fonctions effectrices anticorps (diminution CDC)
Sérine/ Thréonine	Phosphorylation/ Sulfatation	Modification de la charge nette	Activation/régulation enzymatique

Tableau 6 : Modifications Post-Traductionnelles couramment observées pour des protéines thérapeutiques avec leur impact sur la structure et la fonction biologique. (*) La modification d'un acide aminé impliqué dans le site actif d'une protéine peut impacter son activité biologique, comme son affinité pour un récepteur ou la fixation d'un antigène pour un anticorps.

III. La relation/structure fonction des protéines

Dans le cadre du développement de protéines thérapeutiques, et au-delà de la seule caractérisation structurale de MPTs, il est primordial d'évaluer les impacts fonctionnels de chaque modification en termes d'efficacité (activité biologique) et de bio-sécurité (inocuité).

Comme nous l'avons souligné précédemment, la glycosylation est la MTP la plus répandue et la plus hétérogène observée chez les protéines humaines et les conséquences fonctionnelles des variations de structures glycaniques peuvent être importantes sur les propriétés pharmacologiques des produits biopharmaceutiques. En termes de pharmacocinétique, les protéines ayant des structures oligomannosidiques sont captées par les récepteurs à mannose des cellules hépatiques et immunitaires réduisant alors leur demi-vie. A l'inverse, les structures glycaniques sialylée (NeuAc) protègent ces mêmes protéines de leur clairance par les récepteurs à asialoglycoprotéine présents également dans les cellules hépatiques [64,65]. Dans le cas des anticorps, la glycosylation a un impact majeur sur la fonction biologique puisque l'absence de N-glycosylation au niveau de la région Fc conduit à la perte des fonctions effectrices. Mais des modifications plus subtiles des structures glycaniques peuvent également avoir un impact significatif. Par exemple, les anticorps ayant un faible taux de fucose proximal présentent une affinité accrue aux récepteurs FcγR et donc une ADCC augmentée, alors qu'un taux important de galactoses terminaux augmente l'affinité des IgG pour la protéine C1q améliorant alors l'activation du complément (CDC) [54].

Plus généralement, la modification d'un acide aminé impliqué dans le site actif d'une protéine peut perturber ou annihiler son affinité pour une molécule d'intérêt et donc affecter son activité biologique. Dans le cas des anticorps, la déamidation d'une asparagine ou la glycation d'une lysine appartenant aux domaines CDR peut significativement altérer la fixation de l'antigène [66]. De même, des études ont montré que l'oxydation de deux méthionines à l'interface des domaines CH2 et CH3 de la partie Fc des IgG, dans l'environnement proche du site d'interaction au récepteur FcRn, conduit à une modification des propriétés pharmacocinétiques (diminution de la demi-vie) [56].

L'élucidation de la relation structure/fonction d'une protéine nécessite l'utilisation orthogonale de techniques analytiques structurales et fonctionnelles. La résonance magnétique nucléaire,

la cristallographie, la spectrométrie de masse et la chromatographie permettent de caractériser et/ou d'isoler des protéoformes avec des MPT cibles. Des techniques analytiques fonctionnelles telles que la chromatographie d'affinité, la résonance plasmonique de surface ou des tests cellulaires/animaux permettent d'évaluer les interactions intermoléculaires protéine/ligand et les fonctions biologiques de la protéine. La corrélation des résultats des analyses structurales et fonctionnelles conduit à l'élucidation de la relation structure/fonction d'une protéine. D'autres stratégies existent pour caractériser l'impact de la structure sur la fonction des protéines comme la prédiction *in silico* d'interaction entre molécules biologiques par modélisation moléculaire (« *docking* ») ou l'utilisation de la biologie moléculaire (mutagénèse dirigée).

IV. L'importance de la caractérisation des protéines thérapeutiques dans le contexte réglementaire et pharmaceutique

Les protéines thérapeutiques étant des molécules complexes pouvant comporter un nombre important de micro-hétérogénéités au niveau moléculaire, les agences du médicament (FDA, EMA) exigent une caractérisation poussée des produits biopharmaceutiques pour s'assurer de l'uniformité des lots produits et de la comparabilité avec les dossiers soumis [67]. Certaines caractéristiques structurales, ayant un impact significatif sur les fonctions biologiques des médicaments, sont désignées comme des attributs critiques de qualité (CQA : *Critical Quality Attributes*). Un CQA est défini par les directives des autorités réglementaires (ICH Q8R2 et Q10) comme « une caractéristique physique, chimique, biologique ou microbiologique qui doit se situer dans une limite, une plage ou une distribution appropriée pour assurer la qualité souhaitée du produit ». Les CQAs doivent être définis durant la phase de développement des produits biopharmaceutiques et sont généralement identifiés grâce aux résultats d'études cliniques ou d'études de relation structure/fonction employant des méthodes de caractérisation analytiques et biologiques. Un suivi des CQAs au cours du processus de production ou lors de stockage à long terme doit être effectué à l'aide de méthodes analytiques appropriées permettant (1) une caractérisation approfondie et (2) ayant la capacité de détecter des changements des propriétés chimiques, physiques ou biologiques dans le temps (« *stability-indicating analytical methods* »). Si l'on prend l'exemple des anticorps monoclonaux, le taux de fucosylation des structures N-glycanniques ou la glycation de la

région CDR constituent des CQAs alors que le clivage des lysines en position C-terminale des chaînes lourdes n'est pas considéré comme tel [49,68].

Le niveau de complexité structurale des protéines requiert le développement de méthodologies analytiques innovantes pour satisfaire aux exigences des autorités réglementaires. La spectrométrie de masse s'est imposée comme la technique de choix pour la caractérisation de protéines thérapeutiques en raison de sa spécificité, de sa sensibilité et des informations structurales qu'elle apporte. Cependant, une caractérisation structurale fine nécessite souvent le couplage de la spectrométrie de masse à une technique orthogonale comme la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire.

Chapitre II : Les méthodes de caractérisation structurale des protéines thérapeutiques

1. La chromatographie liquide appliquée à l'analyse de protéines thérapeutiques

L'une des principales techniques utilisées pour la caractérisation des protéines est la chromatographie liquide en raison de la rapidité d'analyse, du pouvoir de résolution et de la reproductibilité qu'apporte cette technique en plus d'une compatibilité avec une large gamme de détecteurs. Par ailleurs, il existe une grande diversité de phases stationnaires chromatographiques permettant la séparation des protéines en fonction de leur taille, de leur charge, de leur hydrophobie ou de leur interaction avec un ligand. Le comportement chromatographique des protéines, suivant le type de phase stationnaire utilisé, fournit donc des informations indispensables à la caractérisation de leur structure.

I. La chromatographie d'exclusion stérique

Les agences réglementaires considèrent la chromatographie d'exclusion stérique (SEC : *Size Exclusion Chromatography*) comme la méthode de référence pour la caractérisation des agrégats et fragments de protéines thérapeutiques [69]. Le principe de séparation de la SEC est basé sur le rayon hydrodynamique des protéines. La phase stationnaire est composée de particules sphériques poreuses dont la taille des pores est rigoureusement contrôlée et à travers lesquels les biomolécules vont diffuser différemment selon leur rayon hydrodynamique [70]. Les biomolécules ou agrégats les plus larges, n'ayant pas la capacité d'entrer dans les pores de la phase stationnaire, sont élués plus tôt que les espèces plus petites qui vont diffuser plus longtemps à travers les pores des particules. Le temps d'éluion augmente donc avec la réduction du rayon hydrodynamique des protéines [71]. Les petites protéines telles que l'érythropoïétine sont généralement analysées avec des colonnes ayant de petits pores (150 Å), alors que de plus grosses protéines, comme les anticorps, sont analysées avec des colonnes ayant des pores plus gros (300 Å) [72]. La taille d'une protéine analysée par SEC peut être estimée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de protéines standards ayant des masses moléculaires connues. Cependant, la taille déterminée n'est généralement qu'une

estimation puisque la relation entre le rayon hydrodynamique et la masse moléculaire des protéines reste imprécise en raison de la forme souvent non sphérique des protéines [73]. L'un des principaux avantages de la SEC est la caractérisation et la quantification des agrégats covalents et non-covalents en conditions non-dénaturantes, qui présente l'avantage d'avoir un impact minimal sur la conformation des protéines. Les agrégats pouvant présenter un caractère immunogène, sont considérés comme des CQAs (*Critical Quality Attributes*) par les agences réglementaires.

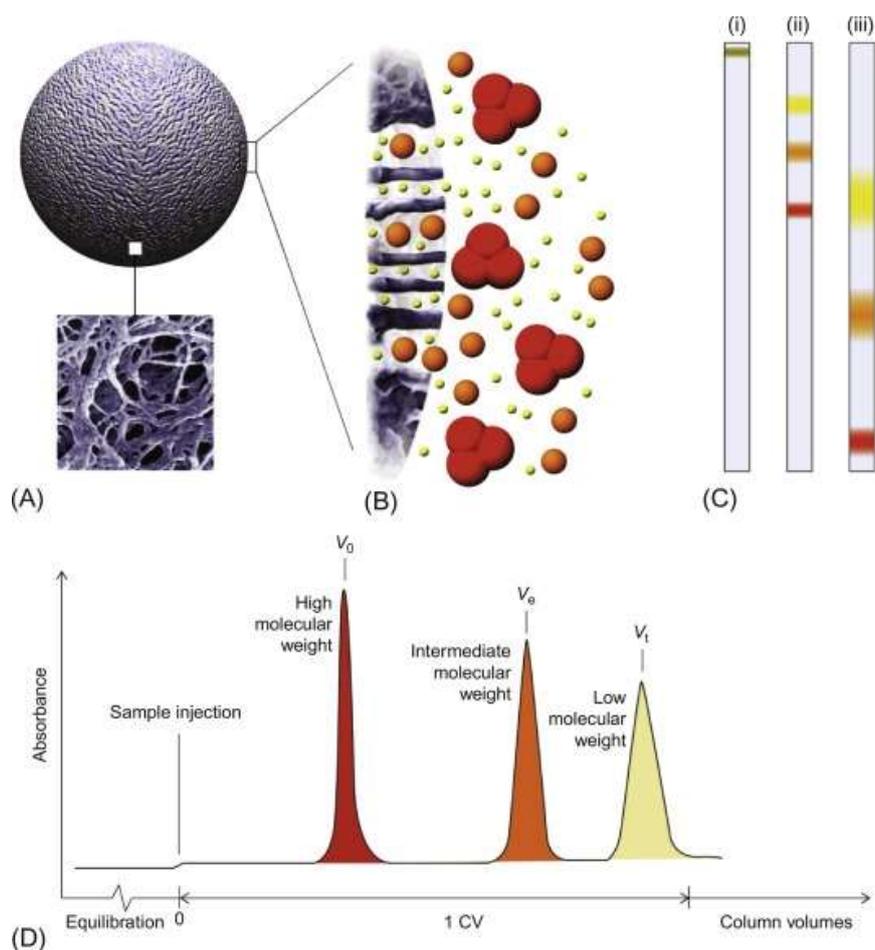


Figure 5 : Illustration du principe de séparation de la chromatographie d'exclusion stérique. (A) Image d'une bille de résine de chromatographie avec un agrandissement au microscope électronique. (B) Schéma des protéines diffusant ou exclues des pores des particules. (C) Description graphique de la séparation. (D) Chromatogramme hypothétique. D'après Hall *et al.* [74].

Idéalement, les analyses SEC doivent être effectuées en conditions inertes, c'est-à-dire sans interactions entre la phase stationnaire et les biomolécules. En réalité, des interactions non-spécifiques de type électrostatique ou hydrophobe peuvent intervenir entre les protéines et la

phase stationnaire. Ces interactions non-désirées conduisent à une diminution des performances chromatographiques avec notamment des décalages de temps de rétention ou une asymétrie des pics. L'approche la plus répandue pour limiter les interactions électrostatiques en SEC est l'augmentation de la force ionique de la phase mobile. Par ailleurs, l'ajout de 5 à 10% d'un solvant organique comme l'acétonitrile à la phase mobile permet de limiter les interactions hydrophobes. Le pH de la phase mobile est également déterminant. Il est généralement souhaitable qu'il soit proche du point isoélectrique (pI) de la protéine pour éviter les phénomènes d'échange d'ions ($\text{pH} < \text{pI}$) ou d'exclusion d'ions ($\text{pH} > \text{pI}$) [71]. Les sels utilisés pour augmenter la force ionique et stabiliser le pH sont généralement le chlorure de sodium et le phosphate de sodium. Des traitements pour inactiver les phases stationnaires sont également utilisés pour limiter les interactions non-spécifiques. Les phases stationnaires en silice sont souvent traitées chimiquement par dérivation des groupements silanols (Exemple : 1,2 propanediol) ou par l'utilisation de la technologie de phase hybride organique/inorganique BEH (*Bridged Ethylene Hybrid*) fournissant une surface hydrophile inerte limitant alors les interactions des protéines avec la phase stationnaire [75].

Le développement récent de colonnes ayant des particules d'une taille inférieure à 2 μm a permis de réduire considérablement les temps d'analyse en SEC sans perte de résolution chromatographique. Cependant, l'utilisation de particules aussi petites induit une augmentation des contraintes physiques telles que la pression et la température pouvant conduire à une augmentation du taux d'agrégats dans la colonne, nécessitant alors la confirmation des profils SEC par une méthode orthogonale telle que l'ultracentrifugation analytique ou la SEC conventionnelle.

II. La chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions (IEX : *Ion Exchange Chromatography*) est considérée comme la méthode non-dénaturante de référence pour caractériser l'hétérogénéité de charge des protéines. Le principe de séparation de l'IEX est basé sur les interactions ioniques entre les charges d'une protéine et une phase stationnaire contenant des groupements ioniques fonctionnels. Il existe deux types de phases stationnaires en IEX : les échangeurs de cations, destinés aux protéines ayant un pI supérieur à 7, et les échangeurs d'anions, destinés aux protéines ayant un pI inférieur à 7. L'élution des protéines peut être obtenue par gradient

de sels ou par gradient de pH. Dans le cas d'une séparation par gradient de sels, le pH de la phase mobile est maintenu constant et compris entre le pKa des groupements fonctionnels de la phase stationnaire et le pI de la protéine d'intérêt. L'augmentation de la force ionique de la phase mobile induit l'élution des protéines par la compétition des sels contenus dans la phase mobile avec les protéines adsorbées sur la phase stationnaire. La séparation par gradient de pH consiste à augmenter (échangeurs de cations) ou diminuer (échangeur d'anions) le pH de la phase mobile, tout en gardant une force ionique constante et modérée. Lorsque le pH de la phase mobile atteint le pI de la protéine, les interactions ioniques entre cette dernière et les groupements fonctionnels de la phase stationnaire s'affaiblissent, conduisant à son élution. Un type d'élution hybride faisant intervenir à la fois une modification du pH et une augmentation de la force ionique de la phase mobile est possible dans certains cas pour obtenir une sélectivité alternative et une meilleure séparation [70,73].

S'il existe des colonnes IEX ayant des phases stationnaires en silice, les phases stationnaires les plus répandues sont constituées de particules de polymères non-poreuses permettant une utilisation sur une plus large gamme de pH. En raison de la forte résistance au transfert de masse des protéines de grandes tailles et de la nature des interactions ioniques (énergétiquement fortes), les particules non-poreuses sont privilégiées pour éviter un élargissement des pics chromatographiques [70]. Les groupements fonctionnels généralement utilisés sont des sulfonates (sulfopropyl) dans le cas des échangeurs de cations et des amines quaternaires (QAE : Quaternaire AminoEthyl) pour les échangeurs d'anions. Il s'agit d'échangeurs d'ions « forts » car ces groupements possèdent des pKa leur permettant de rester chargés sur la gamme de pH utilisée pour l'analyse des protéines par IEX. Il existe également des échangeurs d'ions « faibles » constitués d'acides « faibles » (groupement carboxyméthyl) pour les échanges de cations et de bases « faibles » de type amine tertiaire (DEAE : DiEthylAminoEthyl) pour les échanges d'anions. Les phases avec échangeurs d'ions faibles sont généralement utilisées en seconde intention lorsque la sélectivité obtenue avec des échangeurs forts n'est pas satisfaisante, en gardant à l'esprit que les capacités d'échanges de la phase stationnaire vont varier avec le pH [76].

L'IEX est une technique d'analyse incontournable pour la caractérisation des protéines en condition native et permet d'identifier des modifications de structures subtiles ayant un impact

sur la charge des protéines. Les protéines portant des modifications impactant leur charge nette telles que la déamidation, le clivage d'acides aminés terminaux chargés (Lysine), la glycation ou l'oxydation des cystéines peuvent être séparées avec un degré de résolution élevé permettant une caractérisation et une quantification précise de ces modifications [57,77,78]. Par ailleurs, des MPTs n'induisant pas une modification de la charge nette mais impactant la distribution des charges locales des protéines peuvent aussi être détectées par IEX. C'est le cas par exemple de l'oxydation des méthionines, de l'isomérisation des acides aspartiques, ou de certaines glycoformes (fucosylation/galactosylation) [79–82]. L'IEX est également capable de détecter des modifications de structures plus importantes telles que l'agrégation, la fragmentation ou la réduction de ponts disulfures [76].

III. La chromatographie d'affinité

Le principe de séparation de la chromatographie d'affinité repose sur les propriétés d'interactions biologiques entre une molécule et un ligand greffé sur la phase stationnaire d'une colonne chromatographique. Ce type de chromatographie est très utilisé dans le cadre d'études cliniques ou pharmaceutiques pour retenir spécifiquement certains analytes ou pour l'étude d'interactions biologiques. Concrètement, l'échantillon est injecté sur la colonne d'affinité dans des conditions permettant une forte interaction entre l'analyte d'intérêt et le ligand immobilisé. La formation du complexe protéine / ligand nécessite l'utilisation d'un tampon aqueux ayant un pH et une force ionique les plus proches de l'environnement natif du ligand et de la molécule cible. Les composants de l'échantillon n'ayant pas ou peu d'affinité pour le ligand sont éliminés au cours de cette étape, constituant le pic « non-retenu ». L'étape suivante consiste à utiliser un tampon d'élution permettant de dissocier la molécule cible du ligand. Cela nécessite une modification de la composition de la phase mobile, soit par une variation du pH, soit par l'ajout d'un agent qui va entrer en compétition avec la molécule cible et promouvoir son élution. Le tampon d'élution peut être appliqué soit par palier soit par gradient [83,84].

Les ligands d'affinité peuvent être d'origine biologique ou synthétique. Parmi les ligands d'origine biologique, les plus utilisés sont les anticorps, en raison de leurs fortes capacités de capture de molécules spécifiques (immunoaffinité), les protéines fixatrices d'immunoglobulines (Protéines A, G et L), l'avidine et la streptavidine pour leur affinité à la biotine (et aux protéines

biotinylées), les lectines qui ont une affinité pour les glycanes permettant d'isoler les glycoprotéines ou encore des oligo/polysaccharides comme l'héparine interagissant avec les serpines (*serine protease inhibitor*). Bien que moins utilisés que ceux d'origine biologique, un certain nombre de ligands synthétiques sont employés pour purifier et caractériser les protéines, tels que les ions métalliques chélatés (IMAC : *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) utilisés pour purifier des protéines contenant des résidus histidine, les aptamères (oligonucléotides synthétiques spécifiques de molécules cibles) ou l'acide boronique et ses dérivés dont l'affinité pour les groupements cis-diol des sucres permet la capture des glycoprotéines ou des protéines glyquées [85].

Si la chromatographie d'affinité est historiquement utilisée pour l'isolement et la purification des protéines, cette technique peut s'avérer précieuse pour la caractérisation structurale des protéines. En effet, certains ligands qui ont une affinité spécifique pour des MPTs (Modifications post-traductionnelles) comme la phosphorylation (IMAC) [85], la glycosylation/glycation (lectines, boronate) [86] ou l'oxydation (séparation par la protéine A des IgG oxydées) [56] permet de détecter ces modifications. Des ligands peuvent également mettre en évidence des modifications conformationnelles, c'est le cas par exemple de l'héparine qui permet de discriminer les formes latentes de la forme native des serpines [87].

Au-delà de la purification et de la caractérisation structurale des protéines, la chromatographie d'affinité peut être utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur activité biologique. Dans le cas où le ligand d'affinité est un récepteur cellulaire, la forme active d'une protéine peut être séparée d'une forme inactive ou de formes ayant une activité biologique différente. Des colonnes d'affinité récemment développées ayant comme ligands des récepteurs FcRn ou FcγRIII ont permis de déterminer l'impact de MPTs comme l'oxydation ou la glycosylation (fucosylation, galactosylation) sur l'affinité d'anticorps monoclonaux pour les récepteurs Fc [88,89]. Ces études ont démontré l'efficacité de cette technique chromatographique dans le cadre d'études de la relation structure/fonction des protéines et pour l'étude des interactions biologiques entre protéines.

IV. La chromatographie d'interaction hydrophobe

En 1948, Tiselius utilisa le terme « *salting-out chromatography* » pour décrire l'interaction entre des biomolécules et la surface hydrophobe d'un matériau en présence de sels, posant les bases de ce qui sera appelé plus tard la chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC : *Hydrophobic Interaction Chromatography*) [90]. Bien qu'initialement utilisée pour la purification des protéines, la HIC est de plus en plus utilisée à des fins de caractérisation structurale. A l'instar de la chromatographie de phase inverse (RPC : *Reverse Phase Chromatography*), en HIC les protéines sont séparées en fonction de leur hydrophobie. Cependant, la HIC présente l'avantage d'être réalisée en conditions non-dénaturantes à pH physiologique, à température ambiante et sans ou peu de solvant organique contrairement à la RPC. Ces conditions d'analyses permettent de préserver la structure native et l'activité biologique/enzymatique des protéines tout en apportant des informations complémentaires à la RPC.

Lorsqu'une protéine est introduite dans un environnement aqueux, les molécules d'eau forment des liaisons hydrogènes avec les résidus hydrophiles de la protéine permettant sa solubilisation si la surface hydrophile de cette dernière est suffisante. En augmentant fortement la concentration en sels de la solution aqueuse, les molécules d'eau interagissant avec la protéine pour la solubiliser vont être mobilisées pour la solubilisation des ions salins conduisant ainsi à la précipitation de la protéine, on parle alors de relargage (ou « *salting-out* »). La séparation des protéines en HIC est basée sur ce principe. L'analyse débute avec une phase mobile fortement concentrée en sels favorisant les interactions non-covalentes entre les parties hydrophobes des protéines et la phase stationnaire hydrophobe de la colonne, puis une élution avec une phase mobile faiblement concentrée en sels permet la re-solubilisation progressive des protéines conduisant à leur élution. Les protéines disposant d'une surface hydrophobe importante sont d'avantage retenues par la phase stationnaire, alors que les protéines les plus hydrophiles sont plus facilement resolubilisées par la phase mobile faiblement concentrée en sels et éluées rapidement [91]. Ce sont en général les sels les plus cosmotropiques (ou anti-chaotropiques) de la série de Hofmeister, comme le sulfate d'ammonium, qui sont utilisés dans la phase mobile initiale puisqu'ils favorisent les interactions hydrophobes protéine-phase stationnaire. Dans certains cas, les tampons d'élution peuvent

contenir de faibles quantités de solvant organique pour favoriser l'élution des espèces les plus retenues. Les phases stationnaires utilisées en HIC présentent généralement une plus faible densité de ligand et sont moins hydrophobes que celles utilisées en chromatographie de phase inverse. Les plus communes sont constituées de particules polymériques ou de silices greffées avec des groupements aliphatiques (butyle, hexyle, ou octyle) [92].

La HIC est appliquée avec succès à la caractérisation de MPTs de protéines thérapeutiques. Le principe de séparation basé sur l'hydrophobie est particulièrement adapté à la caractérisation des formes oxydées, comme l'oxydation de tryptophanes de la région CDR d'anticorps [93]. La HIC a également démontré son efficacité pour la caractérisation de l'isomérisation de résidus d'acide aspartique [94] ou la formation de cycles imides (succinimide) d'anticorps monoclonaux [95]. Certaines modifications conformationnelles, impactant l'hydrophobie de surface des protéines, rendent la HIC très efficace pour la caractérisation d'isomères conformationnels tels que les formes latentes des serpins [96]. La HIC est également la méthode privilégiée pour l'analyse structurale des anticorps conjugués (ADC : *Antibody Drug Conjugate*), et plus particulièrement pour la détermination du nombre de molécules cytotoxiques conjuguées par anticorps (DAR : *Drug-to-antibody Ratio*) [92,97].

V. La chromatographie en phase inverse

La chromatographie en phase inverse (RPC) est de loin la technique chromatographique la plus répandue pour l'analyse des protéines en raison des performances incomparables qu'elle apporte en termes de résolution, de rapidité d'analyse, de flexibilité et de robustesse. La RPC est un type de chromatographie de partage mettant en jeu un mécanisme continu de partition des analytes entre une phase mobile hydrophile et une phase stationnaire hydrophobe. Ce mécanisme de séparation s'applique particulièrement aux petites molécules, alors que les protéines ont généralement une taille trop « grosse » pour être partitionnées entièrement par la phase stationnaire hydrophobe. Dans un mécanisme de séparation similaire à celui de la HIC, seules les parties hydrophobes des protéines sont adsorbées par la phase stationnaire et demeurent adsorbées jusqu'à ce que la concentration en solvant organique de la phase mobile soit suffisante à leur désorption. Une fois désorbées, elles n'interagissent que légèrement avec la phase stationnaire au cours de leur élution [98]. Ce type de séparation « *on/off* », caractéristique des protéines, conduit à d'importants

changements des temps rétentions pour de faibles variations de composition de la phase mobile (<1%). C'est la raison pour laquelle l'élution par gradient est obligatoire (généralement avec un degré de variation faible) pour contrôler les temps de rétention, alors que la longueur des colonnes a peu d'impact sur la séparation. Le mécanisme de séparation des peptides semble être hybride entre partitionnement et adsorption, les peptides subissent une désorption plus rapide que les petites molécules, mais un partitionnement plus lent que les grosses protéines. Les phases mobiles utilisées pour l'analyse RPC de protéines sont généralement des solutions aqueuses dont la concentration en solvant organique (acétonitrile, méthanol ou isopropanol) augmente progressivement pour induire l'élution des protéines. Les protéines sont alors éluées en fonction de leur hydrophobie qui dépendra de leur séquence en acides aminés, de leur structure et de leurs modifications post-traductionnelles. Les phases stationnaires les plus utilisées pour ce type de chromatographie sont des particules de silice avec des pores larges (300 Å) et greffées avec des groupements aliphatiques de différentes tailles (C4, C8 ou C18). Les colonnes greffées avec des groupements de type C4 et C8 sont généralement employées pour l'analyse de fragments ou de protéines intactes, alors que les groupements C18, plus hydrophobes, sont utilisés pour l'analyse de peptides et avec des particules ayant une porosité plus faible (<200 Å). L'utilisation de colonnes avec des greffages différents tels que des groupements diphényles sont de plus en plus utilisés pour l'analyse de protéines intactes en raison de la sélectivité alternative qu'ils fournissent (due aux interactions π - π), notamment pour la caractérisation de formes oxydées [99,100].

La RPC présente toutefois des caractéristiques pouvant limiter ses performances chromatographiques en termes de symétrie et de largeur de pics. Ces problèmes ont pour origine les interactions secondaires indésirables qui peuvent intervenir entre les groupements silanols chargés négativement de la phase stationnaire en silice et les charges positives des protéines. La cinétique des interactions de type ionique est plus lente que celle intervenant pour les interactions hydrophobes, conduisant à une asymétrie et un élargissement des pics. Pour limiter ces interactions indésirables, des phases stationnaires traitées ont été développées (silice hybride BEH, agents de blocage des silanols : trimethylsilyl) et il est indispensable d'utiliser des contre-ions hydrophobes tels que l'acide trifluoroacétique (TFA) dans la phase mobile. A travers un mécanisme similaire à celui de la chromatographie de paires d'ions, le TFA

va interagir avec les charges positives des protéines afin d'augmenter leur hydrophobie, d'améliorer la séparation et de limiter l'interaction avec les silanols de la phase stationnaire. Enfin, un des facteurs limitant les performances chromatographiques de la RPC est la résistance au transfert de masse des grosses protéines qui conduit à la réduction de leur coefficient de diffusion. Ce phénomène peut être limité en utilisant des colonnes ayant des pores plus gros ou des particules plus petites, mais la solution la plus utilisée est l'augmentation de la température de la phase mobile. Une température élevée permet de diminuer la viscosité de la phase mobile et de drastiquement améliorer le coefficient de diffusion des protéines. C'est la raison pour laquelle la température d'analyse des grosses protéines en RPC se situe souvent entre 60 et 80°C [101]. Il est important de garder à l'esprit que ces conditions d'analyse (pH acide, température élevée) peuvent avoir un impact sur la structure des protéines comme le clivage de liaisons peptidiques. L'optimisation d'une méthode RPC consiste donc à trouver un compromis entre performances chromatographiques et intégrité des protéines.

Les applications de la RPC pour la caractérisation des protéines sont nombreuses, que ce soit l'analyse à l'échelle de la protéine intacte pour la quantification relative de MPTs ou à l'échelle peptidique après protéolyse enzymatique, pour le séquençage des acides aminés et la caractérisation des MPTs. Ceci est possible lorsque la chromatographie est couplée à la spectrométrie de masse. En général, ce sont les MPTs induisant une modification de l'hydrophobie telles que l'oxydation, le clivage d'acides aminés terminaux ou la déamidation (entre autres) qui sont caractérisées en RPC [102].

VI. La chromatographie liquide ultra/haute performance

Il est établi depuis les années 1940 que l'utilisation de phases stationnaires ayant des particules de petites tailles permet d'améliorer les performances chromatographiques pour l'analyse des protéines [103]. La chromatographie liquide haute performance (HPLC), dont la taille des particules est comprise entre 3 et 10 μm , est le type de chromatographie communément utilisé pour l'analyse des protéines. A la fin des années 1990, est apparue la chromatographie ultra/haute performance (UPLC) utilisant des particules très fines dont la taille est inférieure à 2 μm [102]. Le principe de l'UPLC est basé sur l'équation de Van Deemter décrivant la relation entre la hauteur équivalente des plateaux théoriques (H) et le débit (vitesse linéaire) de la phase mobile (V) :

$$H = A + \frac{B}{V} + C \times V$$

Les termes A, B et C sont des constantes correspondant à la diffusion turbulente (A), à la diffusion longitudinale (B) et à la résistance au transfert de masse (C). La hauteur équivalente de plateaux théoriques (H) est le paramètre caractérisant l'efficacité d'une colonne chromatographique, plus ce dernier est faible, plus la colonne est efficace. La Figure 6 présente les courbes obtenues à partir de l'équation de Van Deemter pour différentes tailles de particules. Pour les particules les plus grosses (5 et 10 μm), on observe un profil hyperbolique indiquant une diminution de l'efficacité de la colonne pour des débits élevés. Le profil des courbes a tendance à s'aplatir lorsque la taille des particules diminue, et pour des particules de taille inférieure à 2 μm , la hauteur équivalente de plateau théorique reste stable sur une large gamme de débits, indiquant une efficacité optimale de la colonne à des débits élevés. Ceci est dû à la réduction de la résistance de transfert de masse des protéines avec des particules de petites tailles. La possibilité d'utiliser des débits élevés permet alors une réduction significative des temps d'analyses, de meilleures performances chromatographiques (résolution, sélectivité et sensibilité) et une diminution de la consommation de solvant. Cependant, le prix à payer pour l'utilisation de particules fines est une augmentation drastique de la pression nécessitant des dispositifs chromatographiques spécifiques à l'UPLC pour résister à l'importante pression générée, des maintenances plus fréquentes et une durée de vie plus courte des colonnes.

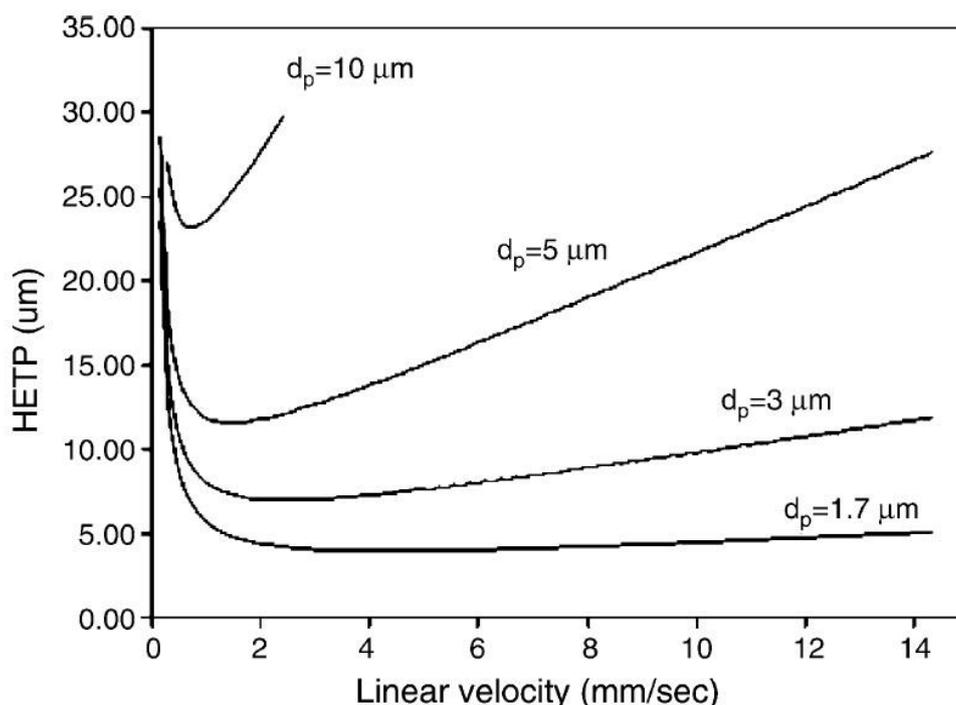


Figure 6 : Courbes de Van Deemter en fonction de la taille de particules (10, 5, 3 et 1,7 μm). D'après Novakova *et al.* [104].

A l'heure actuelle, des colonnes UPLC sont disponibles essentiellement pour les chromatographies d'exclusion stérique et de phase inverse. Compte-tenu de la nature non-poreuse des particules utilisées en IEX et du faible impact de la diminution de la taille pour ce type de particules sur l'amélioration des performances chromatographiques, peu d'applications UPLC existent en IEX [105].

VII. La chromatographie bidimensionnelle

La chromatographie liquide bi-dimensionnelle est une approche analytique consistant à utiliser deux types de séparation chromatographique différents pour obtenir une sélectivité orthogonale, une meilleure capacité de pic ou augmenter le pouvoir de résolution. Cette approche est également utilisée lorsque l'on souhaite coupler à la spectrométrie de masse une technique normalement incompatible avec ce type de détecteur. Dans ce cas, des techniques chromatographiques telles que l'IEX ou la HIC (incompatibles avec la MS) constituent la première dimension et sont couplées à une seconde dimension chromatographique compatible à la MS telle que la RPC. Cette approche a été appliquée avec succès à la caractérisation de l'hétérogénéité de charge d'anticorps monoclonaux observée en IEX et à la

détermination de DAR (*Drug-to-Antibody Ratio*) d'anticorps conjugués [69,106]. Le dispositif peut être « *on-line* » lorsque l'éluant de la première dimension est directement couplé à la seconde dimension, ou « *off-line* » lorsqu'une collecte automatisée des pics séparés en première dimension est nécessaire avant l'analyse en deuxième dimension. Il est également possible d'augmenter le nombre de dimensions chromatographiques en intercalant à des dimensions séparatives (IEX, RPC...) des colonnes présentant des enzymes immobilisées telles que la trypsine ou contenant un agent réducteur dans la phase mobile pour une réduction dans la colonne. Ce type de dispositif pouvant avoir jusqu'à quatre dimensions permet d'automatiser une partie des étapes de préparations d'échantillons pour limiter les biais de préparation et fournir des gains de temps significatifs [107,108].

VIII. Le couplage de méthodes chromatographiques à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est devenue un outil indispensable à la caractérisation des protéines en raison des informations de structure qu'elle peut apporter, telles que la masse moléculaire, la séquence en acides aminés, la stœchiométrie de complexes non covalents ou la conformation. Le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LC-MS) constitue donc un atout majeur pour l'étude structurale des protéines. Les techniques de chromatographie liquide sont généralement couplées à des spectromètres de masse ayant une source d'ionisation par électronébulisation. Ce type de source d'ionisation permet l'analyse d'échantillons liquides mais présente la contrainte de ne pouvoir analyser des molécules qu'en présence de solvants volatils. Par nature, la chromatographie de phase inverse est donc la technique chromatographique de choix pour le couplage à la MS. La seule limite que présente cette technique est la nature du contre-ion utilisé dans la phase mobile pour améliorer les performances chromatographiques. Ainsi, le TFA est un contre-ion fort très efficace pour améliorer la symétrie et la finesse des pics chromatographiques, mais ce dernier peut induire un phénomène de suppression d'ions en masquant les charges positives des protéines, réduisant alors leur rendement d'ionisation et limitant alors la sensibilité de l'analyse. Dans le cadre de l'analyse de protéines entières, ce problème peut être contourné en modifiant les paramètres de la source d'ionisation (augmentation de la tension de cône) pour dissocier les adduits de TFA présents sur les protéines, mais pour l'analyse de peptides, il est préférable

d'utiliser un contre-ion plus faible tel que l'acide formique [98]. Contrairement à la RPC, les autres techniques chromatographiques appliquées à l'analyse des protéines telles que l'IEX, la SEC ou la HIC sont réalisées en conditions non-dénaturantes avec dans leurs phases mobiles des sels non-volatils (chlorure de sodium, phosphate...) incompatibles avec la MS. Les ions générés par ces sels vont former des paires d'ions avec les résidus chargés des protéines conduisant à la présence d'adduits sur les protéines. Ces adduits induisent une forte hétérogénéité en masse perturbant considérablement l'interprétation des spectres. De plus, ces sels inorganiques vont participer au phénomène de suppression des charges des protéines conduisant à une perte de sensibilité de l'analyse [109].

Deux approches existent pour coupler la spectrométrie de masse à des méthodes chromatographiques employant des sels non-volatils. La première consiste, comme nous l'avons abordé précédemment, à utiliser un dispositif chromatographique bi-dimensionnel (voir ci-dessus). Les principaux inconvénients de cette approche sont la complexité de mise en œuvre du dispositif chromatographique bi-dimensionnel et la perte des informations conformationnelles obtenues par la chromatographie non-dénaturante de première dimension lors de l'analyse dénaturante (RPC) de deuxième dimension.

La seconde approche consiste à remplacer les sels non-volatils de la phase mobile par des sels d'ammonium volatils tels que l'acétate d'ammonium ou le formiate d'ammonium. Ces sels présentent l'avantage d'être compatibles avec une ionisation par électronébulisation et d'assurer le maintien d'une certaine force ionique et du pH indispensable à la conservation de la conformation native des protéines. L'intérêt de cette approche est surtout de permettre l'analyse MS directe en condition native des espèces séparées. La substitution de sels non-volatils par des sels d'ammonium a été appliquée avec succès à des méthodes chromatographiques telles que l'IEX et la SEC pour une identification directe par MS d'anticorps monoclonaux ou d'interleukines, tout en conservant de bonnes performances chromatographiques [110–112]. Cette approche fut également utilisée pour développer une méthode de chromatographie d'affinité aux récepteurs FcRn directement couplée à la MS pour l'analyse d'anticorps monoclonaux [113]. Le développement de méthodes HIC-MS est plus difficile en raison des fortes concentrations en sels indispensables à ce type de chromatographie. Pour limiter la concentration en sels nécessaire à la rétention des protéines

en HIC, le développement de phases stationnaires plus hydrophobes a été réalisé pour permettre l'analyse avec des concentrations salines compatibles avec le couplage à la MS [114].

2. La spectrométrie de masse appliquée à la caractérisation des protéines thérapeutiques

La définition d'un spectromètre de masse est relativement simple, il s'agit d'un instrument, composé *a minima* d'une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur, capable d'ioniser un échantillon et de déterminer le rapport masse sur charge (m/z) de l'ion produit. La polyvalence offerte par cette technologie en a fait un outil incontournable dans un grand nombre de domaines comme la caractérisation des protéines grâce aux informations structurales qu'elle apporte (masse moléculaire précise, séquence en acides aminés, conformation...). Si la spectrométrie de masse fut longtemps limitée aux petites molécules thermostables, le développement à la fin des années 1980 de sources d'ionisation douces par électronébulisation (ESI : *ElectroSpray Ionization*) et par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) permit l'application de la MS à des molécules polaires de grandes tailles et thermosensibles telles que les protéines. L'impact dans le domaine de la biologie fut tel que les concepteurs de ces sources d'ionisation, John Fenn pour l'ESI [115] et Koichi Tanaka [116] pour le MALDI, furent récompensés par le prix Nobel de chimie en 2002. Il est aujourd'hui inconcevable de soumettre le dossier d'une protéine thérapeutique à une agence réglementaire sans une caractérisation approfondie par spectrométrie de masse du produit biopharmaceutique.

I. Les sources d'ionisation

i. L'ionisation par électronébulisation

Le concept d'électronébulisation (ou ESI) consiste à générer des ions en phase gazeuse à partir d'un liquide soumis à un champ électrique intense. A la fin des années 1960, les travaux de Malcolm Dole démontrèrent les capacités de l'électronébulisation à ioniser des molécules de masses élevées (> 50 kDa) [117], mais ce furent les développements réalisés par John Fenn à partir des années 1980 qui ont permis l'application de ce type de source d'ionisation à l'analyse de macromolécules biologiques (protéines, peptides, oligonucléotides...) par spectrométrie de masse [115].

Le principe de l'électronébulisation est présenté Figure 7. Une solution contenant les analytes est introduite dans un capillaire porté à un potentiel élevé (1 à 4 kV). Sous l'effet du champ électrique, le ménisque à l'extrémité du capillaire prend une forme conique (cône de Taylor) et le liquide est vaporisé sous la forme de fines gouttelettes chargées (électronébulisation). Un gaz inerte (azote) coaxial chauffé peut aussi permettre une aide à la nébulisation et à la désolvatation. Ainsi, l'action conjointe de la chaleur et du flux de gaz conduit à l'évaporation progressive du solvant des gouttelettes réduisant ainsi leur volume. Lorsque le volume des gouttelettes atteint la limite de Rayleigh, c'est-à-dire au moment où les forces de répulsions électrostatiques sont égales aux forces de tension de surfaces, on assiste à une fission Coulombienne et à la formation de gouttelettes plus petites. Par des processus de désolvatation et de fission Coulombienne consécutifs, les ions présents dans ces nanogouttelettes sont transformés en ions en phase gazeuse.

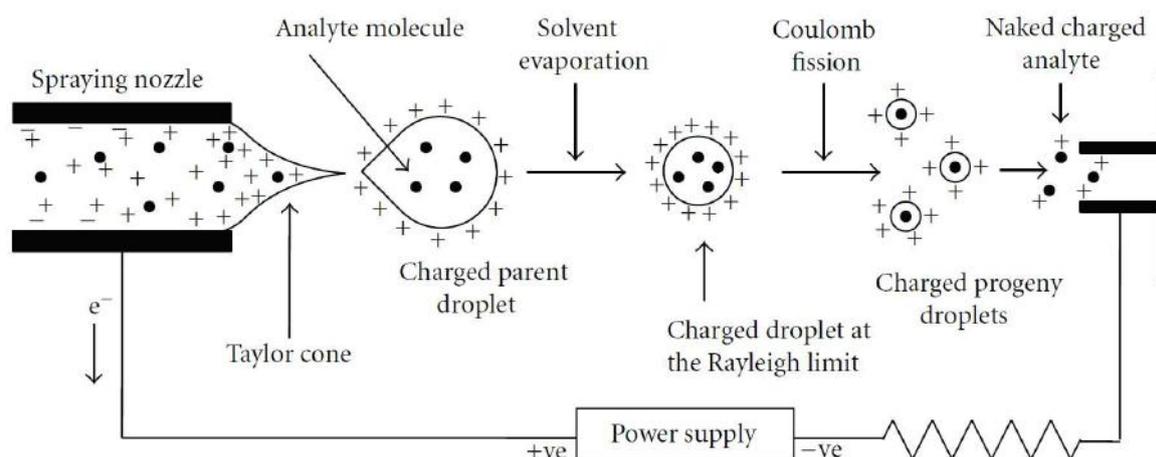


Figure 7 : Schéma représentant le procédé d'ionisation par électronébulisation. D'après Banerjee *et al.* [118]

Ce procédé d'ionisation présente la particularité de produire des ions multichargés conduisant, dans le cas de macromolécules, à la formation d'ions dont la distribution des états de charges se situe à de plus faibles valeurs de m/z [119]. Cela présente l'avantage de rendre l'analyse de molécules de grande taille compatible à des analyseurs ayant une gamme de masse limitée tels que les analyseurs quadripolaires [120]. Les spectres MS résultants d'une ionisation ESI sont caractérisés par une enveloppe de pics (pseudo Gaussienne) ayant une distribution en forme de cloche où chaque pic représente un état de charge de l'analyte. Une déconvolution

du spectre de masse est alors nécessaire pour déterminer la masse moléculaire à partir des différents états de charge de la molécule analysée. Le calcul de la masse peut se faire manuellement à partir des formules mathématiques présentées Figure 8 ou à l'aide d'un logiciel de retraitement de données.

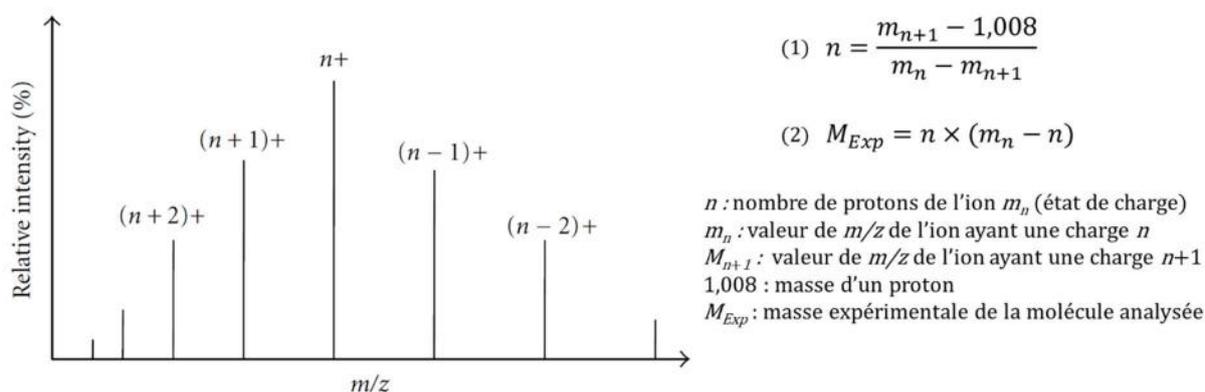


Figure 8 : Schéma représentant la distribution des états de charges d'un spectre MS obtenue en ESI. Les équations (1) et (2) décrivent les calculs permettant de déterminer la masse expérimentale d'une molécule en l'absence de déconvolution. D'après Banerjee *et al.* [118]

Les protéines contiennent de nombreux groupements basiques qui peuvent être protonés, c'est la raison pour laquelle une différence de potentiel positive est généralement appliquée entre le capillaire et l'orifice d'entrée du spectromètre de masse pour l'analyse de ces molécules (mode d'ionisation positif). L'ionisation d'une protéine (et sa distribution d'état de charge) va dépendre de sa séquence en acides aminés et de sa structure. Certains paramètres peuvent également influencer le procédé d'ionisation ESI tels que le pH du solvant, la présence et le type de sels ou des contaminants [121]. L'ESI est un procédé d'ionisation doux qui s'effectue à pression atmosphérique limitant la fragmentation des ions en phase gazeuse et permettant la conservation des liaisons non-covalentes pour l'investigation de complexes protéiques natifs [122].

L'un des avantages majeurs des sources ESI est la possibilité de couplage avec des systèmes de séparations tel que la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire expliquant l'énorme succès de cette source d'ionisation pour l'étude des protéines. En revanche, l'un des inconvénients est l'analyse des échantillons très faiblement concentrés. Des sources d'ionisation *nanospray* (ou nanoESI) fonctionnant à des débits de l'ordre de la dizaine de

nanolitres par minute ont donc été développées pour l'analyse de ces derniers [121]. Ce type de source présente également des avantages pour les études structurales de protéines en conditions natives (voir partie 2.3.2). La faible taille des orifices des capillaires *nanospray* (1-10 μm) permet une meilleure dispersion du liquide en nano-gouttelettes avec un ratio surface/volume plus favorable qu'en *electrospray* permettant des conditions de désolvation plus douces pour les études structurales de protéines par spectrométrie de masse native [123]. Par ailleurs, les sources *nanospray* fournissent des facteurs de réponse plus homogènes et présentent une meilleure tolérance aux sels et tampons utilisés en MS native [124,125]

ii. La désorption/ionisation laser assistée par matrice

La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) est la seconde méthode d'ionisation douce utilisée pour l'analyse par spectrométrie de masse des molécules biologiques (peptides et protéines). Le principe des sources MALDI est basé sur la co-cristallisation d'un échantillon avec une matrice organique sur une plaque cible en métal puis par l'irradiation du « spot » matrice/échantillon par un laser pulsé. La longueur d'onde du laser doit être compatible avec la longueur d'onde d'adsorption de l'énergie par la matrice. L'énergie générée par le laser est essentiellement absorbée sous forme de chaleur par les molécules de la matrice (en excès par rapport aux analytes) permettant aux macromolécules telles que les protéines de demeurer intactes. Un gaz dense est alors formé par sublimation de la matrice conduisant à la désorption en phase gazeuse des analytes et des molécules excitées de matrice. Les analytes sont alors ionisés via un transfert de protons provenant des molécules de la matrice. Les molécules ionisées par MALDI acceptent en général un seul proton générant ainsi des ions mono-chargés. Cela a pour conséquence de faciliter l'interprétation des spectres et l'identification de protéines mais limite la compatibilité de l'ionisation MALDI avec certains analyseurs. En raison d'une gamme de masse théoriquement illimitée, ce sont les analyseurs à temps de vol qui sont le plus souvent associés à ce type de source [119].

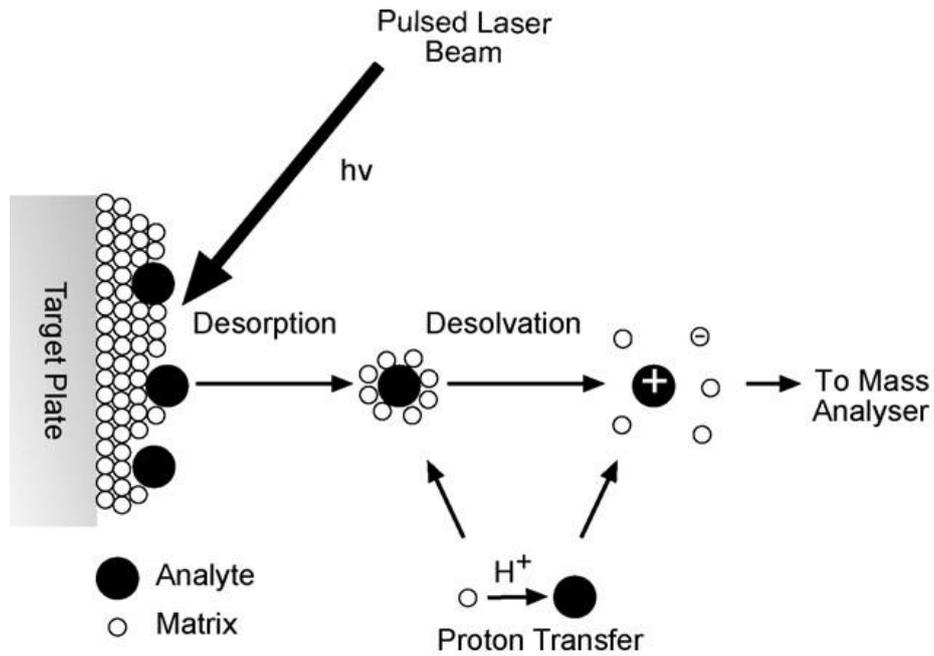


Figure 9 : Schéma représentant le procédé d'ionisation par MALDI. D'après Kicman *et al.* [126]

Le choix de la matrice va dépendre du mode d'ionisation (positif ou négatif) et de la nature des échantillons. Les matrices de choix pour l'analyse des protéines et des peptides sont respectivement l'acide sinapique et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique [127].

Les principaux avantages des sources MALDI sont une vitesse élevée d'exécution permettant un haut débit d'analyse, des spectres facilement interprétables (ions mono-chargés), la possibilité de refaire une analyse des échantillons dans le temps (stabilité des cristaux) et un impact plus modéré d'éventuels contaminants présents dans les échantillons. Cependant, les sources MALDI peuvent rencontrer des limites en termes de reproductibilité en raison de co-cristallisations parfois inégales et du lieu d'impact du laser sur la « cible » qui peuvent significativement altérer la qualité des spectres. La co-cristallisation des échantillons avec une matrice organique rend l'analyse native de protéine impossible malgré quelques exemples restreints existant dans la littérature [128,129].

Les sources MALDI sont essentiellement utilisées en protéomique pour le séquençage des protéines et l'identification de protéines dans des mélanges complexes.

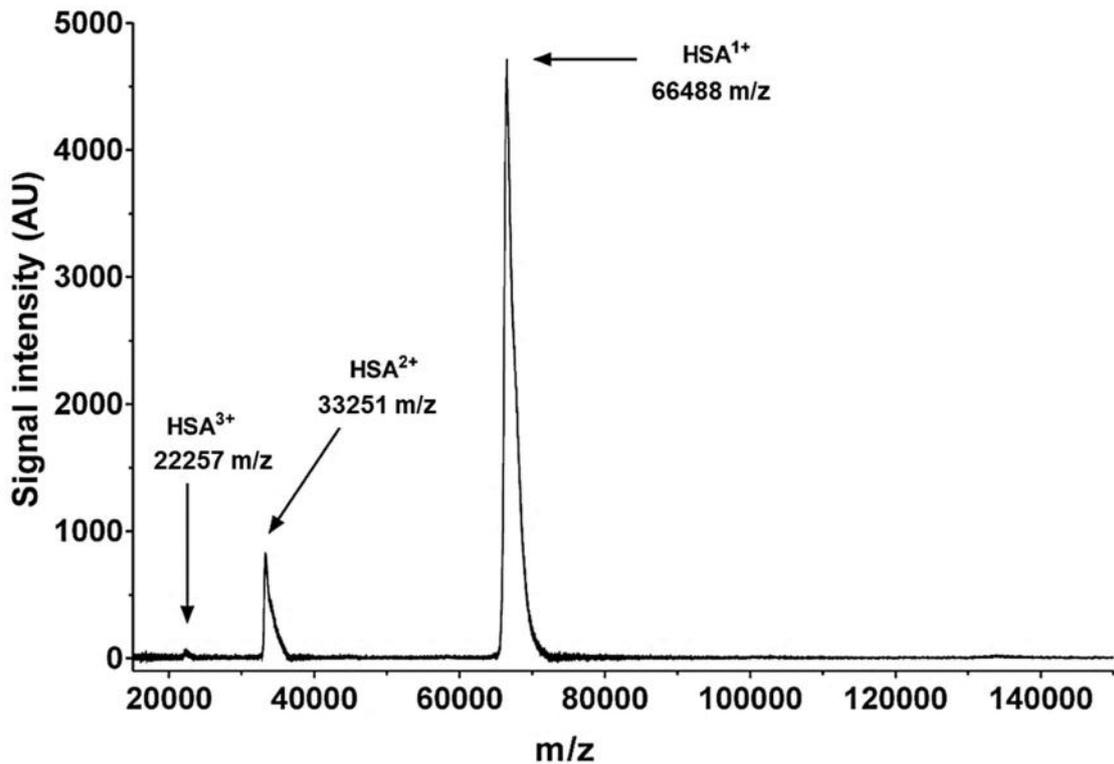


Figure 10 : Spectre de masse de l'albumine humaine obtenu par MALDI-TOF. D'après Bagyas *et al.* [130]

II. Les analyseurs

Après leur passage dans la source d'ionisation, les molécules ionisées sont dirigées vers un analyseur sous l'action combinée de champs électriques et de gradients de pression. L'analyseur a pour fonction de séparer les ions selon leur rapport m/z . Il existe plusieurs types d'analyseurs dont les principes de séparation des ions sont basés sur des mécanismes physiques différents. Les analyseurs les plus couramment utilisés pour l'analyse de protéines sont les analyseurs quadripolaires (Q), à temps de vol (TOF : *Time of Flight*) et les trappes ioniques ou orbitales.

Chaque analyseur possède des caractéristiques et des performances analytiques spécifiques qui peuvent être définies, de manière générale, par les paramètres suivants :

La gamme de rapport m/z , correspondant aux limites minimales et maximales de mesure des rapports m/z par l'analyseur.

La résolution, correspondant à la capacité de l'analyseur à distinguer les signaux de deux ions ayant des masses m et $m + \delta m$, et étant exprimée selon la formule $R_{10\%} = m/\delta m$. Il est admis

que les pics de deux ions sont résolus à 10 % de l'intensité du pic le plus faible, on parle alors de résolution à 10 %.

La sensibilité, correspondant à la quantité d'échantillon nécessaire pour détecter un signal (interprétable) dans le spectre de masse. Ce paramètre est déterminé par la comparaison de l'intensité du pic détecté et l'intensité du bruit de fond (intensité du signal autour du pic d'intérêt ; rapport signal/bruit supérieur à 3).

La vitesse d'analyse, correspondant au temps que va mettre l'analyseur à établir un spectre pour une gamme de m/z donnée (Ex : quelques millisecondes avec un quadripôle et une dizaine de microsecondes avec un analyseur à temps de vol).

La précision, correspondant à la capacité à mesurer une masse la plus proche possible de la masse théorique de la molécule analysée. La précision de masse s'exprime le plus souvent en « partie par million » (ppm).

Les spectromètres de masses peuvent être constitués de plusieurs analyseurs couplés pour obtenir des appareils hybrides de type Q-TOF ou TOF-TOF (pour ne citer qu'eux). Ces appareils hybrides sont très utilisés pour la caractérisation des protéines.

i. Les analyseurs quadripolaires

L'analyseur quadripolaire fut développé dans les années 1950 par Wolfgang Paul, lauréat du prix Nobel de physique en 1989 [131]. Le principe de cet analyseur à balayage est basé sur la stabilité des trajectoires des ions dans le quadripôle en fonction des tensions qui y sont appliquées pour les séparer selon leur rapport m/z . Un quadripôle est composé de quatre cylindres parallèles reliés électriquement deux à deux. Les deux paires de barres sont de polarité opposée, ce qui forme un champ électrique à deux dimensions. L'application simultanée d'une tension continue et d'une tension radiofréquence impose aux ions qui passent entre les cylindres un chemin oscillant (Figure 11). A titre d'exemple, un ion chargé positivement transféré de la source d'ionisation vers le quadripôle, va se diriger vers la barre chargée négativement. Lorsque la polarité des barres change, l'ion change de direction avant de toucher la barre subissant alors une trajectoire oscillante complexe. Pour des valeurs précises de tension et de radio fréquence, seuls les ions avec un rapport m/z donné peuvent atteindre l'extrémité du quadripôle et se diriger vers le détecteur. Le champ électrique créé

dans l'analyseur agit donc comme un filtre de masse ne laissant passer que les ions ayant un certain rapport m/z . Les ions ayant des m/z différents entrent en collision avec les électrodes et sont neutralisés. Il s'agit d'une description simplifiée du fonctionnement d'un analyseur quadripolaire et la trajectoire oscillante des ions à travers le quadripôle obéit à une équation différentielle complexe du second ordre : l'équation de Mathieu [128].

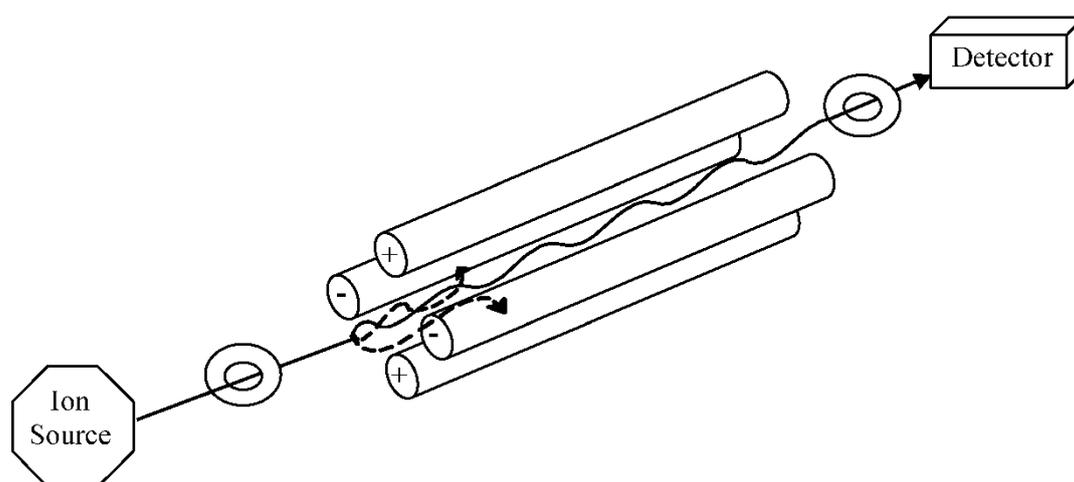


Figure 11 : Schéma représentant le principe de séparations des ions dans un analyseur quadripolaire. D'après El-Aneed *et al.* [128].

Les analyseurs quadripolaires comptent parmi les analyseurs les plus communs en raison de leur faible coût, de leur taille réduite et de leur mode de fonctionnement continu parfaitement compatible avec des sources d'ionisation par infusion comme l'électronébulisation, et donc compatibles avec des systèmes de séparations chromatographiques. Pour l'analyse de protéines, les principaux inconvénients sont une faible sensibilité, une précision de masse et une gamme m/z limitées, même si les quadripôles les plus récents ont la capacité de transmettre des ions ayant une valeur m/z plus élevée ($> m/z$ 10000).

Les analyseurs quadripolaires sont très utilisés en spectrométrie de masse en tandem (voir partie 2.2.3), en configuration triple quadripôle ou en étant associé à un analyseur ayant des caractéristiques et des performances complémentaires tels que les analyseurs à temps de vol (configuration Q-TOF). Dans ce type de configurations, le quadripôle peut être utilisé comme guide d'ions ou pour la fragmentation des molécules [132].

ii. Les analyseurs à temps de vol

Le principe de séparation des analyseurs à temps de vol (TOF) fut décrit dès le milieu du vingtième siècle et consiste à mesurer le temps que mettent des ions à parcourir une distance après avoir été accélérés par un champ électrique constant [133]. Un analyseur TOF est donc constitué d'une première zone où les ions sont accélérés par un champ électrique à potentiel élevé et d'une seconde zone où règne une basse pression et libre de tout champ électrique, le tube de vol, à travers lequel les ions vont migrer jusqu'au détecteur. Le temps de vol des ions à travers le tube de vol va permettre de déterminer leur rapport m/z selon l'équation suivante [126]:

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

t= temps de vol
L=longueur du tube de vol
m=masse de l'ion
V=potentiel d'accélération
z=charge de l'ion
e=charge de l'électron

Concrètement, si deux ions A1 et A2 sont formés au même moment avec la même charge mais avec des masses $m_1 < m_2$, alors A1 atteindra le détecteur avant A2. Les analyseurs TOF présentent la particularité et l'avantage de voir tous les ions formés atteindre le détecteur (contrairement aux analyseurs quadripolaires) et de disposer théoriquement d'une gamme m/z illimitée. Ils possèdent de plus, la capacité de mesurer simultanément et avec précision la masse des ions sur une large gamme de masse. La longueur du tube de vol d'un analyseur TOF est un paramètre important de performance, un tube long (et donc un temps de vol prolongé) permet de meilleures performances en termes de résolution et de précision de masse.

En théorie, des ions ayant un rapport m/z identique acquièrent la même énergie cinétique à l'entrée du tube de vol et atteignent le détecteur avec le même temps de vol. En réalité, l'énergie cinétique acquise peut être légèrement différente et la dispersion des ions (effet de l'énergie donnée et des irrégularités de la cible et du dépôt de l'échantillon dans la matrice) à l'entrée de l'analyseur peut conduire à une diminution de la résolution. Cette dispersion des ions peut être compensée par l'introduction de systèmes tels que l'extraction retardée ou le reflectron qui permettent la refocalisation d'ions présentant un même rapport m/z [134]. L'extraction retardée, utilisée pour les analyses MALDI-TOF, vise à introduire un délai entre la

formation des ions et leur extraction de la source. Un potentiel plus faible est appliqué pendant quelques centaines de nanosecondes après l'ionisation pour permettre une focalisation spatiale des ions de même m/z avant l'entrée dans l'analyseur et ainsi augmenter la résolution de l'analyse. Le reflectron est un dispositif consistant à appliquer un réflecteur électrostatique à l'extrémité de l'analyseur. Les ions avec une énergie cinétique élevée pénètrent plus profondément dans le réflecteur que les ions de même m/z mais ayant une énergie cinétique plus faible. Ces ions sont alors focalisés et atteignent en même temps le détecteur (Figure 12). Ce système permet d'augmenter la résolution de l'analyseur mais également la précision de masse [135].

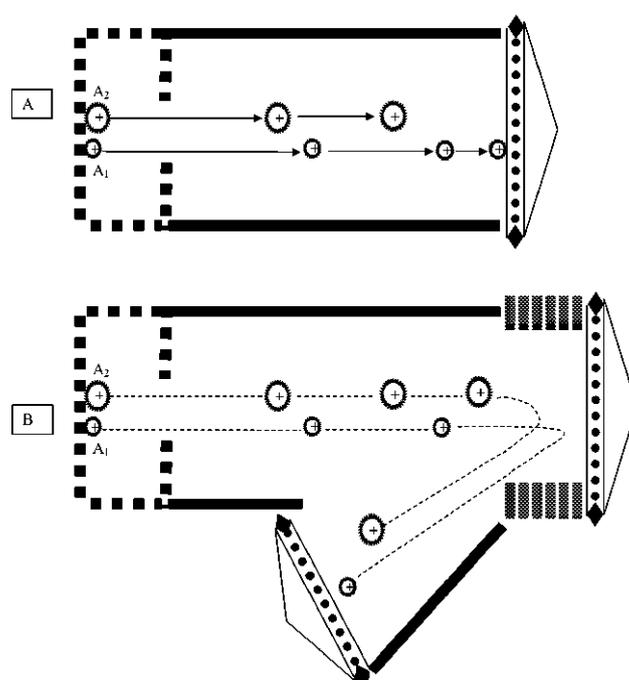


Figure 12 : Schémas représentant un analyseur à temps de vol linéaire (panel A) et un analyseur à temps de vol avec réflectron. D'après El-Aneed *et al.* [128].

Les sources MALDI sont particulièrement adaptées aux analyseurs TOF car l'injection pulsée d'ions est compatible avec une mesure de temps d'une part et la gamme de m/z très étendue de ce type d'analyseur convient parfaitement à l'analyse des ions mono-chargés d'autre part. Le couplage d'un analyseur TOF avec une source d'ionisation à flux continu comme l'électronébulisation est également possible. Dans ce cas, le flux continu d'ions est pulsé à haute fréquence dans une direction perpendiculaire à leur direction initiale pour que leur

temps de vol soit mesuré. L'injection orthogonale d'ions pulsés permet également de limiter la dispersion transversale en énergie cinétique ce qui permet d'obtenir une meilleure résolution.

Les analyseurs TOF offrent d'excellentes performances en termes de résolution et de sensibilité, ils permettent également une vitesse d'analyse élevée puisque la durée d'un cycle d'analyse ne dépend que du temps de vol des ions les plus lourds (dizaine de μsec). Ces avantages expliquent pourquoi les analyseurs TOF sont souvent les analyseurs finaux des spectromètres de masse hybrides.

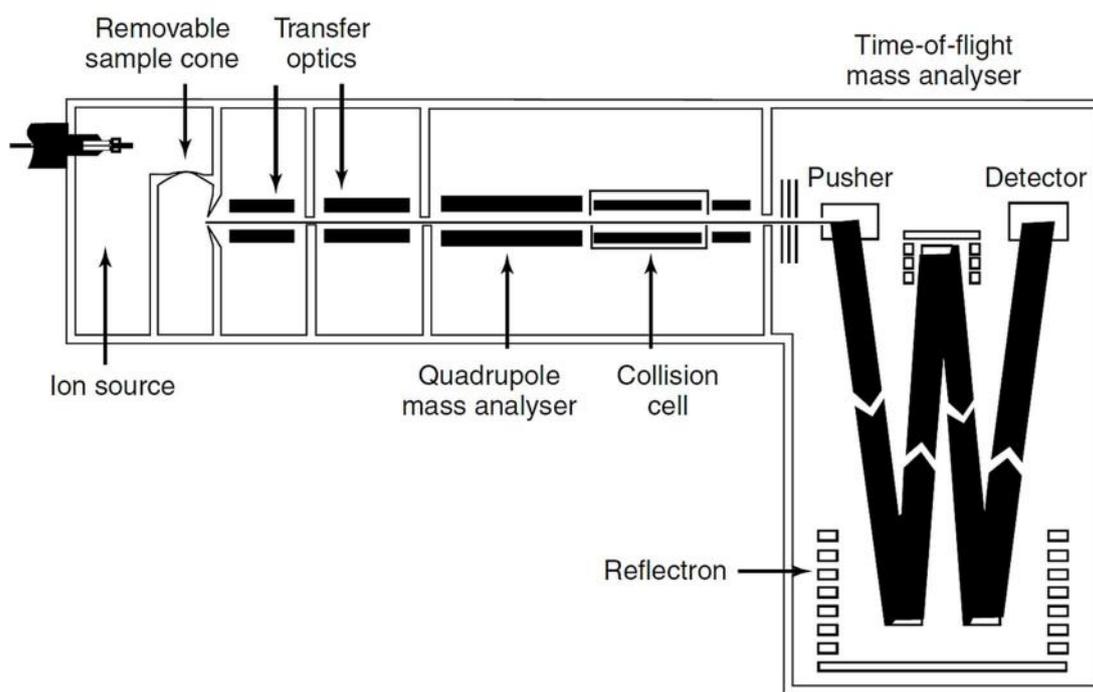


Figure 13 : Schéma représentant la structure d'un spectromètre de masse hybride haute résolution de type Q-TOF (société Waters).

iii. Les analyseurs à trappes ionique et orbitale

Les trappes ioniques sont des analogues tridimensionnels des analyseurs quadripolaires linéaires, et sont composées d'une électrode centrale circulaire (électrode annulaire) recouverte de deux calottes hémisphériques (*End-cap electrodes*) générant un champ électrique à trois dimensions (Figure 14). Contrairement aux analyseurs quadripolaires linéaires, une trappe ionique accumule à l'intérieur de sa zone de champ tous les ions d'une gamme m/z donnée. Les ions sont piégés grâce à un potentiel de type radiofréquence (RF) appliqué sur l'électrode annulaire sur une période limitée, et observent une trajectoire en forme

de 8 à l'intérieur du piège (courbe de Lissajous). La stabilité des ions dans le piège va dépendre de la radiofréquence appliquée sur l'électrode annulaire. Une augmentation de l'amplitude du potentiel RF déstabilise la trajectoire des ions conduisant à leur éjection séquentielle à travers les *end-cap electrodes* (la variation de la RF joue aussi sur l'expulsion des ions). Les ions éjectés atteignent le détecteur pour déterminer leur rapport m/z en fonction de la radiofréquence appliquée au moment de leur éjection. Comme pour les quadripôles linéaires, il s'agit d'une description simplifiée du fonctionnement d'un piège ionique dont la trajectoire des ions est basée sur l'équation de Mathieu, mais avec une dimension supplémentaire [126]. Les trappes ioniques ont une résolution et une gamme m/z similaires aux quadripôles linéaires, mais leur capacité de piégeage des ions permet d'augmenter leur sensibilité. Ces analyseurs sont également très utilisés pour la fragmentation des ions en raison de leur capacité de piégeage, et en particulier selon un mode descendant (MSn).

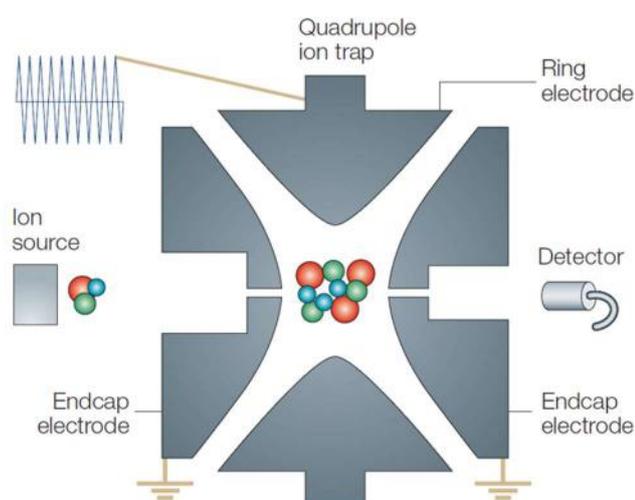


Figure 14 : Schémas représentant la structure et le fonctionnement d'une trappe ionique. D'après Glish *et al* [132].

La trappe orbitale fut développée à la fin des années 1990 par Alexander Makarov [136] et est constituée de deux électrodes coaxiales. L'électrode extérieure a la forme de deux cloches identiques séparées par un espace étroit et l'électrode centrale à la forme d'un fuseau. Des tensions continues sont appliquées aux électrodes alors que les ions sont injectés tangentiellement par l'interstice central (Figure 15). La géométrie particulière des électrodes et les tensions continues appliquées entre les électrodes génèrent un champ électrostatique dit « quadrilogarithmique ». Les ions suivent alors une trajectoire circulaire autour de l'électrode

centrale tout en oscillant latéralement suivant l'axe z. Les fréquences de ces oscillations sinusoïdales sont dépendantes du rapport m/z des ions en rotation dans la trappe orbitale. Le courant induit par les ions est mesuré de manière différentielle entre les deux moitiés de l'électrode externe. Ce courant est converti en m/z et en intensité par transformée de Fourier, produisant ainsi un spectre de masse. La résolution de l'analyse est directement dépendante du temps d'acquisition du courant induit par les ions. Les trappes orbitales sont des analyseurs fournissant une très haute résolution pour l'identification de protéines intactes ou de peptides en protéomique [137].

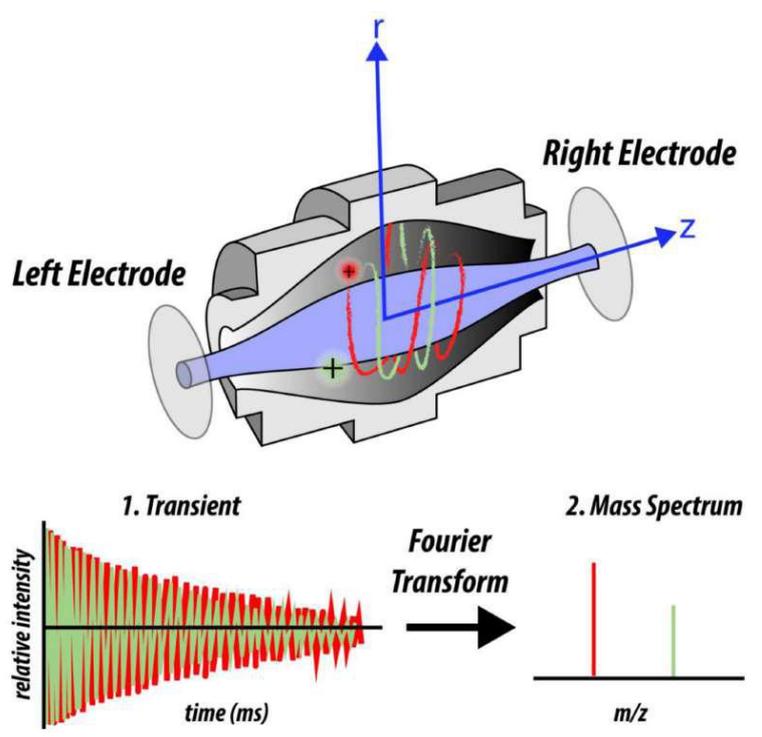


Figure 15 : Schémas représentant la structure et le fonctionnement d'une trappe orbitale. D'après Savaryn *et al.* [137]

III. La spectrométrie de masse en tandem

Au-delà du développement de nouvelles sources d'ionisation et d'analyseurs toujours plus performants, l'apparition de la spectrométrie en tandem (ou MS/MS) a apporté une contribution majeure à la caractérisation structurale des macromolécules biologiques. Comme son nom l'indique, la spectrométrie de masse en tandem implique l'utilisation de deux ou plusieurs analyseurs dans diverses configurations. Le principe de la MS/MS repose sur la sélection d'un ion précurseur, de valeur m/z donnée, par un premier analyseur (MS^1), suivie de

la dissociation (fragmentation) de cet ion puis l'analyse par un second analyseur des ions fragments générés (MS^2). L'analyse des ions fragments fournit des informations sur la structure de l'ion précurseur comme la séquence en acides aminés dans le cas de peptides.

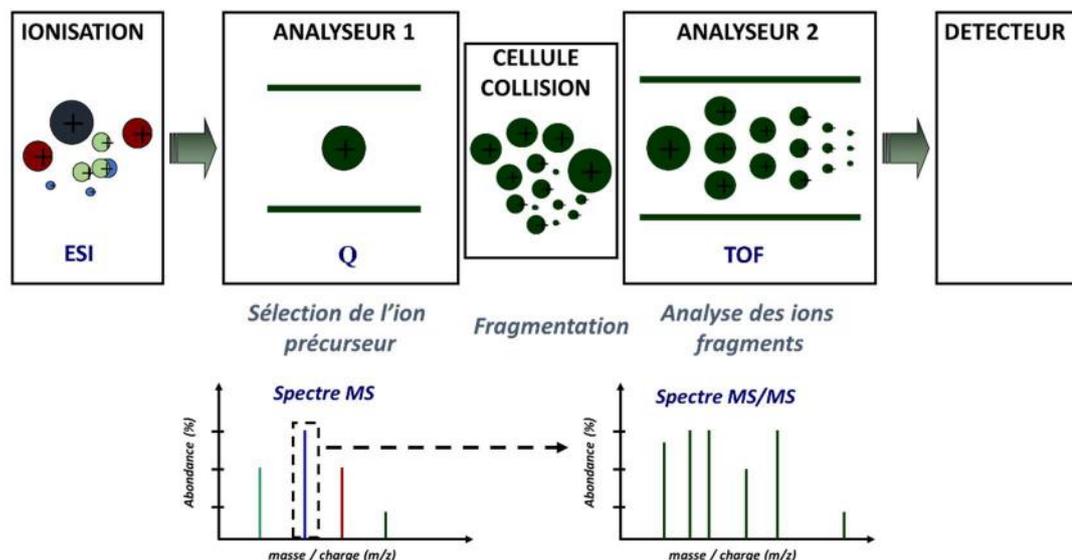


Figure 16 : Schéma simplifié de la structure et du fonctionnement d'un spectromètre de masse en tandem de type Q-TOF.

Il existe deux catégories de spectromètres de masse en tandem, ceux réalisant la MS/MS dans le temps et ceux réalisant la MS/MS dans l'espace. Les instruments réalisant la MS/MS dans le temps sont généralement des analyseurs à piégeage d'ions de type trappe ionique. Dans ce cas, les étapes de sélection et de fragmentation de l'ion précurseur puis l'analyse des ions fragments se font dans le même analyseur, mais sont séparées dans le temps. Ce type d'instrument présente l'avantage de pouvoir effectuer plusieurs cycles de MS/MS, puisque des ions fragments peuvent être sélectionnés dans la trappe ionique pour une nouvelle fragmentation, on parle alors de MS^n . Ils permettent également une MS/MS plus efficace puisque les ions fragments n'ont pas à être transférés d'un analyseur à l'autre et le temps de fragmentation peut être plus long pour une meilleure dissociation des ions parents.

La MS/MS dans l'espace concerne le plus souvent des analyseurs quadripolaires. Dans ce cas, les étapes de sélection et de fragmentation de l'ion précurseur puis l'analyse des ions fragments sont séparées dans l'espace et se font dans des analyseurs différents. Les analyseurs peuvent être identiques, c'est le cas des triples quadripôles, ou différents, dans le cas des spectromètres de masse hybrides de type Q-TOF. Le premier analyseur est alors un quadripôle

qui va servir de filtre de masse pour sélectionner l'ion précurseur, et le second analyseur est un TOF pour une analyse à haute résolution des ions fragments générés. Une cellule de collision est située entre les deux analyseurs pour la fragmentation de l'ion précurseur. Cette cellule de collision est souvent un analyseur quadripolaire dans lequel circule un gaz inerte (azote, argon, etc...) et travaillant en mode « *RF-only* » pour une focalisation/transmission efficace des ions. Ce type de spectromètre de masse hybride à haute résolution est très utilisé pour la caractérisation des protéines, en raison de la complémentarité entre les analyseurs quadripolaires et à temps de vol, et de la rapidité des cycles de MS/MS réalisés [132].

i. La fragmentation des ions

La fragmentation des ions permet de fournir des informations importantes sur la structure des molécules, c'est le cas des protéines et des peptides dont la fragmentation permet la caractérisation de la séquence en amino-acides ainsi que le type et les sites de certaines modifications post-traductionnelles. La fragmentation est obtenue par l'augmentation de l'énergie interne d'un ion précurseur conduisant à sa dissociation et à la formation d'ions fragments.

La caractérisation de la structure d'un peptide (ou d'une protéine) par spectrométrie de masse en tandem implique donc la dissociation de ce dernier en fragments de plus petites masses. La nomenclature décrivant les types de fragments générés par la rupture des différentes liaisons covalentes du squelette est présentée dans la figure 17 [138,139]. Lors de la fragmentation, le clivage du squelette peptidique peut intervenir au niveau des liaisons suivantes : C_{α} -C, C-N ou N- C_{α} . Six types de fragments sont alors formés, les séries a_n , b_n et c_n si la charge positive se situe sur la partie N-terminale du peptide, ou les séries x_n , y_n et z_n si la charge positive se situe sur la partie C-terminale. L'indice n correspond au nombre d'acides aminés contenus dans un fragment [127].

Les profils de fragmentation vont dépendre d'un certain nombre de facteurs tels que la séquence peptidique, l'état de charge, le type d'activation induisant la dissociation ou le type d'instrument utilisé.

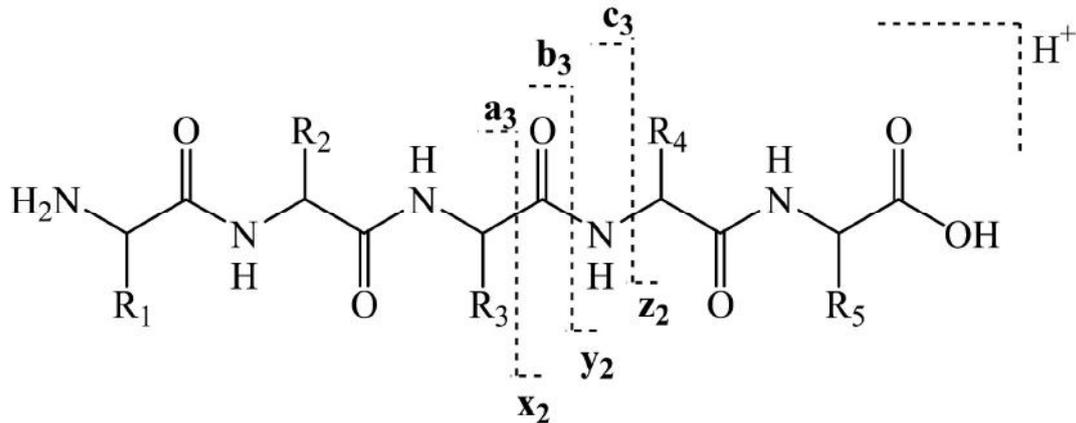


Figure 17 : Nomenclature des ions issus de la fragmentation du squelette peptidique par spectrométrie de masse en tandem. D'après Wysocki *et al.* [140]

En principe, la différence de masse entre les ions fragments consécutifs d'une même série permet de déterminer l'identité des acides aminés et donc la séquence du peptide correspondant à l'ion précurseur. Pour les acides aminés ayant une masse très proche comme la lysine ($M_{\text{Lys}}=128,09497$ Da) et la glutamine ($M_{\text{Glu}}=128,05858$ Da), l'utilisation d'un spectromètre de masse haute résolution est indispensable. Dans le cas d'isomères comme l'isoleucine et la leucine, la caractérisation nécessite des stratégies alternatives comme la fragmentation à haute énergie (fragmentation des groupements radicaux) ou la chromatographie. Les analyses MS/MS sont également particulièrement efficaces pour caractériser des modifications post-traductionnelles. Les variations de masses observées entre deux ions fragments sur les spectres MS/MS permettent de déterminer le type et les sites de modifications sur les peptides. Une variation de +16 Da sur une méthionine sera, par exemple, caractéristique d'une oxydation en méthionine sulfoxyde.

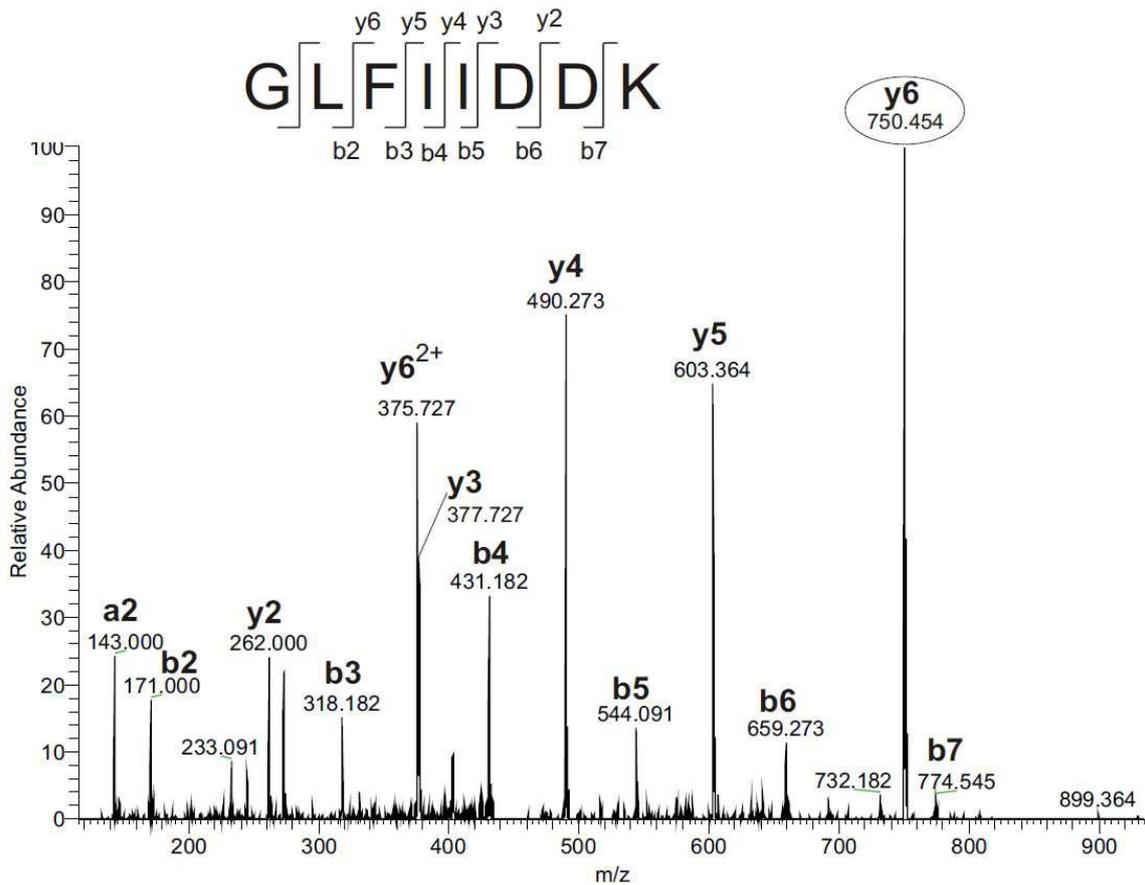


Figure 18 : Spectre MS/MS d'un peptide provenant de la peroxyrédoxine. La fragmentation du peptide montre des séries cohérentes d'ions y (y2-y6) et b (b2-b7) avec des différences de masse correspondant à des acides aminés spécifiques. D'après Olsen et al. (Olsen 2008)

L'interprétation de spectres MS/MS est souvent complexe et chronophage, mais la nature prévisible de la fragmentation des peptides rend possible l'utilisation d'algorithmes pour une interprétation assistée par ordinateur. Les spectres MS/MS expérimentaux sont comparés à des bases de données contenant des spectres MS/MS prédits à partir de la digestion *in silico* de protéines dont la séquence est connue permettant d'établir l'identité des protéines analysées. Si ces logiciels permettent un gain de temps significatif, ils peuvent générer un certain nombre de faux positifs et de faux négatifs dans l'attribution des séquences et doivent être utilisés avec précaution.

Les protéines thérapeutiques étant souvent des glycoprotéines, il est important de souligner que la spectrométrie de masse en tandem est également utilisée pour la caractérisation de la structure des glycanes. Dans ce cas, ce sont les chaînes oligosaccharidiques qui sont

fragmentées qui apportent des informations sur la séquence primaire en monosaccharides ou sur la position des points de branchement.

ii. Les méthodes de dissociation

Le procédé de dissociation le plus largement répandu est basée sur la collision entre un ion et des molécules d'un gaz inerte, il s'agit de la dissociation induite par collision (ou CID : *Collision Induced Dissociation*). Lors de la collision, une partie de l'énergie cinétique de l'ion est convertie en énergie vibrationnelle qui se propage à travers les liaisons covalentes conduisant à son activation. Si l'énergie interne acquise par l'ion excède la barrière d'activation des liaisons covalentes, on observe une décomposition unimoléculaire de l'ion activé. Ce mode de fragmentation conduit le plus souvent au clivage de la fonction amide des liaisons peptidiques générant des ions b_n et y_n . Les gaz utilisés en CID sont généralement des gaz rares dont la nature peut affecter le rendement de la fragmentation, les gaz les plus lourds comme l'argon ou le xénon augmentant le rendement de fragmentation. En CID, les modifications stables telles que l'oxydation ou la déamidation sont conservées, permettant ainsi de déterminer avec précision leur localisation. Cependant, des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation ou la glycosylation sont plus labiles que les liaisons peptidiques, rendant leur caractérisation difficile avec ce mode de fragmentation [140].

Dans le cadre de la caractérisation de MPTs labiles, des modes de fragmentations alternatifs ont été développés tels que la dissociation par transfert (ETD) ou capture d'électrons (ECD). Ces méthodes sont particulièrement utiles pour la caractérisation de glycopeptides, notamment dans le cas des O-glycosylations qui ne présentent pas de séquences consensus claires. Le mode de fragmentation par transfert d'électron (ou ETD : *Electron Transfer Dissociation*) est basé sur le transfert d'un électron depuis un anion radicalaire tel que l'anthracène vers un cation multichargé. Ce type de fragmentation conduit au clivage des ponts disulfures et des liaisons N-C $_{\alpha}$ du squelette peptidique générant principalement des ions c_n et z_n . Dans le cas de peptides présentant une modification labile comme une phosphorylation, ce mode de fragmentation non ergodique permet d'obtenir des spectres MS/MS contenant des ions fragments porteurs du groupement phosphate ou d'autres modifications chimiques labiles. En revanche, les spectres obtenus en CID présenteront seulement des fragments correspondant à la perte de cette modification, comme la perte d'un acide phosphorique,

rendant difficile la localisation de la phosphorylation. Par ailleurs, l'ETD est particulièrement bien adaptée à la fragmentation d'espèces multi-protonées telles que des peptides de grande taille, voir des protéines entières [141,142].

La dissociation par capture d'électron (ECD : *Electron Capture Dissociation*) est un mode de fragmentation dont le mécanisme de dissociation des peptides est semblable à celui de l'ETD même si les spectres MS/MS générés peuvent être différents en raison de l'énergie plus importante apportée à la molécule en ECD. Ce type de dissociation est moins répandu que l'ETD puisqu'il nécessite généralement l'utilisation des spectromètres de masse à très haute résolution comme ceux à résonance cyclonique ionique [143]. L'utilisation combinée des modes de fragmentation CID et ETD est particulièrement adéquat pour la caractérisation des protéines thérapeutiques.

3. Les stratégies d'analyse de protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse constitue la stratégie la plus répandue pour la caractérisation des protéines thérapeutiques. Cela s'explique par les nombreuses dimensions de séparation et de caractérisation offertes par ces deux techniques dont les combinaisons peuvent se décliner sous de multiples formes. De plus, les analyses LC-MS peuvent être associées à des méthodes innovantes de préparation d'échantillon faisant intervenir des enzymes ou des réactions physico-chimiques, offrant ainsi d'innombrables applications pour l'étude de la structure des protéines.

I. Caractérisation de la structure primaire et des modifications post-traductionnelles des protéines

L'étape primordiale pour la caractérisation d'une protéine thérapeutique est l'étude de la structure primaire qui doit permettre de déterminer la séquence en acides aminés et d'identifier et/ou de localiser les modifications post-traductionnelles. Pour ce faire, il existe différentes stratégies analytiques à l'échelle de la protéine, des sous-unités protéiques ou des peptides, pouvant nécessiter l'utilisation d'enzymes protéolytiques et/ou faisant intervenir la spectrométrie de masse en tandem. Une nomenclature fut élaborée pour désigner ces différentes approches, les termes *top-down*, *middle-up/down* et *bottom-up* correspondent

respectivement à l'analyse au niveau de la protéine entière, des sous-unités protéiques et des peptides (Figure 19) [144]. Dans la majorité des cas, des spectromètres de masse constitués d'analyseurs à haute résolution de type Q-TOF ou des trappes orbitales sont associés à un système chromatographique pour la mise en œuvre de ces approches.

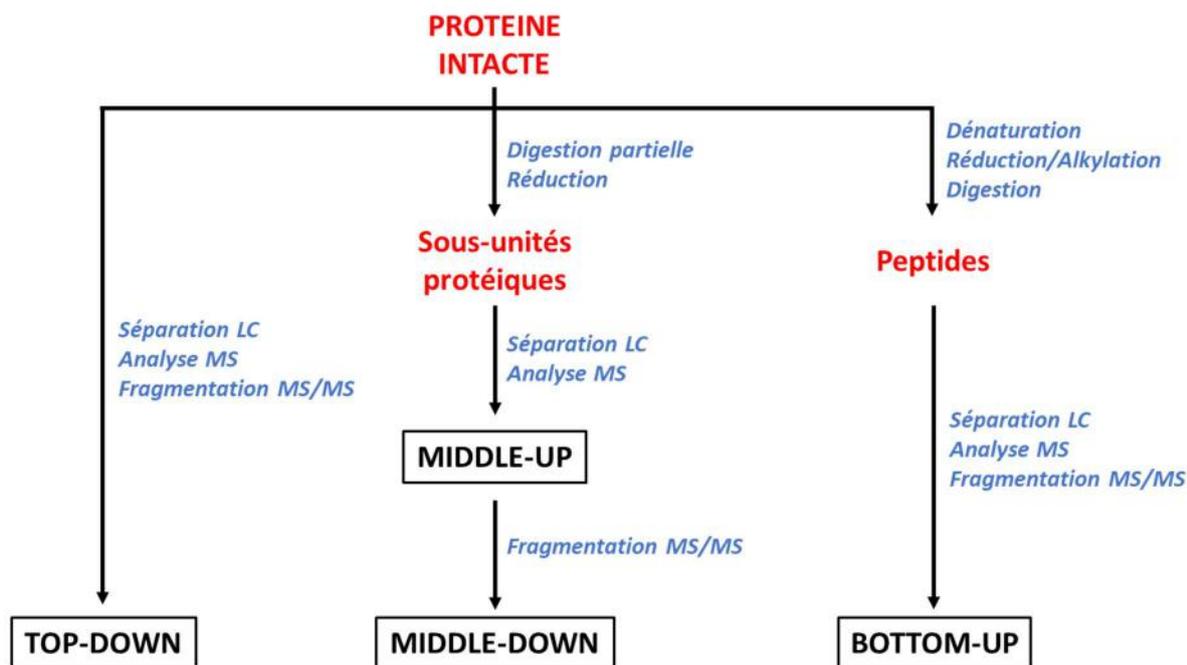


Figure 19 : Schéma représentant les différentes stratégies d'analyse pour la caractérisation de protéines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

i. L'analyse de protéines entières

Les spectromètres de masse modernes rendent possible la mesure de masse précise de protéines entières de grande taille. La masse d'un anticorps mesurant environ 150 kDa peut ainsi être déterminée avec une précision de l'ordre de 10 à 100 ppm (soit 1,5 à 15 Da) [145]. Il s'agit alors d'une des analyses les plus basiques, sans préparation d'échantillon, permettant de vérifier rapidement la conformité de la masse expérimentale observée par rapport à la masse théorique déduite de la séquence en acides aminés de la protéine d'intérêt. Cette analyse permet également d'évaluer la structure quaternaire (intégrité des ponts disulfures interchaînes) et l'hétérogénéité des protéines en termes de modifications post-traductionnelles. A l'échelle de la protéine, des glycoformes présentant des variations de masse de +146 Da ou +162 Da, caractéristiques d'hexoses comme le fucose et le galactose, sont facilement décelables avec un spectromètre de masse haute résolution fournissant une première

indication sur le profil de N-glycosylation [72]. C'est également le cas pour la détection de clivages d'acides aminés N/C-Terminaux ou pour vérifier le taux de conjugaison d'ADC (détermination du DAR) [70]. Certaines modifications induisant des variations de masse plus faibles comme l'oxydation de cystéines (+32 Da) peuvent également être détectées pour des protéines de taille moyenne comme l'albumine [146]. Si l'analyse de protéines intactes par RPC est très répandue, de plus en plus de méthodes chromatographiques natives telles que la SEC ou l'IEX sont couplées à la MS pour l'analyse de protéines intactes [147,148]. Au-delà des caractéristiques de séparations alternatives à la RPC, les conditions natives de ces méthodes permettent l'étude de la structure des protéines, de complexes protéiques non-covalents ou encore des interactions non-covalentes de protéines avec des composés tels que des ions, des hormones ou des médicaments [147,149,150].

L'analyse MS de protéines intactes peut être associée à de la fragmentation en phase gazeuse (MS/MS) pour obtenir des informations de séquence, on parle alors de l'approche analytique *top-down* [151]. Cette procédure présente l'avantage de ne recourir à aucune préparation d'échantillon réduisant le temps d'analyse et limitant l'apparition de modifications artéfactuelles liées à la préparation de l'échantillon comme l'oxydation ou la déamidation. La fragmentation par CID est peu utilisée en *top-down* en raison de son efficacité réduite pour la dissociation des ions multichargés de grande taille. Ce sont généralement les types de fragmentation *via* activation électronique comme l'ECD ou l'ETD qui sont privilégiés pour le séquençage de protéines intactes. Mais malgré les améliorations régulières de cette procédure, la fragmentation de protéines entières reste très difficile. Les liaisons peptidiques proches de ponts disulfures sont difficilement fragmentables et les liaisons non-covalentes des structures secondaires peuvent empêcher la dissociation malgré le transfert d'électron. A titre d'exemple, l'analyse *top-down* d'anticorps monoclonaux entiers n'utilisant que l'ETD ne permet des recouvrements de séquence que de l'ordre 15 à 30% des parties N et C-terminales [152,153]. Le développement de nouvelles méthodes d'activation, comme la photo-activation par infrarouge associée à l'ETD (AI-ETD : *Activated Ion-Electron Transfert Dissociation*), permettent d'augmenter le recouvrement de séquence d'anticorps intacts sans toutefois dépasser 60% et sans permettre de localiser les sites de glycosylations [154].

ii. L'analyse de sous-unités protéiques

Les limites de l'approche top-down pour l'analyse de protéines de grande taille, constituées de sous-unités, peuvent être contournées par l'application de procédures désignées par les termes *middle-up* ou *middle-down*. Le terme « *middle* » fait référence à une approche intermédiaire entre le *top-down* (protéine intacte) et le *bottom-up* (protéolyse complète de la protéine), au cours de laquelle est effectué une réduction des ponts disulfures inter-chaînes et/ou une protéolyse limitée, pour des fragments protéiques de 25 à 100 kDa. Lorsque seule la mesure de masse des fragments protéiques est effectuée, on parle d'approche *middle-up*, et lorsque les fragments protéiques subissent une dissociation MS/MS pour obtenir des informations de séquence, on parle d'approche *middle-down*. L'analyse de fragments de protéines peut également être désignée par le terme de carte protéique (ou « *protein mapping* »). Ces approches sont particulièrement populaires pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux. La réduction des ponts disulfures d'un anticorps permet de libérer les chaînes légères et lourdes d'environ 25 et 50 kDa qui sont plus facilement analysables que l'anticorps entier, mais c'est le clivage enzymatique des régions supérieures ou inférieures de la partie charnière (« *hinge* ») des anticorps qui a marqué l'essor de cette approche. Les régions encadrant la partie charnière d'un anticorps sont sensibles à la protéolyse limitée d'enzymes. La digestion contrôlée d'anticorps par la papaïne ou l'endoprotéase Lys-C va induire le clivage des chaînes lourdes dans la région supérieure du *hinge* générant des fragments Fc et Fab mesurant environ 50 kDa. L'action de la pepsine va induire le clivage des chaînes lourdes au niveau de la partie inférieure du *hinge*, générant un fragment F(ab')₂ d'environ 100 kDa et deux fragments Fc/2 de 25 kDa [155]. Si ces protéolyses limitées sont suivies d'une réduction des ponts disulfures, des fragments d'environ 25 kDa sont générés. L'inconvénient de cette approche est l'utilisation d'enzymes non-spécifiques nécessitant un contrôle rigoureux de la digestion et pouvant générer de nombreux fragments complexifiant l'interprétation des données. A partir des années 2010, la société Genovis commercialisa l'IdeS, une enzyme provenant de *Streptococcus pyogenes* et clivant spécifiquement, entre deux glycines, la partie inférieure de la région charnière des chaînes lourdes d'IgG. Cette enzyme, générant des fragments F(ab')₂ et Fc/2 homogènes avec un temps de digestion rapide (30 min) a participé à la démocratisation des approches *middle-up/down* [156,157]. Cette société développa par la suite d'autres enzymes clivant de manière spécifique la chaîne lourde dans la région supérieure

du *hinge* (IgdE) ou pour le clivage des glycanes (Endo S, Endoglycosidases de type S), fournissant une « boîte à outils » analytique complète pour la caractérisation des anticorps.

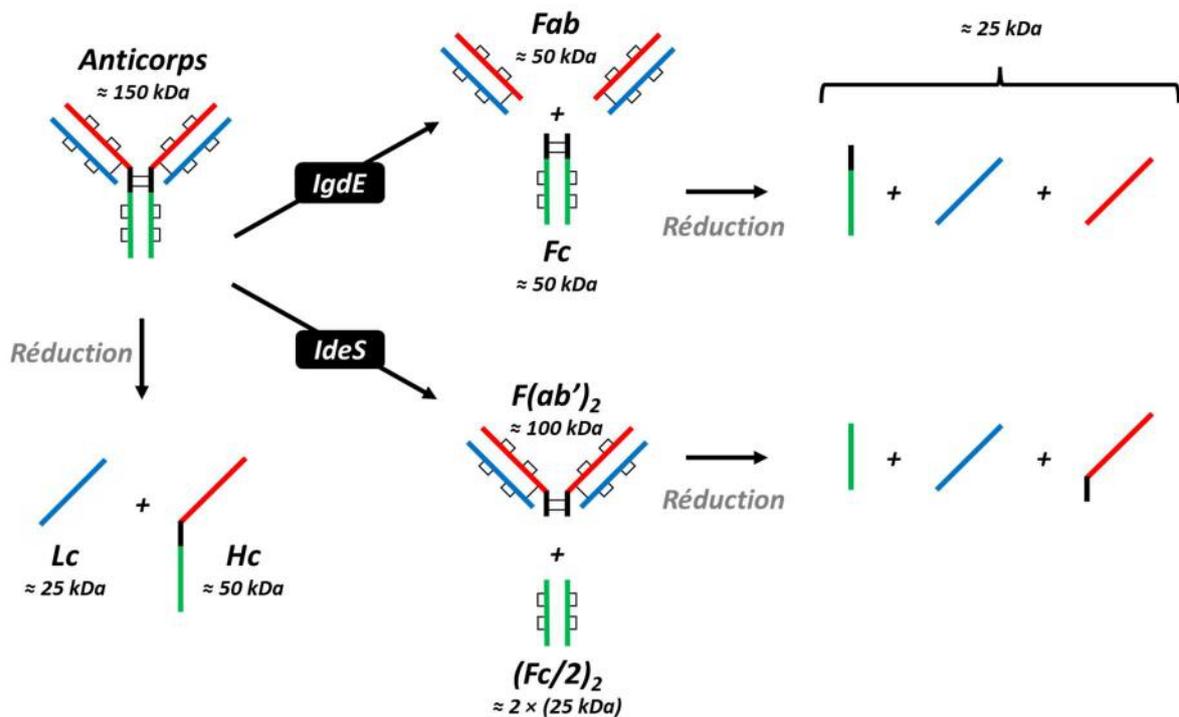


Figure 20 : Schéma représentant les différentes stratégies de préparation d'échantillons pour l'analyse *middle-up/down* d'anticorps. La chaîne légère (Lc) est représentée en bleu. Sur la chaîne lourde (Hc), les parties Fab, charnière et Fc sont représentées respectivement en rouge, en noir et en vert.

La taille réduite des fragments obtenus en *middle-up* permet de significativement améliorer la séparation chromatographique pour une quantification relative précise des formes natives *versus* modifiées et les spectromètres de masse les plus récents sont capables de fournir des spectres avec une résolution isotopique des fragments de ≈25 kDa générés, pour une identification optimale des protéoformes [158]. Cette procédure fut utilisée avec succès pour la caractérisation de plusieurs MPTs d'anticorps telles que la présence d'acides isoaspartiques en HIC [159], de succinimides et de déamidations en IEX [77] ou de formes glyquées et oxydées en RPC [55].

La dissociation en phase gazeuse de fragments protéiques de ≈25 kDa est beaucoup plus aisée que pour un anticorps entier, c'est la raison pour laquelle l'analyse *middle-down* d'anticorps monoclonaux a permis des gains très significatifs en termes de recouvrement de séquences. De plus, la combinaison de plusieurs méthodes d'activations, telles que l'ETD associée à une

méthode d'activation par collision à haute énergie (ETHcD : *Electron Transfer higher-energy collision induced Dissociation*), permet d'améliorer le séquençage des différents fragments d'anticorps comme les parties variables (CDRs) mais aussi la localisation de modifications post-traductionnelles comme les sites de glycosylation ou d'oxydation [55,158,160].

iii. L'analyse de peptides

Malgré les progrès constants des approches *top-down* et *middle-down*, la méthode de référence pour le séquençage des protéines reste l'approche *bottom-up* correspondant à une analyse des protéines au niveau peptidique. Cette méthode consiste à générer des peptides par protéolyse enzymatique des protéines d'intérêts, le plus souvent après des étapes de dénaturation et de réduction/alkylation des ponts disulfures. Cette analyse peut également être désignée par le terme carte peptidique (« *peptide mapping* »). L'approche *bottom-up* présente plusieurs avantages, d'un point de vue chromatographique, la RPC permet une analyse des peptides avec une haute résolution, une forte capacité de pics et une grande variété de facteurs de rétention correspondant aux diverses propriétés physico-chimiques des peptides (masse moléculaire, polarité...). Concernant l'analyse MS, les spectromètres de masse haute résolution permettent de déterminer la masse mono-isotopique de chaque peptide avec une erreur inférieure à 5 ppm. Ces derniers peuvent alors être précisément identifiés à partir de banques de données répertoriant des séquences connues de protéines. Pour une identification plus poussée, des informations sur la séquence en acides aminés des peptides sont obtenues par implémentation de la spectrométrie de masse en tandem. Un ion correspondant à un peptide est sélectionné puis dissocié en phase gazeuse. L'analyse des ions fragments générés apportant des informations sur la séquence du peptide sélectionné. En général, l'identification des peptides est réalisée par comparaison, à l'aide de logiciels dédiés, des spectres MS/MS avec des spectres théoriques déduits des séquences de protéines contenues dans des banques de données. Lorsqu'un ion est sélectionné puis que seuls les fragments de cet ion sont analysés, on parle d'une acquisition de type DDA : *Data Dependent Acquisition*, il s'agit du type d'analyse MS/MS le plus commun. Il existe un type d'acquisition alternatif où la fragmentation se fait sans sélection d'ion précurseur, on parle alors d'analyse DIA : *Data Independent Acquisition*. Ce type d'acquisition, très utilisé en protéomique, présente l'avantage de fragmenter l'ensemble des espèces avec une meilleure sensibilité et un meilleur

recouvrement de séquence [161]. Or cela rend l'interprétation des données très complexes puisque les ions précurseurs sont découplés des ions fragments, requérant l'assistance de logiciels spécifiques. Le mode de dissociation le plus utilisé en *bottom-up* est le CID en raison de son efficacité de fragmentation des peptides et de la prévisibilité des fragments générés. Cependant, dans certains cas, lorsqu'il s'agit de caractériser des MTP labiles comme les phosphorylation/sulfatation ou les N/O-glycosylations, les modes de dissociation *via* activation électronique comme l'ETD peuvent être privilégiés car ne conduisant pas à la perte de ces modifications labiles [72].

L'enzyme la plus largement utilisée pour la digestion des protéines en *bottom-up* est la trypsine en raison de son faible coût et de sa très haute spécificité de clivage des liaisons peptidiques en position C-terminale des résidus lysine et d'arginine. Cela s'explique également par la relative abondance des résidus lysine et arginine dans le protéome humain, ainsi que de leur distribution généralement homogène dans la séquence des protéines. Les peptides générés ont généralement une taille d'une dizaine d'acides aminés avec au moins deux charges positives, conditions qui sont parfaitement adaptées à une analyse MS/MS par CID [162]. Il arrive cependant que l'utilisation d'autres protéases soit nécessaire lorsque que la protéine d'intérêt présente peu d'arginine ou de lysine dans sa séquence ou qu'il existe des incompatibilités de pH. Par ailleurs, des enzymes disposant d'une spécificité différente, comme les endoprotéases Lys-C, Glu-C et Asp-N qui clivent respectivement en position C-terminale des résidus lysines, et des acides glutamiques ou aspartiques et en position N-terminale des acides aspartiques, peuvent être utilisées pour améliorer le recouvrement de séquence. C'est particulièrement le cas des protéines thérapeutiques, où une simple identification n'est pas suffisante et qu'une vérification approfondie de la séquence et des MPTs est nécessaire [163].

L'approche *bottom-up* est également l'outil analytique de référence pour la caractérisation des modifications post-traductionnelles. La première étape chromatographique permet généralement la séparation des peptides intacts et modifiés facilitant l'identification MS du type de modification dont l'abondance peut être quantifiée par comparaison des aires relatives des pics chromatographiques des formes native et modifiée. Cette quantification doit cependant être évaluée avec précaution dans le cas où le chromatogramme est généré à partir du signal MS puisque des peptides intacts et modifiés peuvent présenter des rendements

d'ionisation différents. Les informations de séquence fournies par la fragmentation MS/MS des peptides permettent quant à elles d'identifier et de localiser les acides aminés ayant subi des modifications [72]. La figure 21 présente un exemple de caractérisation d'une déamidation par l'approche *bottom-up*.

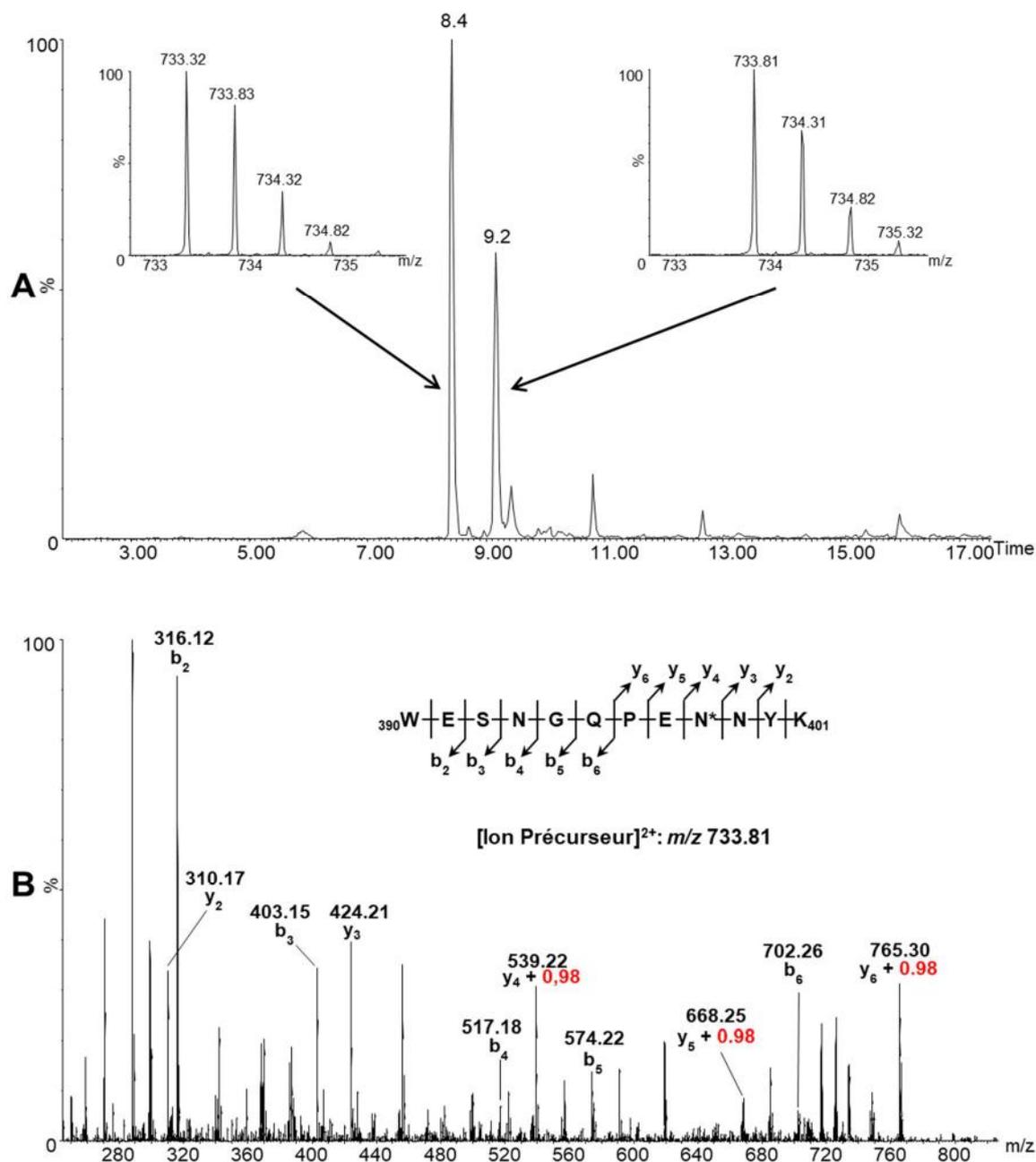


Figure 21 : Dans le panel A est présenté le chromatogramme d'ion extrait (XIC) du peptide $W_{390}ESNGQPENNYK_{401}$ d'un anticorps monoclonal. Les pics élués aux $Tr=8,4$ min et $Tr=9,2$ min correspondent respectivement aux peptides natif et modifié. Les spectres de masse des deux peptides

sont présentés en insert. Le spectre MS/MS du peptide modifié au niveau de l'Asn₃₉₈ (déamidation, +0,98 Da) est présenté panel B (ions y modifiés à partir de l'ion fragment y4).

Pour toutes ces raisons, le *bottom-up* est quasiment systématiquement utilisé comme méthode orthogonale aux analyses *middle-up* pour vérifier l'identité et quantifier des MPTs observées. Malgré tout, le *bottom-up* présente quelques défauts. En effet, ce type d'analyse nécessite plusieurs étapes de préparation des échantillons et des digestions enzymatiques longues (plusieurs heures à 37°C) rendant les protocoles chronophages et pouvant générer des dégradations artéfactuelles comme l'oxydation et la déamidation.

Dans le cadre du développement de protéines thérapeutiques, une procédure standardisée de carte peptidique dérivée de l'approche *bottom-up* a été développée et désignée par le terme MAM : *Multi-attribute Monitoring*. Lorsque la séquence et les sites de modifications d'une protéine thérapeutique ont été formellement caractérisés, cette approche permet l'identification et la quantification de modifications d'acides aminés avec rapidité et spécificité. Les paramètres analytiques chromatographiques, MS et de retraitement des données sont prédéfinis et la procédure ne nécessite souvent qu'une analyse LC-MS sans spectromètre de masse haute résolution pour un traitement haut débit des échantillons. Cela permet une identification et une quantification rapide des MPTs (généralement les CQAs) de la protéine pour soutenir des études de stabilité du produit, de robustesse des procédés de fabrication ou en contrôle qualité lors du développement du produit biopharmaceutique [164].

II. L'analyse conformationnelle des protéines par spectrométrie de masse

La caractérisation des structures d'ordres supérieurs (HOS : *Higher order structure*), comprenant les structures secondaires, tertiaires et quaternaires, est indispensable lors du développement de protéines thérapeutiques. Des modifications conformationnelles peuvent intervenir tout au long du cycle de vie d'un produit biopharmaceutique, comme lors de la fabrication, de la formulation, du transport ou du stockage. Même de faible ampleur, ces modifications peuvent avoir un impact significatif sur la fonction d'une protéine ou en termes de sécurité si la perte de structure conduit à l'exposition de nouveaux épitopes pouvant induire une réponse immunitaire contre le produit biopharmaceutique.

Depuis le début de l'ère des biotechnologies, la spectrométrie de masse constitue un outil indispensable de caractérisation des structures covalentes des protéines (séquençage d'acides

aminés, caractérisation de MPTs...), mais à partir des années 1990, industriels et laboratoires académiques évaluèrent la capacité de cette technologie à fournir des informations sur les structures d'ordres supérieurs des protéines. La spectrométrie de masse s'est alors révélée un outil fiable et robuste pour la détermination de la stœchiométrie, de la topologie ou de la dynamique de complexes protéiques mais aussi pour l'étude de la structure et des interactions de protéines vis-à-vis de cibles thérapeutiques et de partenaires physiologiques.

Bien que n'apportant pas des informations structurales aussi détaillées qu'au niveau atomique ou moléculaire comparativement aux techniques biophysiques traditionnelles comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la cristallographie aux rayons X, la spectrométrie de masse fournit un certain nombre d'avantages tels que la sensibilité, la vitesse d'analyse, la spécificité et la capacité d'analyser simultanément plusieurs espèces en mélange [165].

i. La spectrométrie de masse native

L'avènement des sources d'ionisation par électronébulisation a permis d'obtenir des spectres de masse de macromolécules en solution, et si l'enthousiasme initial se focalisa sur la mesure de masse de polypeptides entiers, il est apparu rapidement que les conditions douces d'ionisation de l'ESI permettent de conserver les liaisons et interactions non-covalentes des protéines en phase gazeuse [166]. Cela a conduit à l'émergence d'une nouvelle technique, aujourd'hui dénommée « spectrométrie de masse native », permettant l'élucidation des structures d'ordres supérieurs des protéines et l'étude de complexes protéiques non-covalents. Le terme de MS native se réfère au statut biologique des analytes avant l'étape d'ionisation, correspondant à des conditions non-dénaturantes le plus proche possible de celles observées *in vivo*. Cependant, si l'essentiel des liaisons non-covalentes sont maintenues durant le transfert en phase gazeuse, la structure des protéines ou des complexes protéiques est indubitablement différente de celle existant en solution. Il est alors important d'évaluer le degré de préservation de la structure des protéines en phase gazeuse. Des études ont montré que la structure globale des protéines en phase gaz n'étaient pas si éloignées de celles en solution [167]. Van der Rest *et al.* ont notamment montré que l'effet de la concentration protéique en solution entraîne un changement des abondances des conformères sans affecter le profil conformationnel du prion démontrant ainsi que l'équilibre conformationnel est préservé en phase gaz et donc que les

structures des conformères sont très proches de celles en solution [168]. Mais il est également établi que les structures des protéines en phase gaz ne sont pas totalement similaires à celles observées en solution en raison des propriétés intrinsèques du processus d'ionisation electrospray. En effet, le phénomène d'explosion coulombienne et la désolvatation intervenant dans l'ESI conduisent à la baisse du pH des gouttelettes, mais surtout à la perte des molécules d'eau constituant la « cage d'hydratation » de la protéine, avec pour conséquences, un effondrement des chaînes latérales des acides aminés ou un renforcement des interactions électrostatiques.

Par ailleurs, tous les types d'interactions non-covalentes ne sont pas préservés en phase gazeuse. Si les interactions électrostatiques (ioniques) et les liaisons hydrogènes sont conservées, les interactions hydrophobes deviennent très instables en absence de solvant et les complexes basés sur ce type d'interaction peuvent se dissocier en phase gazeuse. Mais, dans la majorité des cas, ce type de dissociation intervient par un mécanisme particulier avec partitionnement asymétrique des charges du complexe conduisant à une signature spectrale spécifique, suggérant la présence d'un complexe et empêchant une mauvaise interprétation des données [169].

D'un point de vue instrumental, la spectrométrie de masse native présente quelques spécificités, notamment pour la transmission d'ions de hauts poids moléculaires comme les complexes protéiques. Des pressions plus élevées en source et dans différents compartiments du spectromètre de masse sont nécessaires pour améliorer la transmission des ions « lourds ». L'utilisation de quadripôles avec une gamme de m/z plus élevée est nécessaire. La spectrométrie de masse native peut être employée par infusion directe d'une protéine en solution ou en couplage avec des techniques de séparations liquide préservant la conformation des protéines comme la SEC ou l'IEX, mais nécessite l'utilisation de sels volatils compatibles avec une ionisation par électronebulisation comme l'acétate d'ammonium [170].

Les sources ESI produisent des ions multi-chargés dont la distribution des états de charge (CSD : *Charge State Distribution*) est dépendante de caractéristiques structurales de la protéine en solution comme les interactions intramoléculaires, la surface accessible au solvant et les sites ionisables disponibles [171]. Une dénaturation partielle va induire une augmentation de la surface accessible de la protéine aux protons. Cette dénaturation se traduit alors par une

augmentation du nombre de charges et un déplacement de la distribution des états de charge sur les spectres de masse vers des valeurs m/z plus faibles. Ce phénomène est parfaitement illustré par la comparaison de spectre MS de protéines analysées en conditions natives ou dénaturantes. A titre d'exemple, la Figure 22 présente le spectre MS d'un anticorps acquis en conditions natives (pH et force ionique physiologiques, sans solvant organique) où l'on observe une distribution des états de charges restreinte (+26 à +30) sur une gamme de m/z élevée (> 5000 m/z). Lorsque ce même anticorps est analysé en conditions dénaturantes (pH faible, 50% de solvant organique), la distribution des états de charges est plus large avec des états de charges supérieurs à +50 et déplacée vers une gamme m/z plus faible (<3500 m/z) caractéristiques de la forme dénaturée de la protéine.

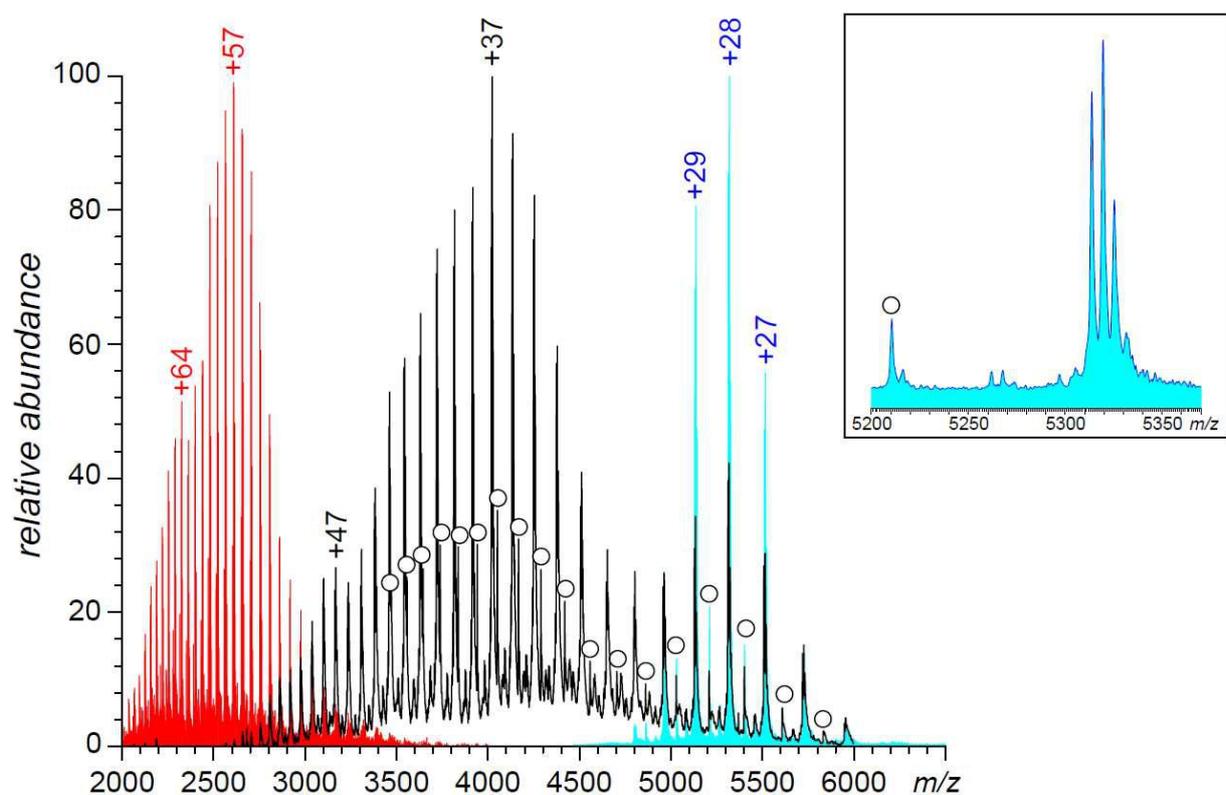


Figure 22 : Spectres de masse d'un anticorps monoclonal acquis en conditions très dénaturante (rouge), moyennement dénaturante (noire) et native (cyan). L'encadré est un agrandissement du spectre en conditions natives présentant la contribution des différentes glycoformes, ainsi que la forme dé-glycosylée (marquée par un cercle). D'après Kaltashov *et al.* [169]

Dans certains cas, il est possible de nuancer les informations conformationnelles obtenues à partir des distributions d'états de charges. Lorsque l'anticorps est analysé en conditions moyennement dénaturantes (pH 3.0, force ionique physiologique, sans solvant organique),

deux enveloppes sont observées, l'une correspondant à la forme native ($> 5000 m/z$, CSD restreinte) et la seconde à une forme intermédiaire (3000 à 4500 m/z , CSD large) entre les formes native et complètement dénaturée. Cela indique qu'en conditions moyennement dénaturantes, une sous-population de l'anticorps conserve une structure native, alors que le reste des espèces subit une perte partielle de sa structure tertiaire. Cependant, les données obtenues par l'analyse de protéines en MS native doivent être évaluées avec précaution puisque la distribution des états de charges d'une protéine ne dépend pas que de sa structure, mais également du processus d'ionisation ou de réactions chimiques en phase gazeuse (entre la protéine ionisée et des molécules neutres de solvant, ex : basicité en phase gazeuse du tampon) [170]. Un changement dans la composition du solvant peut conduire, par exemple, à une profonde modification de la distribution des états de charges de la protéine et, potentiellement, à une surinterprétation des données.

Bien que ce type d'analyses ait fait la démonstration du lien qui existe entre la distribution des états de charges et la structure des protéines, d'autres études ont été menées pour prouver que la structure des protéines est, au moins partiellement, conservée en phase gazeuse. Les études les plus convaincantes ont été obtenues par le couplage de la spectrométrie de masse à la mobilité ionique (IM-MS). La mobilité ionique permet de séparer les conformères des protéines en fonction de leurs charges, de leurs formes et de leurs sections efficaces (CCS : *Collisional Cross Section*) (voir partie 2.3.2.2). Les valeurs des CCS mesurées par IM-MS peuvent être comparées aux sections efficaces déterminées par d'autres techniques biophysiques comme la cristallographie aux rayons X ou la microscopie électronique. L'analyse IM-MS de petites protéines comme l'ubiquitine ou le cytochrome C a montré que des sections efficaces plus petites sont observées pour les formes natives par rapport aux formes dénaturées et que les valeurs de CCS observées sont cohérentes avec les valeurs prédites par des données de cristallographie [172]. Dans certains cas, un « effondrement » de la structure en phase gazeuse (« *gas-phase collapse* ») peut être observé pour des protéines non-globulaires ou pour des complexes protéiques. C'est le cas par exemple de GroEL, une chaperonine composée de deux anneaux heptamériques, dont les sections efficaces mesurées en phase gazeuse sont significativement plus petites que celles mesurées par cristallographie [173].

Les applications de la MS native sont nombreuses, notamment en recherche fondamentale dans le domaine de la biologie structurale pour l'étude des complexes protéiques, mais également dans le cadre du développement de produits biopharmaceutiques [164]. L'analyse en conditions natives permet la caractérisation de protéines dont la structure quaternaire dépend d'interactions non-covalentes comme des IgG4 bispécifiques ou des ADCs (*Antibody drug conjugates*) dont les composés cytotoxiques sont liés aux cystéines [171]. La MS native rend également possible la caractérisation de complexes non-covalents impliquant des agrégats de protéines thérapeutiques, des complexes protéine-récepteur ou des complexes immuns [174,175]. Dès 2001, Tito *et al.* sont parvenus à caractériser le complexe formé par l'antigène recombinant rV, provenant de *Yersinia pestis*, et son anticorps monoclonal cible, démontrant la sélectivité de ce dernier et une stœchiométrie 1 : 2 du complexe anticorps-antigène [176]. Les états de charges réduits observés en MS native peuvent également constituer un avantage pour la caractérisation des protéines thérapeutiques qui sont souvent très hétérogènes. Le nombre réduit de charges et le déplacement des états de charges vers des valeurs de m/z élevées conduisent intrinsèquement à des spectres plus simples et à une réduction du chevauchement des états de charge pour une meilleure interprétation des données. Dans le cas de protéines de grandes tailles et très hétérogènes comme les ADCs, des agents de réduction de la charge comme l'imidazole peuvent être utilisés en complément de spectromètres de masse haute résolution pour limiter le chevauchement des pics sur les spectres de masse natifs [177].

La plupart des protéines sont connues pour avoir de multiples états conformationnels intermédiaires (pas seulement natifs ou dénaturés), se différenciant parfois par des différences structurales mineures. Ces variations subtiles n'ont souvent pas d'impact significatif sur la forme globale de la protéine et, par conséquent, sur la distribution des états de charges de la protéine. Ainsi, plusieurs conformères peuvent présenter des distributions d'états de charges identiques [170]. C'est la raison pour laquelle l'évaluation de la conformation des protéines sur la seule base de la distribution des états charge doit être considérée de manière qualitative et relative en raison de la faible résolution apportée pour des modifications subtiles de structure. Des méthodes complémentaires à la spectrométrie de masse native, comme la mobilité

ionique, les marquages chimiques ciblés ou l'étude par échanges hydrogène/deutérium (HDX), ont donc été développées pour détecter des variations structurales plus subtiles.

ii. Les méthodes d'analyses complémentaires

a. La mobilité ionique

Le principe de la spectrométrie de mobilité ionique (IM) consiste à soumettre des molécules ionisées à un champ électrique et à un flux de gaz inerte à contre-courant. Les ions se déplacent suivant le champ électrique à une vitesse qui dépendra de leur charge, de leur forme et de leur section efficace. Pour un même état de charge, un ion ayant deux conformères, l'un avec une structure compacte et l'autre avec une structure étendue conduira à l'observation de la forme compacte en premier car elle sera moins ralentie par le gaz comparativement à la forme étendue qui arrivera plus tard. Si la mobilité ionique peut être utilisée seule, elle est presque toujours associée à la spectrométrie de masse (IM-MS) pour l'analyse des protéines puisque la mesure seule de leur mobilité n'est pas suffisante pour leur identification. Il existe différents types de cellule de mobilité ionique dont les plus courantes sont les cellules DTIMS (« *Drift Tube Ion Mobility Spectrometry* ») dans lesquelles un champ électrique linéaire et homogène est appliqué, et les cellules de type TWIMS (« *Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry* ») où des « vagues » de potentiels sont appliquées en continu, la fréquence et la hauteur (volts) de ces dernières permettant la séparation des ions. La séparation des conformères étant obtenue par le « freinage » plus ou moins fort des ions à l'aide d'un gaz tampon (azote) à contre-courant. Ainsi pour un même ion (même molécule et même état de charge) le conformère le plus compact sera détecté le premier et le plus « ouvert » plus tardivement du fait de son « ralentissement » par le gaz tampon.

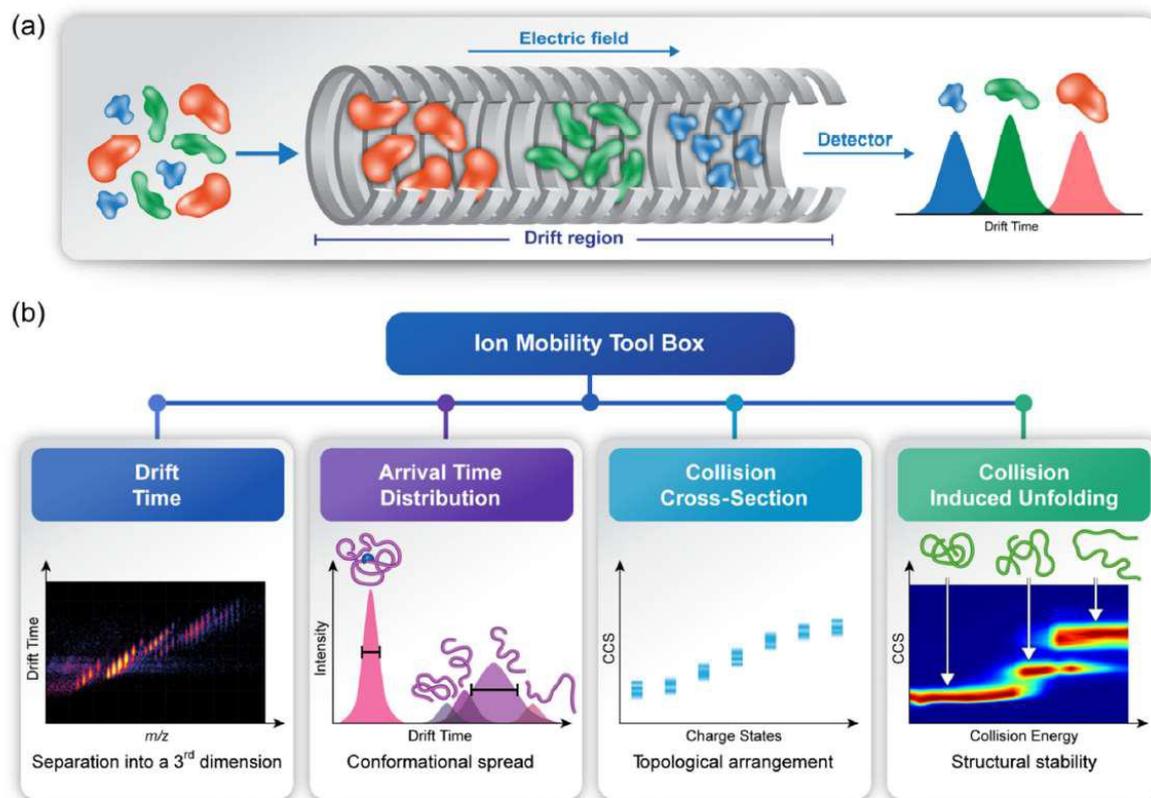


Figure 23 : Illustration du principe de la mobilité ionique et de ces applications. (a) Schéma représentant une cellule de mobilité ionique dans laquelle les ions soumis à un champ électrique et à un flux de gaz à contre-courant sont séparés en fonction de leur forme, de leur charge et de leur section efficace. (b) Les analyses IM-MS permettent d'obtenir un certain nombre d'informations structurales en apportant une troisième dimension aux analyses de MS native, par le calcul de CCS ou en reflétant la stabilité des structures conformationnelles intermédiaires de protéines lors de dénaturation *par CID : collision induced unfolding (CIU)*. D'après Ben-Nissan *et al.* [178]

Au-delà de la capacité de l'IM-MS à séparer des isomères sur la base de leurs différences conformationnelles, cette technique permet de déterminer les sections efficaces de collision (CCS : *Collision Cross Section*) des protéines en phase gazeuse. Suivant le type de cellule de mobilité ionique, les CCS peuvent être déterminées soit directement à partir du temps de mobilité (pour les cellules DTIMS), soit à l'aide d'une calibration appropriée pour les cellules TWIMS. [123]. Si l'IM-MS fut d'abord développée pour la caractérisation structurale de complexes protéiques, elle fût rapidement appliquée à l'analyse de protéines thérapeutiques [171]. L'application de cette technique à la caractérisation d'anticorps thérapeutiques a démontré son efficacité pour discriminer différents conformères en phase gazeuse. Ainsi des études ont mis en évidence la présence de deux à trois conformères d'une IgG2 en phase

gazeuse liés à des réarrangements des ponts disulfures inter-chaînes de la partie charnière de l'anticorps [179]. De même des différences structurales entre IgG1 et IgG4 furent observées sur la base d'analyses IM-MS. La comparaison d'anticorps princeps et génériques (biosimilaires) par IM-MS a également permis de mettre en évidence une plus forte hétérogénéité des biosimilaires par rapport aux anticorps originaux [180]. Cette technique s'est également révélée utile pour la caractérisation de protéines dérivées d'anticorps comme les ADCs et les anticorps bispécifiques. Les anticorps bispécifiques sont généralement formés à partir d'IgG4 spécifiques de deux antigènes différents. Les IgG4 étant connus pour la fragilité des ponts disulfures inter-chaînes de la région charnière, des échanges de demi-anticorps (correspondant à une chaîne légère et une chaîne lourde) sont possibles entre deux anticorps ciblant des antigènes différents pour former un seul anticorps ciblant ces deux antigènes. La dynamique en temps réel de ces échanges de demi-anticorps (« *Fab-arm exchange* ») d'IgG4 pour la formation d'anticorps bispécifiques a été rendue possible par IM-MS [181]. L'IM-MS fut également utilisée avec succès pour évaluer l'hétérogénéité d'anticorps conjugués marqués au niveau des cystéines pour une détermination directe du DAR (*Drug-to-Antibody Ratio*) [182]. Par ailleurs, les différentes études structurales d'anticorps par IM-MS rapportées dans la littérature ont révélé des valeurs de CCS inférieures à celles attendues pour une protéine de cette masse, suggérant un collapse de sa structure en phase gazeuse du fait de la flexibilité de la partie charnière de ce type de protéine [169,171].

Des méthodologies impliquant L'IM-MS ont été développées pour caractériser des différences structurales de molécules entières ayant des temps de mobilité ionique proches ou identiques. Il s'agit par exemple du protocole CIU : *Collision Induced Unfolding* qui consiste à augmenter l'énergie de collision d'une protéine pour induire une augmentation de son énergie interne et donc des changements conformationnels (sans toutefois causer de dissociation des liaisons covalentes). Les changements conformationnels subis par la protéine sont alors suivis par IM-MS. Les résultats obtenus fournissent des profils de dissociations qui constituent une « empreinte » permettant d'évaluer la stabilité de la structure d'une protéine ou d'un complexe protéique. Les données fournies par le CIU sont relatives et permettent de comparer la stabilité de protéines en phase gazeuse plutôt que de déterminer des propriétés thermodynamiques

absolues [183]. Cette méthode a été appliquée à la comparaison des structures d'isotypes d'IgG, d'anticorps commerciaux, d'ADCs ou pour évaluer l'impact de MPTs [184,185].

b. Les échanges Hydrogène/Deutérium

L'étude des échanges hydrogène/deutérium (H/DX) est une méthode permettant d'explorer la dynamique conformationnelle, les changements de structures ou les sites d'interactions des protéines en solution par la mesure du nombre de deutérium incorporés. Parmi les différents types de protons échangeables, seuls les hydrogènes amidiques du squelette peptidique sont suffisamment stables pour être détectés dans des conditions expérimentales bien définies (pH acide, basse température, rapidité). Les atomes d'hydrogènes aliphatiques et aromatiques ne sont pas échangeables et les protons des chaînes latérales ont des vitesses d'échanges et de ré-échanges trop rapides pour être mesurés. Les protons amidiques impliqués dans des liaisons hydrogènes de structures d'ordres supérieurs ou isolés du solvant car enfouis au sein de la protéine sont plus lentement échangés que ceux présents à la surface de la protéine ou exposés *via* des changements conformationnels (locaux ou globaux). La mesure des échanges H/D reflète donc des différences d'accessibilité au solvant deutéré et apporte donc des informations sur la dynamique conformationnelle des protéines. Cette mesure peut être faite par différentes techniques comme la spectroscopie optique ou la RMN, mais également par spectrométrie de masse puisque que l'échange d'un atome d'hydrogène par un atome de deutérium conduit à une augmentation de masse de 1,01 Da.

Concrètement, les réactions d'échanges H/D sont initiées par la dilution de la protéine dans une solution d'eau deutérée (D₂O) à pH neutre, les échanges sont ensuite « stoppés » après une certaine période par l'acidification de la solution (pH 2,5-3,0) et l'abaissement de la température (0-3°C). Ces conditions ont pour conséquence de drastiquement réduire les ré-échanges et de conserver le marquage isotopique des fonctions amides avant l'analyse MS. La mesure de l'augmentation de masse de la protéine au cours du temps permet de suivre la cinétique des échanges H/D au niveau de la protéine entière. Le taux d'incorporation du deutérium est une indication du niveau d'exposition au solvant. Il s'agit alors d'une méthode simple et directe de détection de changements conformationnels liés, par exemple, à des modifications covalentes de protéines ou à une exposition à un stress (Figure 24, « global H/DX »).

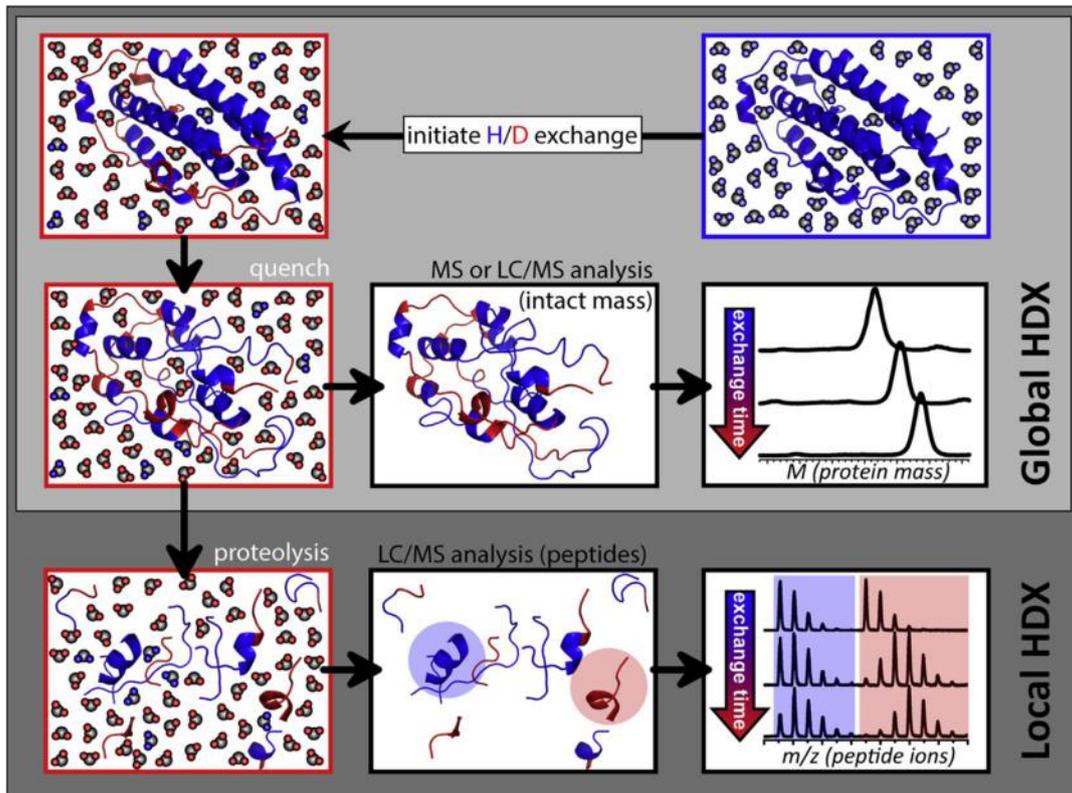


Figure 24 : Schéma représentant le principe des différentes approches pour la mesure globale et locale des échanges hydrogène/deutérium de protéines par spectrométrie de masse. D'après kaltashov *et al.* [169]

L'étude des échanges H/D peut également fournir des informations sur des changements locaux de la structure. En effet, les conditions décrites précédemment (pH acide, faible température) permettent de conserver les deutériums incorporés au niveau des liaisons amidiques et de révéler les régions plus ou moins accessibles au solvant deutéré en relation avec la présence de structures secondaires (e.g. hélices alpha, feuillets bêta), tertiaires et quaternaires en conditions dénaturantes et après protéolyse. Une analyse de type « *bottom-up* » est alors possible par clivage enzymatique de la protéine avant l'analyse MS pour localiser les deutériums incorporés le long de la chaîne polypeptidique (Figure 24, « local H/DX »). Ce type d'analyse présente quelques contraintes techniques liées à l'obligation de rester à pH acide et à basse température pour éviter les ré-échanges H/D (« *back exchange* »), mais aussi de travailler vite. Cependant, même dans ces conditions, les ré-échanges ne sont que ralentis. Ceci nécessite un temps de préparation et d'analyse de l'échantillon le plus court possible. C'est la raison pour laquelle la digestion enzymatique est généralement réalisée en ligne par de la pepsine immobilisée sur colonne. Cela nécessite également des systèmes chromatographiques

réfrigérés et qui permettent une séparation rapide des peptides. Les données MS obtenues sont analysées en comparant les masses moyennes des peptides deutérés *versus* un échantillon contrôle. Ce type d'analyse fournit des informations conformationnelles sur des segments spécifiques de la protéine. L'amélioration de la résolution spatiale des deutériums peut être obtenue avec le chevauchement de fragments peptidiques en choisissant judicieusement la protéase [186], mais une résolution au niveau d'un résidu est difficile à obtenir. La fragmentation en phase gazeuse est un moyen possible d'obtenir la localisation des atomes de deutérium sur les peptides, mais dans le cas du mode de fragmentation CID un phénomène de « scrambling » empêchant toute localisation des deutériums au niveau de l'acide aminé est observé. Seule la fragmentation ECD permet la localisation des deutériums au niveau de l'acide aminé [187]. Au-delà de la détection et de la localisation d'instabilités conformationnelles, l'H/DX-MS peut également permettre la cartographie des sites d'interaction de complexes protéiques [188].

Les exemples d'applications de l'H/DX-MS pour la caractérisation de la structure des protéines thérapeutiques sont nombreux et concernent principalement l'analyse d'anticorps monoclonaux. Les capacités de l'H/DX-MS à caractériser la conformation et la dynamique conformationnelle d'une IgG1 furent mises en évidence par Houde *et al.* [189], notamment par comparaison des changements conformationnels observés entre les formes glycosylées et déglycosylées de l'anticorps. L'impact conformationnel de dégradations conduisant à des modifications covalentes comme l'oxydation ou l'isomérisation fut également analysé avec succès par H/DX-MS [190–192]. Enfin, la capacité de cette technique à déterminer les zones d'interactions entre protéines fut appliquée à la caractérisation des épitopes (« *epitope mapping* ») d'anticorps [193] ou pour l'étude d'agrégats d'anticorps monoclonaux [194].

c. Les stratégies de marquages chimiques ciblés

La plupart des acides aminés possèdent des groupements fonctionnels sur leur chaîne latérale qui peuvent être marqués grâce à des réactifs chimiques spécifiques. Les résidus ayant une surface d'accessibilité au solvant suffisante sont modifiés par le réactif chimique. Les peptides modifiés peuvent alors être identifiés par spectrométrie de masse et fournir des informations structurales sur la protéine d'intérêt. Le principal avantage de cette approche est le caractère irréversible du marquage facilitant l'identification des sites marqués.

Les réactifs utilisés sont en général spécifiques d'un ou de deux acides aminés et doivent présenter une taille et une hydrophilie proche de celles des molécules d'eau pour s'assurer qu'il s'agisse de bons indicateurs de l'accessibilité au solvant du résidu marqué [195]. Les acides aminés les plus fréquemment ciblés sont les cystéines, les acides aminés aromatiques (Trp, Tyr) et ceux possédant une fonction amine (Lys) ou carboxyle (Asp, Glu). Un cas particulier de marquage chimique est le « *cross-linking* » qui permet de fournir une cartographie de proximité pour la caractérisation à basse résolution des structures tertiaire et quaternaire de protéines ou des zones d'interactions de complexes protéiques. Le réactif chimique (« *cross-linker* ») utilisé est composé de deux groupements fonctionnels identiques à chaque extrémité permettant d'identifier deux acides aminés ayant une proximité spatiale. Ces « *cross-linker* » peuvent avoir des spécificités et des tailles variables pour obtenir des informations sur les distances inter-résidus. La détection des résidus modifiés est ensuite effectuée par protéolyse de la protéine et analyse LC-MS et MS/MS.

Les stratégies de marquage chimique présentent toutefois un certain nombre d'inconvénients qui en font des méthodes marginales pour la caractérisation de la dynamique conformationnelle des protéines thérapeutiques. En effet, la modification chimique d'un site peut induire un changement significatif de la conformation locale de la protéine. En conséquence, ces marquages chimiques ne seront pas nécessairement le reflet fidèle de l'accessibilité au solvant des résidus ciblés de la protéine à l'état natif. C'est pourquoi ce type de marquage n'est généralement utilisé que comme méthode orthogonale à l'H/DX-MS dans le cadre de la caractérisation de protéines thérapeutiques [169]. Un autre inconvénient des approches impliquant des marquages chimiques est de ne fournir qu'une image « statique » de la protéine, car si les cinétiques de marquage sont rapides, la résolution temporelle est limitée par la diffusion lente du réactif dans la solution [170].

Une technique innovante de marquage irréversible des protéines fut développée dans les années 2000 par Michael Gross et David Hambly [196]. Il s'agit de la photo-oxydation rapide des protéines (FPOP : *Fast Photo-Oxidation of Proteins*) qui consiste à oxyder une protéine sur une période extrêmement réduite (de l'ordre de la μ s) à l'aide d'un laser induisant la photolyse de molécules de peroxyde d'hydrogène en radicaux hydroxyles. Cette approche présente l'avantage de procéder au marquage chimique de la protéine sur une période courte, même à

l'échelle des transitions conformationnelles des protéines, prévenant tout changement structural induit par le marquage. Le niveau d'oxydation des chaînes latérales des acides aminés oxydables (Met, Cys, Trp, Tyr, Phe, His, Pro et Leu) fournit des informations sur leur accessibilité au solvant et donc sur la structure des protéines ou sur les zones d'interaction de complexes protéiques. Le temps de marquage très court qu'apporte l'utilisation d'un laser pulsé évite les distorsions structurales de la protéine induites par des modifications chimiques multiples. L'approche FPOP présente cependant un inconvénient non-négligeable par rapport à l'H/DX-MS qui est un plus faible taux de marquage des protéines. Cette méthode est utilisée pour la caractérisation de l'intégrité conformationnelle de protéines thérapeutiques, pour l'étude des phénomènes d'agrégation ou pour évaluer l'impact conformationnel de la fixation d'un ligand sur une protéine [169,197].

III. L'utilisation de dégradations forcées pour la caractérisation de protéines thérapeutiques

Les études de dégradations forcées sont indispensables au développement de protéines thérapeutiques pour déterminer la durée de conservation du produit, l'impact de certaines conditions de conservation (transport, stockage...) et surtout pour le développement et la validation des méthodes analytiques.

Dans le cadre de la caractérisation de protéines thérapeutiques et du développement de méthodes, les dégradations forcées vont permettre de mettre en évidence d'éventuelles zones de sensibilité du produit à différents stress (« *hotspot* ») et de s'assurer de la capacité des méthodes analytiques à déceler ces dégradations. Les stress utilisés pour ces études peuvent être de nature chimique, physique ou enzymatique, et conduire à des modifications au niveau des structures primaires (MTP, clivages), secondaires et tertiaires (dénaturation) ainsi que de la structure quaternaire (clivage de pont disulfure inter-chaîne) des protéines. Les protocoles de dégradations forcées permettant de favoriser spécifiquement une ou des modifications peuvent également s'avérer précieux dans le cadre d'études de la relation structure/fonction des protéines [56]. Les études de stress forcés constituent des étapes incontournables et indispensables dans la stratégie d'analyse et de caractérisation de protéines thérapeutiques.

i. Les stress chimiques

Les dégradations chimiques des protéines thérapeutiques ont souvent pour origine des agents oxydants ou des variations de pH. L'oxydation chimique peut être causée par des peroxydes (présents comme impuretés dans les excipients), des ions métalliques provenant de surfaces en acier inoxydable ou d'agents antiseptiques. Les principaux acides aminés sensibles à l'oxydation sont les méthionines, les cystéines, les histidines, les phénylalanines, les tyrosines et les tryptophanes. L'agent oxydant le plus utilisé pour les études de stress oxydatifs est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est particulièrement efficace pour l'oxydation des méthionines accessibles au solvant. L'hydroperoxyde de *tert*-butyle (*t*-BHP) peut également constituer une alternative au H_2O_2 [198]. Dans le cas de l'étude de l'oxydation catalysée par des ions métalliques (réaction de Fenton), des protocoles combinant l'action d'ions Cu(II), Fe(II) ou Fe(III) avec du peroxyde d'hydrogène, de l'oxygène ou de l'acide ascorbique ont été utilisés pour générer différentes espèces oxydées et étudier tous les acides aminés sensibles à l'oxydation. Les produits de ce type d'oxydation sont généralement plus variés, spécifiques et impliquent des acides aminés comme les cystéines, les histidines et les tryptophanes. Le pH peut également favoriser l'oxydation de résidus lorsque des variations de pH induisent un changement structural rendant accessible des acides aminés sensibles à l'oxydation [199].

Les variations de pH, intervenant souvent en cours de procédé de fabrication, peuvent être à l'origine de modifications d'acides aminés ou de clivages de liaisons peptidiques. L'une des principales conséquences liées au pH est la déamidation des asparagines et, dans une moindre mesure, des glutamines. Cette réaction intervient par l'attaque nucléophile du carbonyle de la chaîne latérale d'une asparagine par le NH du squelette peptidique de l'acide aminé $n+1$, pour former un intermédiaire cyclique succinimide avec une perte d'ammoniac. Cet intermédiaire peut alors subir une hydrolyse conduisant à la formation d'un acide aspartique ou d'un acide isoaspartique, mais peut également subir une nouvelle attaque nucléophile conduisant au clivage de la liaison peptidique [200]. Cette dégradation peut intervenir à pH neutre ou basique mais est favorisée en conditions alcalines en présence de bicarbonate d'ammonium. Bien que moins fréquente, la déshydratation de résidus d'acide aspartique peut également générer la formation d'un cycle imide dont l'hydrolyse va conduire à l'isomérisation en acide isoaspartique. Cette réaction est catalysée à pH acide ou basique et peut également conduire

au clivage de la liaison peptidique [159]. La cyclisation des résidus N-terminaux de glutamine en acide pyroglutamique (pGlu) est également une dégradation liée au pH intervenant en conditions acide ou alcaline.

En dehors des stress oxydants et des variations de pH, il existe d'autres voies de modification chimique qui peuvent être étudiées au cas par cas. L'évaluation de la stabilité des ponts disulfures d'une protéine peut être menée par des études de réduction ménagée avec un agent réducteur comme le dithiothréitol (DTT). Cela permet de mettre en évidence les ponts disulfures les plus fragiles. De même, la réactivité de certains acides aminés vis-à-vis de réactifs chimiques exogènes peut être étudiée. C'est le cas par exemple de MPTs comme la glycation, où l'incubation d'une protéine avec un sucre réducteur peut permettre de déterminer quels résidus lysines de la protéine sont les plus sensibles à ce type de dégradation [63].

Dégradation	Condition de stress	Acide aminé
Déamidation	Chauffage	Asn
	pH neutre à basique	Gln
Oxydation	Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	Met
	Hydroperoxyde de <i>tert</i> -butyle (<i>t</i> -BHP)	Cys
	Ions métalliques : Cu(II), Fe(II), Fe(III)	His
	Chauffage	Tyr
	Photo irradiation	Trp Phe
Hydrolyse de liaison peptidique	Chauffage	Asn (C-terminal)
	pH basique pH acide	Asp (C-terminal)
Isomérisation	Chauffage	Asp
	pH neutre à acide	Asn
Réduction de pont disulfure	Chauffage Dithiothréitol	Cys
Cyclisation N-Terminale (Formation pGlu)	Chauffage	Gln
	pH basique	Glu
	pH acide	
Glycation	Chauffage + Sucre réducteur	Lys
		Arg Acide aminé N-terminal

Tableau 7 : Principales voies de dégradation forcée de nature chimique des protéines. D'après Tamizi *et al.* [201]

Ces études de stress forcé doivent permettre d'identifier et de localiser les potentielles cibles de dégradations chimiques d'une protéine thérapeutique, et *in fine* d'évaluer leur criticité en termes d'activité biologique et de sécurité [56].

ii. Les stress physiques

Le chauffage est le type de stress physique le plus répandu pour l'étude des protéines. L'augmentation de la température induit des changements conformationnels des protéines, notamment des dénaturations partielles qui vont conduire à des phénomènes d'agrégation ou exposer des acides aminés à des modifications indésirables. De plus, une température élevée conduit à une diffusion plus rapide des molécules favorisant les réactions chimiques de dégradation. Ainsi, les études de stress chimiques (oxydation, variation de pH...) sont souvent réalisées avec chauffage pour une meilleure efficacité. Le chauffage constitue également un test de stabilité accéléré des produits biopharmaceutiques. Lorsque la température de stockage d'un produit est par exemple préconisée entre 0 et 5°C, des études de stabilité à 25, 30 ou 40°C permettent d'anticiper les éventuelles dégradations (clivages de liaisons peptidiques, des réactions de déamidation ou de cyclisation...) [60] et d'accélérer les études de pré-formulation pour la sélection des excipients les plus adaptés.

L'exposition à la lumière est également une source de dégradation des protéines et son impact doit être évalué. Les dégradations induites par la lumière vont dépendre de la structure de la protéine, de la formulation, ainsi que de l'intensité et de la longueur d'onde de la source lumineuse. La principale conséquence de l'exposition à la lumière est la photo-oxydation causée par la formation de radicaux libres, provoquant la modification chimique des acides aminés. Le squelette peptidique, les cystéines, les méthionines et les acides aminés aromatiques sont les composants des protéines les plus photosensibles [199]. Ce type de stress a démontré son efficacité pour mettre en évidence la sensibilité à la photo-oxydation des méthionines situées à l'interface des domaines CH2-CH3 des IgG [202].

Parmi les autres stress physiques répandus pour l'étude des protéines, on retrouve les stress mécaniques (agitation, cisaillement...) et de congélation/décongélation. Ces types de stress vont essentiellement impacter la conformation et le taux d'agrégation des protéines [201].

iii. Les dégradations enzymatiques

Les enzymes protéolytiques peuvent être une source de dégradation, ou *a minima*, d'hétérogénéité des protéines thérapeutiques. Dans le cas de protéines recombinantes, des enzymes comme la carboxypeptidase B peuvent être libérées dans le milieu de culture par les cellules et impacter la protéine produite. L'hétérogénéité de lysines en position C-terminale des chaînes lourdes d'anticorps monoclonaux recombinants a pour origine l'action de cette enzyme. De même, concernant les protéines thérapeutiques plasmatiques, des protéases (trypsine, carboxypeptidase A...) en circulation dans le plasma peuvent être à l'origine de modifications (clivage d'acides aminés terminaux, fragmentation...).

C'est la raison pour laquelle ces enzymes peuvent être utilisées sur des protéines d'intérêt pour s'assurer de la capacité des méthodes analytiques à détecter efficacement les modifications indésirables qu'elles génèrent. Elles peuvent également être utilisées pour évaluer l'impact de ces modifications sur l'activité biologiques des protéines d'intérêt (relation structure/fonction, tests cellulaires...).

Partie II : Résultats

Chapitre III : Caractérisation d'anticorps par chromatographie en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse

1. Introduction

Les anticorps constituent l'une des principales classes de protéines thérapeutiques et sont utilisés pour traiter un nombre important de pathologies. Il s'agit de protéines complexes présentant un degré d'hétérogénéité élevé, dont la caractérisation structurale représente un véritable défi. Une des méthodes analytiques les plus utilisées pour la caractérisation de ces produits thérapeutiques est la chromatographie de phase inversée couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). La sélectivité apportée par cette technique chromatographique et les capacités d'identification de la spectrométrie de masse en font des outils performants de caractérisation des modifications post-traductionnelles d'anticorps. L'analyse LC-MS de protéines aussi complexes nécessite souvent l'usage d'outils enzymatiques, soit pour leur protéolyse complète, soit par protéolyse limitée pour générer des sous-unités de 25 à 100 kDa. L'analyse de sous-unités présente l'avantage de fournir une meilleure séparation chromatographique des protéoformes, une meilleure précision de masse (par l'analyse de masses plus faibles) et une localisation rapide des modifications observées sur la protéine. Cette approche méthodologique est désignée par le terme *middle-up*.

Trois études employant l'approche *middle-up* pour la caractérisation par LC-MS de modifications post-traductionnelles d'anticorps polyclonaux et monoclonaux sont présentées dans ce chapitre. Dans le cas des anticorps polyclonaux, cette approche permet de focaliser l'analyse sur la région Fc des IgG, correspondant à la partie constante de ces protéines, alors que la partie Fab, correspondant à la partie variable, présente un degré d'hétérogénéité incompatible avec une analyse LC-MS. La dissociation des parties constantes et variables est rendue possible grâce à une enzyme, l'IdeS, clivant spécifiquement les IgG au niveau de la partie inférieure de la région charnière. Cette méthodologie a alors permis la caractérisation des

modifications post-traductionnelles telles que l'oxydation et la glycation présentes sur la partie constante d'anticorps polyclonaux. Nous avons également utilisé cette approche pour évaluer l'intégrité des ponts disulfures d'anticorps monoclonaux. Dans ce cas, l'utilisation combinée de deux enzymes, l'IdeS et l'IgdE, permet de générer des fragments correspondant aux parties variables, constantes et charnière de l'anticorps. L'analyse de ces fragments avec une méthode LC-MS optimisée a permis d'identifier les protéoformes liées à la réduction partielle de ponts disulfures intra-chaîne sur les parties variables et constantes de plusieurs anticorps monoclonaux ou de vérifier l'intégrité de leurs ponts disulfures inter-chaîne.

2. Caractérisation de formes oxydées d'anticorps polyclonaux en condition de stress forcé

I. Résumé de l'article

Les immunoglobulines intraveineuses (IGIV) sont des produits thérapeutiques constitués d'immunoglobulines G (IgG) polyclonales purifiées à partir de plasma sanguin. Ce type de produit biopharmaceutique est utilisé pour le traitement de nombreuses pathologies telles que les déficits immunitaires primaire et secondaire, les maladies auto-immunes ou des syndromes inflammatoires systémiques. Les préparations d'IGIV de dernière génération sont généralement commercialisées sous forme liquide dont l'utilisation est plus simple que celle des formes lyophilisées. Cependant, les protéines sont moins stables en solution, particulièrement vis-à-vis de modifications chimiques comme l'oxydation qui peuvent avoir des conséquences fonctionnelles sur le produit (baisse de l'activité biologique, agrégation, immunogénicité...). D'autre part, les réactions d'oxydation pouvant être favorisées par l'exposition des protéines à des sources lumineuses, les agences réglementaires exigent des investigations quant à la photo-stabilité de toute nouvelle substance active. Bien que la caractérisation de l'oxydation des protéines soit réalisable par spectrométrie de masse, aucune étude sur l'oxydation des IgG polyclonales n'a pour l'heure été entreprise. Cela s'explique par le caractère hautement hétérogène de la partie variable des immunoglobulines dont le rôle est la fixation d'antigènes. Néanmoins, la partie constante des IgG, reconnaissant les récepteurs membranaires, est suffisamment homogène pour être analysée par LC-MS. Dans cette étude, une enzyme provenant de *Streptococcus pyogenes*, l'IdeS, a été utilisée pour cliver spécifiquement la partie inférieure de la région charnière des IgG polyclonales. Lorsque cette

réaction enzymatique est suivie d'une réduction des ponts disulfures, la chaîne légère et les fragments variable (Fd) et constant (Fc/2) de la chaîne lourde des IgG sont libérés. Une méthode LC-MS a été développée pour caractériser les fragments Fc/2 des quatre sous-classes d'IgG, correspondant à la seule partie analysable de ce type de protéines. Des préparations d'IGIV soumises à un test de photo-stabilité ont également été analysées avec cette méthode pour évaluer leur niveau d'oxydation.

Analyse et identification des fragments Fc/2

Une séparation optimisée des fragments Fc/2 a été obtenue grâce à l'application d'un gradient avec une faible variation d'acétonitrile lors de l'élution, et l'utilisation d'une colonne chromatographique disposant de greffages de type diphenyle apportant une meilleure sélectivité que des greffages de type alkyle. Le chromatogramme obtenu après l'analyse d'une préparation d'IGIV avec cette méthode présente 4 pics dont les aires relatives sont cohérentes avec les abondances moyennes des différentes sous-classes d'IgG dans le plasma. Les fragments Fc/2 de trois allotypes d'IgG1 (G1m3 : $M_{\text{Théo}}=24140$ Da, G1m17,1 : $M_{\text{Théo}}=24108$ Da et G1m17,1,2 : $M_{\text{Théo}}=24094$ Da) ont été identifiés sur le spectre de masse du premier pic élué et représentent les espèces majoritaires (66% de l'aire totale). Les deux pics suivants, partiellement résolus et représentant 31% de l'aire totale du chromatogramme, correspondent aux deux allotypes connus d'IgG2 : G2m(23) ($M_{\text{Théo}}=24174$ Da) et G2m(n) ($M_{\text{Théo}}=24142$ Da). Le dernier pic élué sur le chromatogramme, et le moins abondant (3%), met en évidence sur le spectre de masse deux composés de poids moléculaires 24160 Da et 24124 Da. Le premier correspond au fragment Fc/2 de l'allotype G3m5* de la sous-classe IgG3 avec la substitution d'une Tyrosine par une Phénylalanine en position 296 (Y296F suivant la numérotation européenne, $M_{\text{Théo}}=24160$ Da). Il s'agit de l'allotype d'IgG3 prévalent dans la population française. Le second avec une masse de 24124 Da correspond au fragment Fc/2 du seul allotype d'IgG4 connu ($M_{\text{Théo}}=24124$ Da). Les fragments Fc/2 d'IgG3 et IgG4 polyclonaux n'ayant jamais été étudiés par spectrométrie de masse, des investigations complémentaires ont été menées pour confirmer leur identification. L'enrichissement en IgG3 d'une préparation d'IGIV a été réalisé par chromatographie d'affinité sur protéine A qui permet la capture des IgG à l'exception des IgG3. L'analyse par LC-MS de la fraction non-retenue met en évidence une augmentation très significative du pic contenant le composé de masse 24160 Da, confirmant

l'attribution de cette masse à la sous-classe IgG3. L'analyse LC-MS d'une préparation d'IGIV enrichie en IgG4 par chromato-focalisation a permis de confirmer l'identité de l'espèce de masse 24124 Da comme correspondant bien au fragment Fc/2 d'IgG4. La collecte des pics d'IgG3 et d'IgG4 suivie d'une analyse LC-MS/MS par *bottom-up* a également permis de confirmer leur identification, notamment par le séquençage de la portion glycosylée des IgG3 où se situe la mutation Y296F.

Caractérisation des formes oxydées de fragments Fc/2

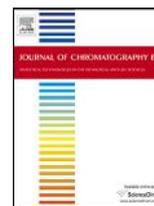
La photo-stabilité des IGIV a aussi été évaluée à l'aide de la méthode LC-MS précédemment décrite et le chromatogramme obtenu pour un échantillon photo-oxydé montre un profil avec trois pics additionnels par rapport à un échantillon de référence (décrit ci-dessus). Ces pics additionnels présentent des masses expérimentales avec des variations de +32 Da et +16 Da par rapport aux masses théoriques des allotypes d'IgG1 et de +48 Da et +16 Da par rapport aux masses théoriques des allotypes d'IgG2. Des variations de masse de +16 Da, +32 Da et +48 Da sont respectivement compatibles avec 1, 2 et 3 sites d'oxydation sur les fragments Fc/2 et les temps de rétention plus faibles des pics additionnels par rapport aux pics natifs sont cohérents avec la diminution de l'hydrophobie consécutive à une oxydation. Une analyse LC-MS/MS de l'échantillon stressé a permis d'identifier deux méthionines oxydées (Met₂₅₂ et Met₄₂₈) parmi les trois présentes dans les séquences des fragments Fc/2 des allotypes d'IgG1 et trois méthionines oxydées (Met₂₅₂, Met₂₈₂ et Met₄₂₈) parmi les quatre présentes sur les séquences des fragments Fc/2 des allotypes d'IgG2. Les méthionines oxydées identifiées sont en accord avec les sites d'oxydation des IgG déjà rapportés dans la littérature, et confirment les niveaux d'oxydation de ces fragments avec jusqu'à deux oxydations pour les IgG1 et trois oxydations pour les IgG2.

La méthode LC-MS développée pour cette étude a démontré sa capacité d'identification et de quantification du taux d'oxydation des fragments Fc/2 d'IgG polyclonales et a mis en évidence la sensibilité au stress de photo-oxydation des IgG1 et IgG2 de préparation d'IGIV. Cette méthode peut constituer un outil de suivi de l'oxydation d'IGIV lors d'études de pré-formulation ou de stabilité, ainsi que pour la caractérisation d'autres modifications post-traductionnelles.

II. Publication

Cette étude a été publiée dans *Journal of Chromatography B* :

Y. Leblanc, M. Romanin, N. Bihoreau, G. Chevreux, LC-MS analysis of polyclonal IgGs using IdeS enzymatic proteolysis for oxidation monitoring, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 961 (2014) 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.053>.



Short Communication

LC–MS analysis of polyclonal IgGs using IdeS enzymatic proteolysis for oxidation monitoring



Yann Leblanc, Marie Romanin, Nicolas Bihoreau, Guillaume Chevreux*

Analytical Department, LFB Biotechnologies, 3 Avenue des Tropiques, 91958 Courtaboeuf (Les Ulis), France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2014

Accepted 29 April 2014

Available online 4 May 2014

Keywords:

IdeS

Mass spectrometry

IVIG

Oxidation

IgG

ABSTRACT

Susceptibility of IgGs to oxidation is a significant issue for intravenous immunoglobulin preparations (IVIG) in liquid solution and raises both safety and efficacy concerns. Here we present an optimized chromatography method coupled to mass spectrometry (MS) to determine the oxidation of Fc/2 fragments derived from polyclonal IgGs after IdeS treatment. Separation of the four IgG subclasses was achieved using a diphenyl column and UV/MS detections were used for quantification and characterization. Several oxidized Fc/2 fragments generated by stress conditions were resolved and oxidized methionines were identified. This procedure can be used to monitor the oxidative status of IVIG preparations during formulation or stability studies.

© 2014 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Intravenous immunoglobulins (IVIG) are therapeutic products that contain pooled, polyvalent immunoglobulins G (IgGs) purified from the plasma of a large number of blood donors. IVIGs are used to treat a number of autoimmune disorders, idiopathic diseases and infections. Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy (CIDP), Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP), Primary Immunodeficiency states and Secondary Immunodeficiency in Chronic Lymphocytic Leukemia account for approximately 70% of IVIG use, but given their broad spectrum of action, they can be used in numerous other indications [1,2]. New generation of IVIG products are now provided in a liquid formulation that is more easy-to-use compared to freeze-dried products. However, proteins in solution are generally less stable and more susceptible to oxidation. This modification can lead to diverse functional consequences, such as decreased binding activities, increased aggregation and immunogenicity [3]. Oxidation reactions can be highly promoted by light exposure [4]. According to regulatory requirements (ICHQ1B guideline), photostability of a new active substance has to be investigated and oxidation appears as a relevant parameter. Peptide mapping,

commonly used to detect methionine oxidation [5], has never been used for polyclonal IgGs due to the large degree of protein heterogeneity. Usually, the oxidative stress of polyclonal IgGs is only addressed by measuring their carbonyl level and does not take into account methionine oxidation.

In 2011, the use of a cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* (IdeS) to characterize the sequence and post-translational modifications (PTMs) of monoclonal antibodies has been reported by Chevreux et al. [6]. This enzyme specifically cleaves human IgG in the hinge region between the two glycines of the constant sequence ELLGGPS [7]. After IgG reduction, this cleavage leads to the release of the light chain (LC) and both variable (Fd) and constant fragments of the heavy chain (Fc/2). Goetze et al. [8] described the use of this approach to analyze polyclonal antibodies in crude serum or after protein A treatment. In their studies, the authors separated the Fc/2 of IgG1 and IgG2 by reverse phase chromatography and analyzed them by MS, to obtain specific allotypic composition and glycosylation information on the IgGs of various patients.

Here, we describe an improved methodology to characterize the oxidation state of purified polyclonal IgGs. The chromatographic separation was optimized to increase resolution between IgG1 and IgG2, to further discriminate their oxidized forms and to separate the two minor IgG3 and IgG4 subclasses. MS was used to identify each eluted species corresponding to the different IgG subclasses and their allotypes. IVIG preparations submitted to photostability studies according to ICHQ1B guideline were analyzed and for the first time, methionine oxidation of polyclonal IgGs was monitored.

Abbreviations: IVIG, intravenous immunoglobulin; IgG, immunoglobulin G; IdeS, cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes*; PTMs, post-translational modifications; Fc/2, constant fragment of IgG heavy chain; Fd, variable fragment of IgG heavy chain; LC, light chain.

* Corresponding author. Tel.: +33 01 69 82 73 37; fax: +33 01 69 82 56 55.

E-mail addresses: chevreuxg@lfb.fr, g.chevreux@wanadoo.fr (G. Chevreux).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.053>

1570-0232/© 2014 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

2. Materials and methods

2.1. Material

IVIG preparations were provided by LFB Biotechnologies from in house batches developed for research purposes. MS grade bovine trypsin was obtained from Roche (Mannheim, Germany). The IdeS endoprotease FabRICATOR and the IgGZERO glycosidase were obtained from Genovis (Lund, Sweden). Dithiothreitol (DTT) and Iodoacetamide (IAA) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Vivapure Maxi A kit was obtained from Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Germany). Acetonitrile (MeCN) was HPLC grade reagent and purchased from JT Baker (Philipsburg, NJ, USA). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany). All the aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (18.2 M Ω cm resistivity at 25 °C, total organic carbon (TOC) < 5 ppb).

2.2. Photo oxidative stress

Photo oxidized samples were obtained by submitting IVIG preparations to light exposure at 250 W/m² between 300 and 800 nm during 42 h, using the Atlas Suntest CPS+ system (Chicago, IL, USA).

2.3. IgG4 enrichment by chromatofocusing

The chromatofocusing separation of IVIG was carried out on an AKTA Purifier system equipped with a Mono P 5/200 GL column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Elution was achieved using a gradient of solvent A (Diethanolamine 25 mM pH 9.5) and solvent B (Polybuffer 96 1/10 pH 6.0) at a flow rate of 1 ml/min. An IgG4 enriched fraction from elution between pH 6.1 and 6.4 was collected.

2.4. IgG3 enrichment using protein A column

7 mg of IVIG was diluted in a PBS solution pH 7.4 to a final volume of 10 ml and centrifuged in a Vivapure Maxi A spin column at 100 g for 30 min. The flow through containing IgG3 was recycled seven times with this process for a complete removal of IgG1, IgG2 and IgG4.

2.5. IgG fragmentation and reduction

Enzymatic proteolysis and glycolysis were achieved by incubating 10 μ l of sample at a concentration of 10 mg/ml in a phosphate saline buffer with 100 UI of IdeS and 100 UI of IgGZero enzymes for 1 h at 37 °C. Reduction of digested IgG was performed by adding 35 μ l of denaturation buffer (8 M Guanidine–HCl, Tris–HCl 0.1 M, pH 7.5) and 5 μ l of a 200 mM DTT solution. The preparation was incubated at 50 °C for 30 min.

2.6. LC–MS analysis

Separation of the Fc/2 fragments was carried out on an Acquity system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a UV detector and an electrospray mass spectrometer (Synapt G2S, Waters, Milford, MA, USA). Around 20 μ g of sample were injected on a Pursuit Diphenyl 150 mm \times 2.0 mm column (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equilibrated at 70 °C and operated at a flow rate of 200 μ l/min. An elution gradient was applied using solvent A (0.1% TFA in water) and solvent B (90% MeCN, 10% water and 0.1% TFA), after an isocratic elution at 10% B for 5 min, B was raised to 38% in 10 min and to 44% in an additional 48 min. The column was then washed for 4 min at 80% of B and further equilibrated during 9 min at 10% B. The mass

spectrometer was operated in the positive resolution mode and data were recorded from m/z 200 to 2000. Protein mass spectra were deconvoluted using MassLynx software.

2.7. Peptide mapping

Trypsin digestion for peptide mapping was performed following common procedure. The obtained peptides were injected on an Acclaim® PepMap100 C18 column (0.75 mm \times 150 mm, 3 μ m) using a U3000 nano-LC system fitted with a preconcentration setup and interfaced with a high resolution LTQ–Orbitrap mass spectrometer (ThermoFischer Scientific, Bremen, Germany) operating in the positive ion mode. The nanospray was obtained with the application of a 1.5-kV capillary voltage. The survey full scan MS was acquired in the Orbitrap analyzer at a resolving power of 30,000 (at m/z 400) and using an automated gain control (AGC) target value set to 1×10^6 charges whereas top five MS/MS spectra were acquired in the trap analyser using CID fragmentation mode and AGC target value to 2×10^4 charges.

3. Results and discussion

3.1. Separation and identification of Fc/2

Fc/2 fragments generated after IdeS treatment are the first eluted species in reverse phase chromatography due to their less hydrophobic nature in comparison with the other IgG subunits (LC and Fd). In order to maximize the chromatographic resolution between Fc/2 polypeptide chains, the gradient was performed from 38% to 44% solvent B during an extended time of 48 min while LC and Fd were eluted with the column flush. A diphenyl column was used to take advantage of its improved selectivity compared to conventional alkyl bonded phases as described by Ren et al. [9]. In order to simplify mass spectra, all samples were deglycosylated with an endoproteinase (IgGZero kit) that removes the N-glycan antenna, leaving only a fucosylated GlcNAc, bound to the polypeptide chain. Fig. 1 shows the UV chromatogram obtained after the analysis of an IVIG preparation. Four major peaks are observed, the first one eluted at 24.7 min represents 66% of the total UV area, which is consistent with IgG1 abundance in plasma. The deconvoluted mass spectrum of this peak shows a major mass at 24,140 Da that matches the theoretical mass (M_{Theo} = 24,140 Da) of the IgG1 allotype G1m3 (see Fig. 2A). Two minor masses at 24,108 Da and 24,094 Da are also observed and are in agreement with the theoretical masses of G1m17,1 (M_{Theo} = 24,108 Da) and G1m17,1,2 (M_{Theo} = 24,094 Da) allotypes respectively [8,10]. The second and third peaks of the chromatogram, eluted at 27.5 and 28.0 min respectively, represent 31% of the total UV area, which is

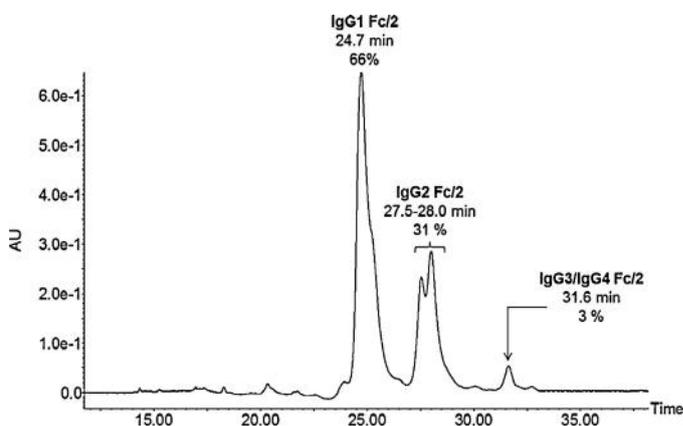


Fig. 1. Separation of Fc/2 fragments obtained after IdeS digestion and reduction of IVIG using a diphenyl column.

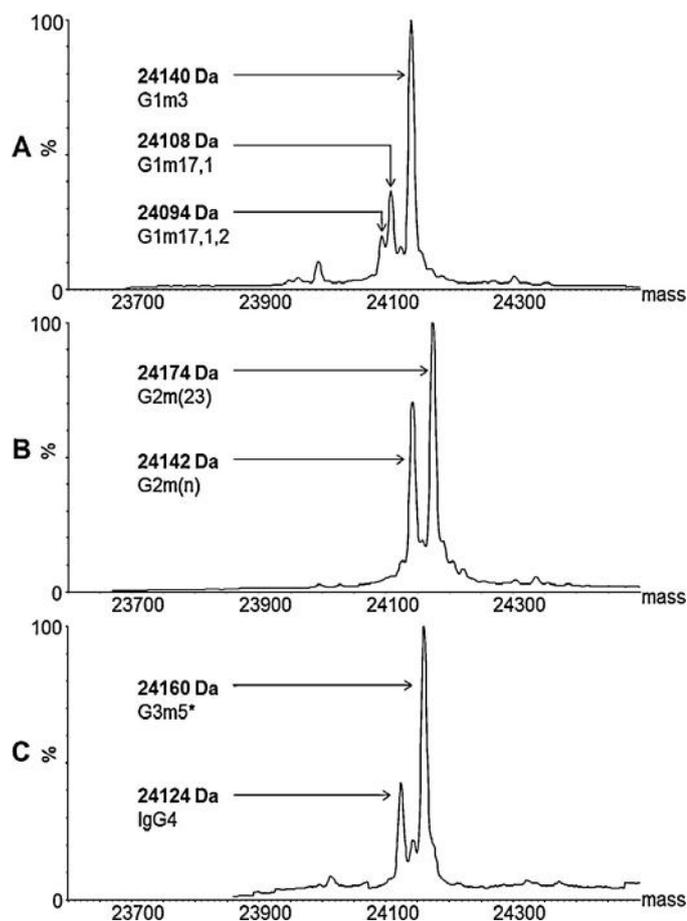


Fig. 2. Deconvoluted mass spectra of IVIG Fc/2. Panels A to C represent mass spectra of IgG1 (A), IgG2 (B) and IgG3/IgG4 (C). Peaks are labeled with experimental average molecular masses and corresponding allotypes.

consistent with IgG2 abundance in plasma. The deconvoluted mass spectrum of these two peaks shows masses of 24,142 and 24,174 Da (see Fig. 2B) that match the theoretical masses of the IgG2 allotypes G2m(n) ($M_{\text{theo}} = 24,142$ Da) and G2m(23) ($M_{\text{theo}} = 24,174$ Da), respectively. The last peak observed in Fig. 1, eluted at 31.6 min represents 3% of the total UV area; this peak shows a major mass at 24,160 Da and a minor one at 24,124 Da (see Fig. 2C). The mass of 24,160 Da could correspond to the most common IgG3 allotype G3m5* considering a substitution of Tyr₂₉₆ by Phe₂₉₆ (Y₂₉₆FEU numbering) described as the most prevalent form in the French population [11]. The secondary mass of 24,124 Da is consistent with the Fc/2 theoretical mass ($M_{\text{theo}} = 24,124$ Da) of the unique IgG4 amino acid sequence described (see supplementary data). Fc/2 of polyclonal IgG3 and IgG4 have never been investigated by MS. We intended to confirm their identification by dedicated enrichment steps of these two populations followed by LC–MS analysis.

3.2. IgG3 and IgG4 identification

Enrichment of IgG3 was carried out using a protein A spin column, known to bind IgG3 with less efficacy than the other subclasses. Fig. 3A displays the deconvoluted mass spectrum corresponding to the enriched IgG3 sample with a major mass of 24,160 Da. The chromatogram in insert shows a significant increase of the last peak (RT = 31.6 min). This result confirms the attribution of the mass at 24,160 Da to the IgG3 subclass. To confirm the hypothesis of a Y₂₉₆F mutation of the G3m5* allotype, IgG3 were collected from the peak eluted at 31.6 min and analyzed by nanoLC–MS/MS after trypsin digestion. The glycosylated peptide [T₂₈₉ KPREEQF₂₉₆NSTFR₃₀₁] was identified at a

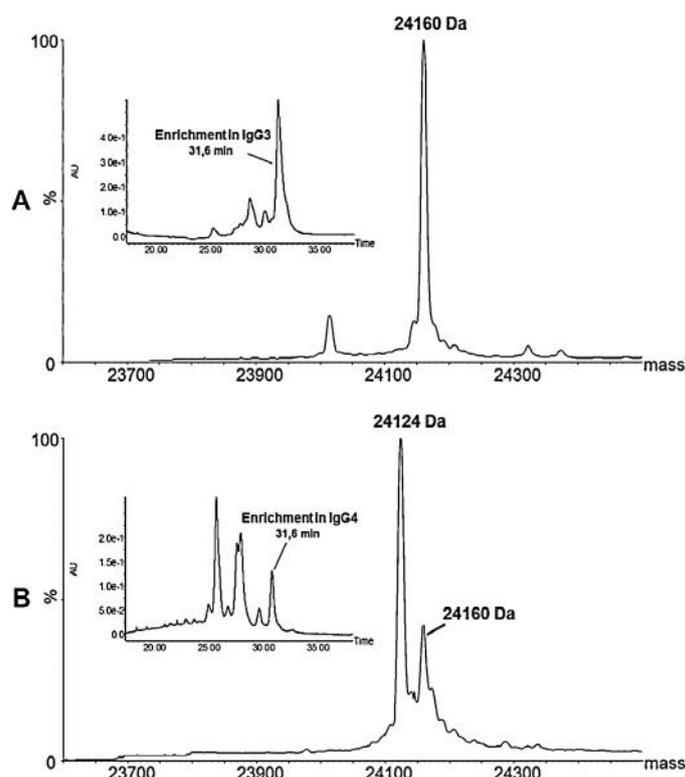


Fig. 3. Deconvoluted mass spectra of Fc/2 IgG3 (A) and IgG4 (B). Inserts represent Fc/2 chromatograms of enriched samples using a protein A spin column (A) and chromatofocusing (B).

mass of 1987.9654 Da, hence confirming the Y₂₉₆F substitution ($M_{\text{theo}} = 1987.9484$). Additionally, specific peptides of the IgG3 allotype were retrieved in this experiment.

Next, IgG4 were enriched by chromatofocusing as they display a lower isoelectric point than the other IgG subclasses. The more acidic chromatofocusing fractions of IVIG have been analyzed on the diphenyl column, results are displayed in Fig. 3B. The chromatogram in insert shows a significant increase of the last peak (RT = 31.6 min). Furthermore, a dramatic increase of the mass at 24,124 Da was observed on the deconvoluted mass spectrum relatively to Fig. 2C, hence confirming the presence of IgG4 in this last peak. As previously described, the peak eluted at 31.6 min was collected and analyzed by peptide mapping and the identification of the IgG4 subclass was confirmed. All these results allow complete identification of the different IgG subclasses and monitoring of their oxidized forms during photostability studies.

3.3. Analysis of Fc/2 oxidation

The photostability of IVIG was investigated according to regulatory requirements and oxidation was monitored by the LC–MS method described above. Fig. 4 displays the chromatogram of a stressed IVIG sample. Three additional peaks are chromatographically resolved comparing to the native sample. The first eluted peak (RT = 22.5 min) presents a deconvoluted mass spectrum (see Fig. 5A) with a major mass of 24,172 Da and two minor masses of 24,140 and 24,126 Da. These masses display a mass shift of exactly +32 Da compared to those observed for native IgG1 allotypes (see Fig. 2A), this mass shift corresponds to doubly oxidized IgG1 allotypes. The deconvoluted mass spectrum of the second eluted peak (RT = 23.8 min) presents a more complex profile with the presence of oxidized forms belonging to both IgG1 and IgG2 subclasses (see Fig. 5B). Indeed, masses at 24,156, 24,124 and 24,110 Da correspond to the three IgG1 allotypes with a mass shift of +16 Da consistent with a single oxidation. The mass at 24,222 Da corresponds to the

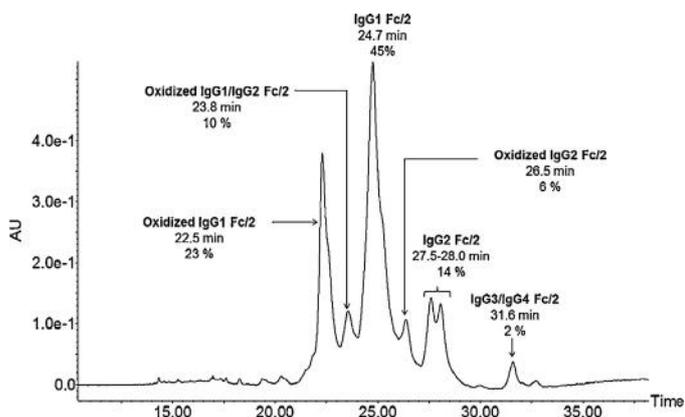


Fig. 4. Separation of Fc/2 fragments obtained after IdeS digestion and reduction of photo oxidized IVIG using a diphenyl column.

G2m(23) allotype with a mass shift of +48 Da consistent with three oxidations. The deconvoluted mass spectrum of the additional peak observed at RT = 26.5 min is displayed in Fig. 5C. This mass spectrum shows a major mass at 24,190 Da corresponding to the G2m(23) allotype with a mass shift of +16 Da indicating one oxidation, the oxidized form of the G2m(n) allotype is also detected in lower abundance at 24,158 Da. Finally, a thorough study of the deconvoluted mass spectrum corresponding to the major peak (RT = 24.7 min) highlights two additional masses comparatively to the mass spectrum of native IgG1 allotypes (data not shown). These two masses of

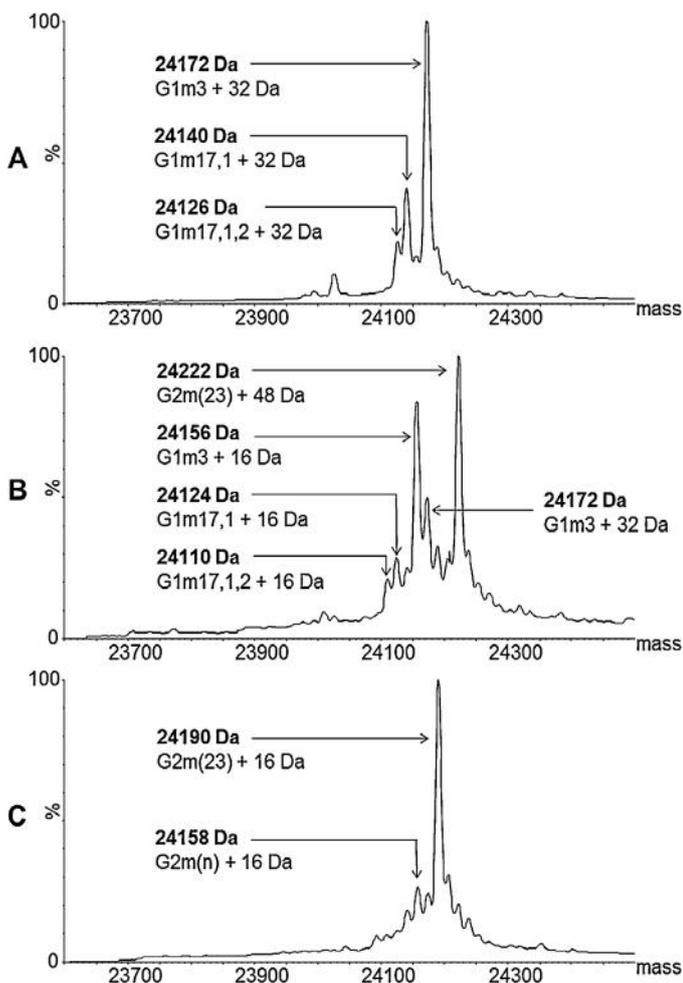


Fig. 5. Deconvoluted mass spectra of photo-oxidized IVIG Fc/2. Panels A to C represent mass spectra of oxidized IgG1 (A), oxidized IgG1/IgG2 (B) and oxidized IgG2 (C). Peaks are labeled with experimental average molecular masses and corresponding oxidized forms.

24,206 and 24,174 Da correspond to the doubly oxidized IgG2 allotypes. The co-elution of these IgG2 forms with non-modified IgG1 is consistent with the fact that mono- and triply oxidized forms of IgG2 are eluted on both sides of the native IgG1 peak. Finally, the elution of all the identified oxidized forms was also consistent with their anticipated decrease of hydrophobicity following oxidation.

Monoclonal IgG oxidation is largely described in the literature; indeed, the Fc region of antibodies is especially reported to contain two solvent exposed methionines particularly sensitive to oxidation: Met₂₅₂ and Met₄₂₈ [12–14]. In this study, all IgG1 allotypes were detected with up to two oxidations. Peptide mapping data confirmed oxidation of Met₂₅₂ and Met₄₂₈, including for the G1m3 allotype which contains an additional Met in position 358 hence indicating that Met₃₅₈ was non-oxidized (data not shown). This result is in accordance with its buried position inside the Fc [13,14]. Considering IgG2 allotypes, G2m(n) contains four methionines on its Fc/2 among which, up to two oxidations were detected. G2m(23) contains an additional methionine in position 282 and was observed with up to three oxidations. As described in the literature [13], Met₂₅₂ and Met₄₂₈ are preferentially oxidized for both G2m(n) and G2m(23) and our results suggest that Met₂₈₂ of G2m(23) is the additional methionine susceptible to oxidation in this allotype.

4. Conclusion

In this study, we present a LC–MS method to monitor the oxidation of polyclonal IgGs. IVIG preparations were submitted to IdeS enzymatic proteolysis and Fc/2 were separated on a diphenyl column and identified by MS. The method was then used to precisely monitor their methionine oxidation after photo-induced degradation. Significant oxidation was detected on IgG₁ and IgG₂ allotypes, indicating that polyclonal IgGs are very sensitive to the light stress described in the pharmacopeia. To our knowledge, this is the first time that such an approach to monitor oxidation of polyclonal IgGs is described. This method should find applications during formulation and stability studies.

Acknowledgements

The authors would like to thank Catherine Groseil, Maxime Jube and Mélanie Guilleminault for their support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.053>.

References

- [1] K. Darabi, O. Abdel-Wahab, W.H. Dzik, *Transfusion (Paris)* 46 (2006) 741.
- [2] H.P. Hartung, L. Mouthon, R. Ahmed, S. Jordan, K.B. Laupland, S. Jolles, *Clin. Exp. Immunol.* 158 (Suppl. 1) (2009) 23.
- [3] E. Shacter, *Drug Metab. Rev.* 32 (2000) 307.
- [4] M.L. Hu, A.L. Tappel, *Photochem. Photobiol.* 56 (1992) 357.
- [5] E.T. Duenas, R. Keck, A. De Vos, A.J. Jones, J.L. Cleland, *Pharm. Res.* 18 (2001) 1455.
- [6] G. Chevreux, N. Tilly, N. Bihoreau, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 212.
- [7] U. von Pawel-Rammingen, B.P. Johansson, L. Bjorck, *EMBO J.* 21 (2002) 1607.
- [8] A.M. Goetze, Z. Zhang, L. Liu, F.W. Jacobsen, G.C. Flynn, *Mol. Immunol.* 49 (2011) 338.
- [9] D. Ren, G. Pipes, G. Xiao, G.R. Kleemann, P.V. Bondarenko, M.J. Treuheit, H.S. Gadgil, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 198.
- [10] R. Jefferis, M.P. Lefranc, *MAbs* 1 (2009) 332.
- [11] P. Dard, M.P. Lefranc, L. Osipova, A. Sanchez-Mazas, *Eur. J. Hum. Genet.* 9 (2001) 765.
- [12] H. Liu, G. Gaza-Bulsecu, L. Zhou, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 525.
- [13] H. Pan, K. Chen, L. Chu, F. Kinderman, I. Apostol, G. Huang, *Protein Sci.* 18 (2009) 424.
- [14] C. Chumsae, G. Gaza-Bulsecu, J. Sun, H. Liu, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 850 (2007) 285.

3. Etude de l'effet d'excipients saccharidiques sur la glycation d'IgG polyclonales et de leur stabilité

I. Résumé de l'article

Les immunoglobulines intraveineuses sont composées d'immunoglobulines G polyclonales purifiées à partir de plasma sanguin et utilisées pour traiter des déficits immunitaires ou des maladies auto-immunes. Les nouvelles générations d'IGIV sont commercialisées sous forme liquide et les excipients utilisés pour maintenir leur stabilité en solution sont généralement des sucres qui, dans certaines conditions, peuvent interagir avec la protéine au travers de réactions de glycation. La glycation est une réaction chimique intervenant entre la fonction aldéhyde d'un sucre réducteur et la fonction amine d'un acide aminé (réaction de Maillard), avec pour conséquence une possible altération de la structure et de la fonction biologique des protéines modifiées. Les sucres fixés sur les protéines peuvent également subir des modifications au cours du temps conduisant à la formation de produits avancés de glycation, ou AGE : Advanced Glycation End-products. Contrairement aux anticorps monoclonaux, la glycation des IgG polyclonales est très peu documentée malgré le nombre important d'IGIV commerciales contenant des sucres réducteurs comme excipients. Cela s'explique en grande partie par le niveau important d'hétérogénéité de ce type de produit biopharmaceutique, lié à la variabilité de la partie Fab des IgG, rendant leur caractérisation difficile. Des méthodes ont cependant été décrites pour caractériser les fragments Fc/2 des IgG polyclonales obtenus après clivage enzymatique. Considérant la nature non-enzymatique des réactions de glycation, les sites de glycation peuvent être distribués sur l'ensemble de la séquence des protéines, et les fragments Fc/2, seules parties analysables des IGIV, peuvent constituer des marqueurs fiables du niveau de glycation. Dans cette étude, quatre formulations d'IGIV ont été élaborées, deux avec des sucres non-réducteurs (saccharose et tréhalose) et deux avec des sucres réducteurs (glucose et maltose), puis le taux de glycation des préparations d'IGIV a été suivi par LC-MS sur 6 mois à quatre températures différentes (5, 25, 30 et 40°C).

Caractérisation de la glycation des fragments Fc/2

La spectrométrie de masse a fourni une résolution suffisante pour détecter l'addition covalente d'un ou plusieurs sucres sur les fragments Fc/2 d'IgG polyclonales. Des variations de masse de

+324 Da et +162 Da correspondent respectivement à l'addition d'un disaccharide et d'un monosaccharide sur la chaîne polypeptidique, permettant un suivi fiable du taux de glycation des IGIV. Les sites de glycations ont été identifiés par LC-MS/MS (carte peptidique) après un mois de conservation à 40°C pour les échantillons formulés avec du maltose ou du glucose. Trois principaux sites de glycation du fragment Fc/2 des IgG polyclonales ont été identifiés. Ce sont les Lys₂₄₆, Lys₂₄₈ et Lys₃₂₄. La détection de ces sites est cohérente avec les sites de glycation déjà identifiés dans la littérature pour des anticorps monoclonaux.

Le suivi du taux de glycation des IGIV est réalisé par une analyse LC-MS mensuelle pour toutes les températures et toutes les formulations. En considérant un facteur de réponse identique pour toutes les espèces, les pourcentages relatifs des formes glyquées versus non-glyquées sont estimés à partir des intensités des pics des spectres de masse déconvolués. Les résultats obtenus montrent des taux de glycation étonnamment élevés pour les IGIV formulées avec des sucres réducteurs à une température et pour une durée de stockage préconisées par les fabricants (25°C pendant 6 mois), avec l'identification de jusqu'à trois molécules de sucres fixées par fragment Fc/2. De même, une légère augmentation du taux de glycation des IGIV formulées avec du glucose et du maltose est observée pour les produits stockés à 5°C sur période de 6 mois. Ainsi, même à faible température (5°C), les réactions de glycation sont ralenties mais pas supprimées. Tout au long de l'étude, une réactivité plus importante du glucose par rapport au maltose est observée. Ceci est cohérent avec les connaissances générales de la réaction de Maillard selon lesquelles la taille des sucres réducteurs a un impact sur leur réactivité. A l'inverse, les IGIV formulées avec des sucres non-réducteurs présentent une stabilité très satisfaisante. Aucune réaction de glycation n'est observée pour les IGIV formulées avec du tréhalose, même pour la température la plus élevée (40°C) au bout de 6 mois. Concernant le saccharose, une légère augmentation de la glycation est observée à partir de 4 mois à 40°C, certainement à cause de l'hydrolyse du disaccharide et donc de la libération de glucose dans le milieu.

La glycation est une réaction indésirable conduisant à glyquer des protéines avec pour conséquence une modification permanente de leurs propriétés physico-chimiques pouvant altérer leur structure et leur activité biologique. En se basant sur des travaux rapportés dans la littérature, les résultats de cette étude montrent que des IVIG formulées avec des sucres

réducteurs et stockées dans des conditions préconisées par les fabricants peuvent conduire à des niveaux de glycation d'IgG proches de ceux observés chez des sujets diabétiques ne contrôlant pas correctement leur glycémie. Alors qu'il existe encore à l'heure actuelle de nombreuses IGIV commerciales formulées sous forme liquide avec des sucres réducteurs, cette étude, menée grâce à une nouvelle méthode analytique, souligne les risques associés à la formulation de protéines à haute concentration telles que les IGIV avec ce type de sucres.

II. Publication

Cette étude a été publiée dans *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* :

Y. Leblanc, N. Bihoreau, M. Jube, M.H. Andre, Z. Tellier, G. Chevreux, Glycation of polyclonal IgGs: Effect of sugar excipients during stability studies, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 102 (2016) 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.03.016>.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Technical note

Glycation of polyclonal IgGs: Effect of sugar excipients during stability studies



Y. Leblanc, N. Bihoreau, M. Jube, M.-H. Andre, Z. Tellier, G. Chevreux*

LFB Biotechnologies, 3 avenue des Tropiques, 91958 Courtabœuf (Les Ulis), France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2016

Revised 7 March 2016

Accepted in revised form 14 March 2016

Available online 15 March 2016

Keywords:

Mass spectrometry

Excipients

Glycation

Immunoglobulin

Protein formulation

IVIg

Maillard reaction

ABSTRACT

A number of intravenous immunoglobulin preparations are stabilized with sugar additives that may lead over time to undesirable glycation reactions especially in liquid formulation. This study aimed to evaluate the reactivity of sugar excipients on such preparations in condition of temperature, formulation and concentration commonly used for pharmaceutical products. Through an innovative LC-MS method reported to characterize post-translational modifications of IgGs Fc/2 fragments, a stability study of IVIg formulated with reducing and non-reducing sugars has been undertaken. The rate of polyclonal IgGs glycation was investigated during 6 months at 5, 25, 30 and 40 °C. High levels of glycation were observed with reducing sugars such as glucose and maltose in the first months of the stability study from 25 °C. Non-reducing sugars presented a low reactivity even at the highest tested temperature (40 °C). Furthermore, a site by site analysis was performed by MS/MS to determine the glycation sites which were mainly identified at Lys₂₄₆, Lys₂₄₈ and Lys₃₂₄. This work points out the high probability of glycation reactions in some commercialized products and describes a useful method to characterize IVIg glycated products issued from reducing sugar excipients.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations are mainly composed of polyclonal immunoglobulin G (IgGs); these products are purified from plasma and used to treat a number of humoral immune deficiencies associated with recurrent infections and an increasing number of autoimmune disorders. New generation of these therapeutics is presented in a liquid formulation that is more easy-to-use than freeze-dried products. Worldwide marketed IVIg preparations are largely stabilized by sugars excipients [1] (see [Supplementary Table 1](#)), which can lead over time to undesirable glycation reactions. Glycation is a non-enzymatic process in which reducing sugars are covalently attached to proteins by a condensation reaction between the aldehyde groups of reducing sugars and primary or secondary amines of amino acids. The reaction results in the formation of an unstable, reversible Schiff base intermediate (aldimine), which may undergo an Amadori rearrangement to form a stable ketoamine (the Amadori product). This reaction of

glycation may affect protein structure and function, and may lead to the formation of advanced glycation end products (AGEs) [2].

Glycation of monoclonal IgGs has been investigated in several studies. Glycation reactions were shown to occur during the upstream production process due to the presence of feeding sugars and reactivity was shown to be antibody dependent [3]. Stability studies of monoclonal IgGs long-term stored at 2–8 °C in the presence of sucrose revealed non-significant glycation while this modification was observed at room temperature with dextrose [4]. Glycation of polyclonal IgGs is far less documented, perhaps because of the analytical complexity inherent to these heterogeneous proteins, limiting the use of mass spectrometry. Vrdoljak et al. reported the use of radioactive D-[U-¹⁴C]-glucose to monitor *in vitro* glycation of polyclonal IgGs under pseudo-physiological/diabetic conditions [5]. As expected, they found more glycation of IgGs under pseudo-diabetic conditions than under pseudo-physiological ones. They also found that glycation can occur under long-term storage at 4–8 °C, in the presence of glucose. In 2014, a LC-MS method has been reported to investigate post-translational modifications on the constant fragment (Fc/2) of polyclonal IgGs, generated after IdeS enzymatic proteolysis [6]. Considering the non-enzymatic nature of glycation reactions, glycation sites could be distributed all over the protein sequence. Therefore, the

Abbreviations: IVIg, intravenous immunoglobulin; IgGs, immunoglobulins G; AGEs, advanced glycation end products; RT, retention time.

* Corresponding author.

E-mail address: chevreuxg@lfb.fr (G. Chevreux).

constant Fc/2 fragment, which is the only analyzable part of polyclonal IgGs by LCMS, was considered as a reliable marker of the overall IVIg glycation state.

In this study, the formulation of a 5% IVIg product was modified in order to generate different formulations in which the stabilizing sugar was the only variable excipient. Two reducing sugars (maltose and glucose) and two non-reducing sugars (sucrose and trehalose) were used to generate 4 formulations and the glycation level of such formulated IgGs was monitored by LC-MS for 6 months at different temperatures commonly used for stability studies (5, 25, 30 and 40 °C according to ICHQ1A guideline). For the first time, the differential reactivity of sugars on polyclonal IgGs, *i.e.* the glycation rate, was studied using storage temperatures, formulation and concentration test parameters, chosen to be representative of real life conditions and usages of IVIg.

2. Material and methods

2.1. Material

MS grade bovine trypsin was obtained from Roche (Mannheim, Germany). The IdeS endoprotease FABRICATOR and the IgZERO glycosidase were obtained from Genovis (Lund, Sweden). Dithiothreitol (DTT), Iodoacetamide (IAA), Glucose, Trehalose, Maltose and Sucrose were obtained from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetonitrile (MeCN) was HPLC reagent grade and purchased from JT Baker (Philipsburg, NJ, USA). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany). All the aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (18.2 MΩ cm resistivity at 25 °C, total organic carbon (TOC) < 5 ppb).

2.2. IgGs formulation and storage

Polyclonal IgGs derived from human plasma (purification based on ethanolic and caprylic acid precipitations) were used to generate 5% liquid IVIg preparations, buffered at pH 6 with sodium hydroxide, in the presence of either 10% w/v maltose, sucrose, trehalose and 5.3% w/v glucose corresponding to an equivalent molar concentration of 292 mM for all sugars. All samples were sterile filtered in laminar flow hood, aliquoted for each time point in 1.5 ml glass vials (1 ml/vial) and stored at 5, 25, 30 and 40 °C for a 6 months stability study. The climatic chambers used during the stability were qualified and temperature controlled.

2.3. IgG enzymatic digestion and reduction

5% liquid IVIg preparations were diluted with ultra-pure water to an IgGs final concentration of 10 g/l. Enzymatic proteolysis and deglycosylation of IgGs were carried out by simultaneously incubating 10 µl of samples during 1 h at 37 °C with 100 UI of IdeS enzyme to generate Fc/2 fragments and 100 UI of IgGZero enzyme to leave only a fucosylated GlcNAc bound to the polypeptide chain. Reduction of digested IgG was performed by adding 35 µl of denaturation buffer (8 M Guanidine-HCl, Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5) and 5 µl of a 200 mM DTT solution. The preparation was incubated at 50 °C for 30 min and subsequently analyzed by LC-MS.

2.4. LC-MS analysis

Separation of the Fc/2 fragments was carried out on an Acquity system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a UV detector and an electrospray mass spectrometer (Synapt G2S, Waters, Milford, MA, USA). 20 µg of sample was injected on a Pursuit Diphenyl 150 mm × 2.0 mm column (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

equilibrated at 70 °C and operated at a flow rate of 200 µl/min. An elution gradient was applied using solvent A (0.1% TFA in water) and solvent B (90% MeCN, 10% water and 0.1% TFA), and after an isocratic elution at 10% B for 5 min, B was raised to 38% in 10 min and to 44% in an additional 48 min. The column was then washed for 4 min at 80% of B and further equilibrated during 9 min at 10% B. The mass spectrometer was operated in the positive resolution mode and data were recorded from *m/z* 500 to 3000. Protein mass spectra were deconvoluted using the MassLynx software. The capability of the method was addressed by a triplicate analysis of seven samples presenting glycation rates distributed over the whole range of the analytical procedure. Coefficients of variation lower than 10% were obtained for each point (see [Supplementary Table 2](#)).

2.5. Peptide mapping

200 µg of sample was vacuum-dried and dissolved in 25 µL of 8 M urea, and 0.2 M ammonium acetate solution pH 7.2. Reduction was accomplished by adding 10 µL of a 200 mM DTT solution in water and incubating the resulting mixture for 15 min at 55 °C. After cooling at room temperature, 10 µL of a 400 mM IAA solution in water was added and the solution was incubated for 15 min in the dark. After a fourfold dilution with water, digestion with trypsin (1:10, w/w) was performed overnight at 37 °C. The obtained peptides were injected on a Waters CSH C18 column (2.1 × 150 mm, 3 µm) using an Acquity system coupled to an electrospray mass spectrometer Synapt G2-S (Waters, Milford, MA, USA) operating in the positive ion mode. The spray voltage and the source temperature were set at 3 kV and 80 °C, respectively. MS/MS data were acquired with the instrument operating in the data-dependent mode.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of glycated Fc/2

Glycation of polyclonal IgGs was monitored by LC-MS for each temperature on a monthly period. Mass spectrometry provides enough resolution to observe the covalent addition of one or several sugars, under their aldimine or ketoamine forms, to the Fc/2 protein backbone. Reversible aldimine content can be influenced by sample preparation but in the time window of the present study (over 6 months), stable ketoamines contribute mostly to the total glycation content [7]. This MS based method is thus well designed to follow the total glycation state of IVIg during monthly stabilities. [Fig. 1](#) shows examples of deconvoluted mass spectra obtained for the IgG1 subclass from two distinct formulations, respectively with maltose (A) and glucose (B) and stored during 3 months at 25 °C. Masses of 24,140 Da and 24,108 Da correspond to the Fc/2 fragments of allotypes G1m3 and G1m1, 17 respectively. The mass spectrum of [Fig. 1A](#) shows uniform mass additions of +324 Da corresponding to the covalent attachment of the disaccharide and the mass spectrum of [Fig. 1B](#) shows uniform mass additions of +162 Da in keeping with the covalent attachment of the reducing monosaccharide. The method is thus fully suitable for the monitoring of glycation due to reducing sugars directly available in the formulation or indirectly through hydrolysis of non-reducing sugars (sucrose or trehalose) into their reducing components.

3.2. Identification of glycated sites

Peptide mapping was used to identify the glycated sites detected after 1 month stability at 40 °C in the presence of glucose or maltose. Three major sites were detected on the Fc/2 of

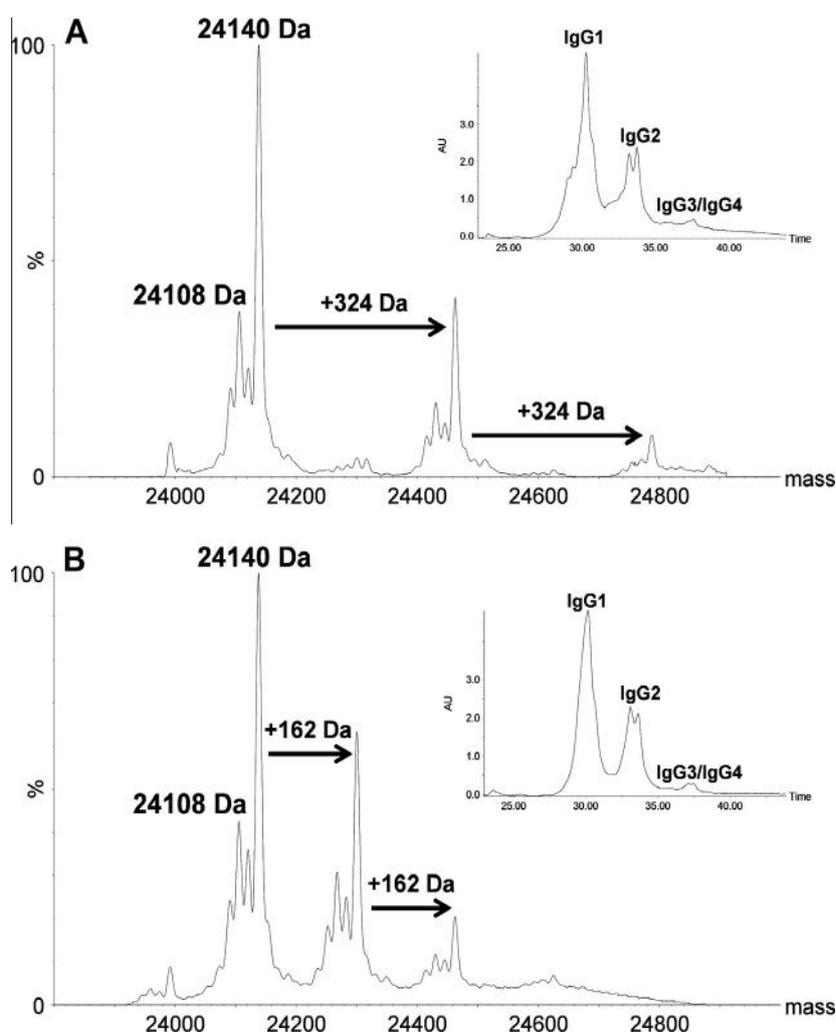


Fig. 1. IgG1 Fc/2 deconvoluted mass spectra of IVIg formulated with maltose (A) and glucose (B) stored 3 months at 25 °C. Inserts represent Fc/2 chromatograms.

polyclonal IgGs at Lys₂₄₆, Lys₂₄₈ and Lys₃₂₄. Fig. 2 displays MS/MS spectra of the two identified peptides carrying the abovementioned glycation sites. Fig. 2A shows the MS/MS mass spectrum of [Gly₂₃₇–Arg₂₅₅] peptide. The sequence of the peptide is widely covered by y ions and, interestingly, y₉ fragments are observed as a mixture of naked, pyrylium and furylium ions, the latter being characteristics of the dissociation pathway of aldohexoses-derived Amadori compounds [8]. After y₁₀ all the fragments were identified as pyrylium and furylium ions exclusively which indicates that the selected precursor ion corresponds to a mixture of glycated species at both Lys₂₄₆ and Lys₂₄₈ positions. It can be noticed that this precursor ion gave a single chromatographic peak in spite of its structural heterogeneity. Fig. 2B shows the MS/MS mass spectrum of [Cys₃₁₉–Lys₃₃₂] peptide. Fragments b₇ to b₁₀ and y₁₁ to y₁₃ were identified as pyrylium and furylium ions, indicating a glycated site at Lys₃₂₄ position. Finally, these glycation sites were found to be consistent with those already described in the literature for monoclonal antibodies [7]. Other minor glycation sites (in terms of peptide intensity) were also detected on the CH1 domain of IgGs, on Lys₁₄₃ residue of the heavy chain and on Lys₁₂₆ and Lys₁₄₉ residues of the light chain (data not shown).

3.3. Kinetics of IVIg glycation

To monitor glycation, an LC-MS analysis was performed for each temperature, formulation and time point. The peak intensities of the deconvoluted mass spectra were used to determine a percentage of glycated versus non-glycated IgGs. Assuming a similar MS

response factor for all the detected species, glycated IgGs were defined as the sum of forms detected with at least one glycation adduct over the total signal. Fig. 3 reviews data collected at 25 °C for the 4 formulations. Surprisingly, formulations using reducing sugars show a high degree of glycation over time at a widely used storage temperature (see Fig. 3A and B) with up to 3 binding sugars detected per Fc/2. On the contrary, glycation is not observed even after 6 months at 25 °C with formulations based on sucrose and trehalose excipients (see Fig. 3C and D). Fig. 4 provides a summary of all the data collected during the study. Analysis of samples at T0 revealed a residual glycation rate of approximately 2.7%, reflecting probably an *in vivo* baseline glycation level. After 1 month at 5 °C, 25 °C, 30 °C and 40 °C, respectively 3.9%, 22.3%, 37.1% and 85.9% of IgGs Fc/2 were glycated with the glucose excipient, and these values increased to 8.3%, 76.8%, 91.8% and 100% after 6 months. The rate of glycation increased with temperature and followed perfectly the Arrhenius law with a straight line observed by plotting the logarithm of the glycation percentage against inverse temperature (see kinetic rates of glycation in Supplementary Table 3). Furthermore, for each temperature, the time dependence of glycation fitted well a first order kinetic reaction, as expected for the Maillard reaction. At all points, the reactivity of glucose was slightly greater than the one of maltose. This difference of reactivity between glucose and maltose is consistent with the overall knowledge of the Maillard reaction. Indeed, the reactivity of the reducing sugars depends on their size, pentoses being more reactive than hexoses and hexoses like glucose being more reactive than disaccharides like maltose. It can be noticed that only highly glycated

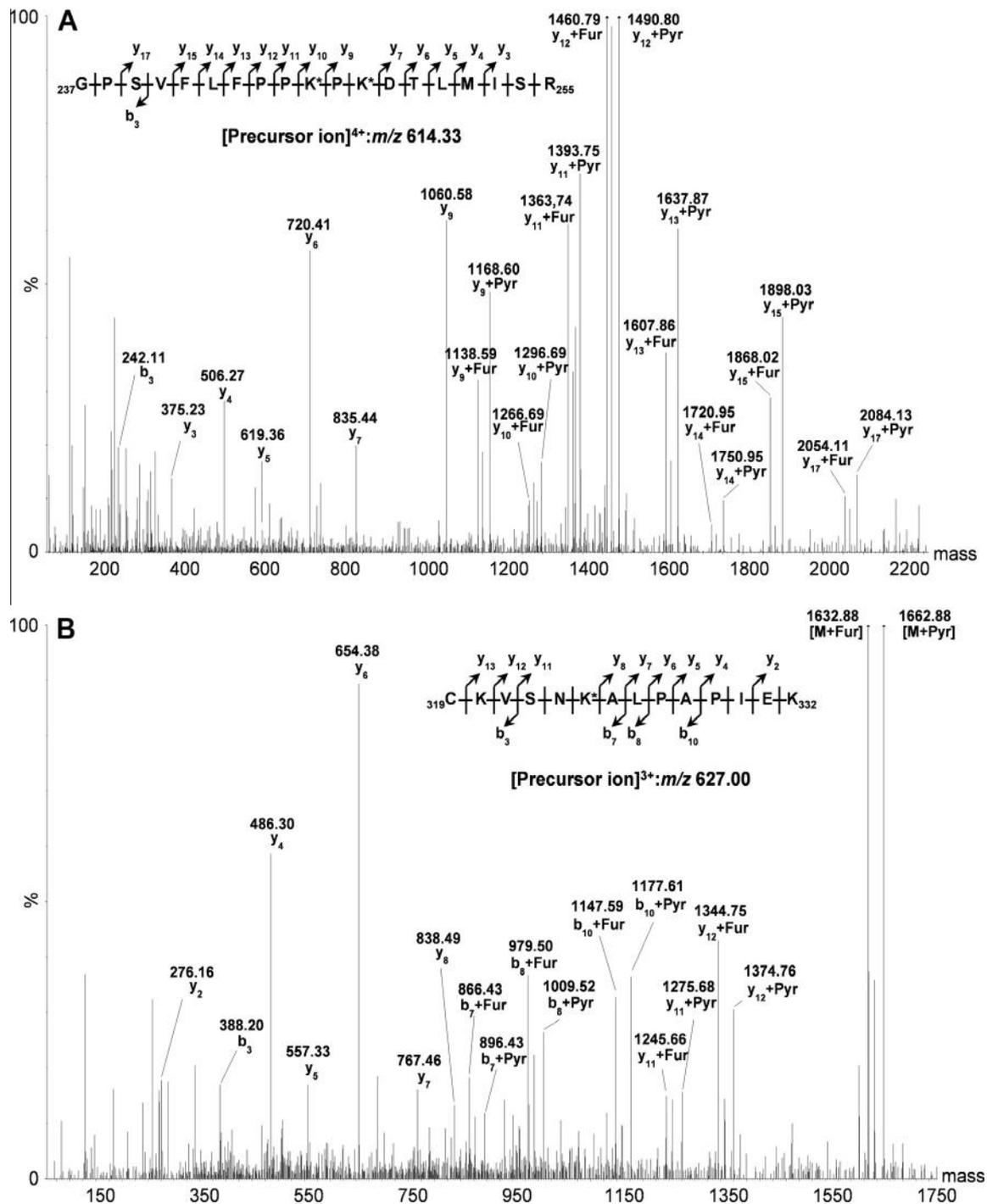


Fig. 2. MS/MS spectra of peptide [Gly₂₃₇–Arg₂₅₅] glycosylated on Lys₂₄₆ or Lys₂₄₈ (panel A) and peptide [Cys₃₁₉–Lys₃₃₂] glycosylated on Lys₃₂₄ (panel B) from IgGs formulated with maltose and stored 1 month at 40 °C.

samples obtained after 3 months at 40 °C with glucose displayed a higher content of aggregates (see [Supplementary Table 4](#)). Interestingly, even at the temperature of 5 °C, a slight increase of glycation is observed over time with glucose and maltose suggesting that even this low storage temperature is not a guarantee of preventing glycation when reducing sugars are used as excipients. This result is in keeping with Vrdojlik et al. [5], reporting IgG glycation after long term storage at 4–8 °C in the presence of glucose. Instead, formulations based on sucrose and trehalose excipients were relatively stable. No glycation reactions were observed with trehalose even at the highest temperature and the last time point of the stability study. However, with the sucrose excipient, a detectable increase of glycation was observed after 4 months at 40 °C (9.6%) and con-

firmed with latter time points (18.3% after 6 months storage). The glycation observed with sucrose (adding of a single monosaccharide of +162 Da) is probably the result of an initial hydrolysis of the non-reducing sugar that releases reducing glucose in the media. This result confirms data from the food industry indicating that trehalose is more stable than sucrose.

Glycation is an undesirable reaction that binds covalently sugar molecules on primary/secondary amine functions distributed all over the protein sequence. This kind of reaction modifies permanently the physicochemical properties of proteins and may induce changes of conformation, stability and activity [9]. Uncontrolled high blood sugar concentration leads to glycation of blood proteins and to various *diabetes* complications. Vrdojlik et al. [5] estimated

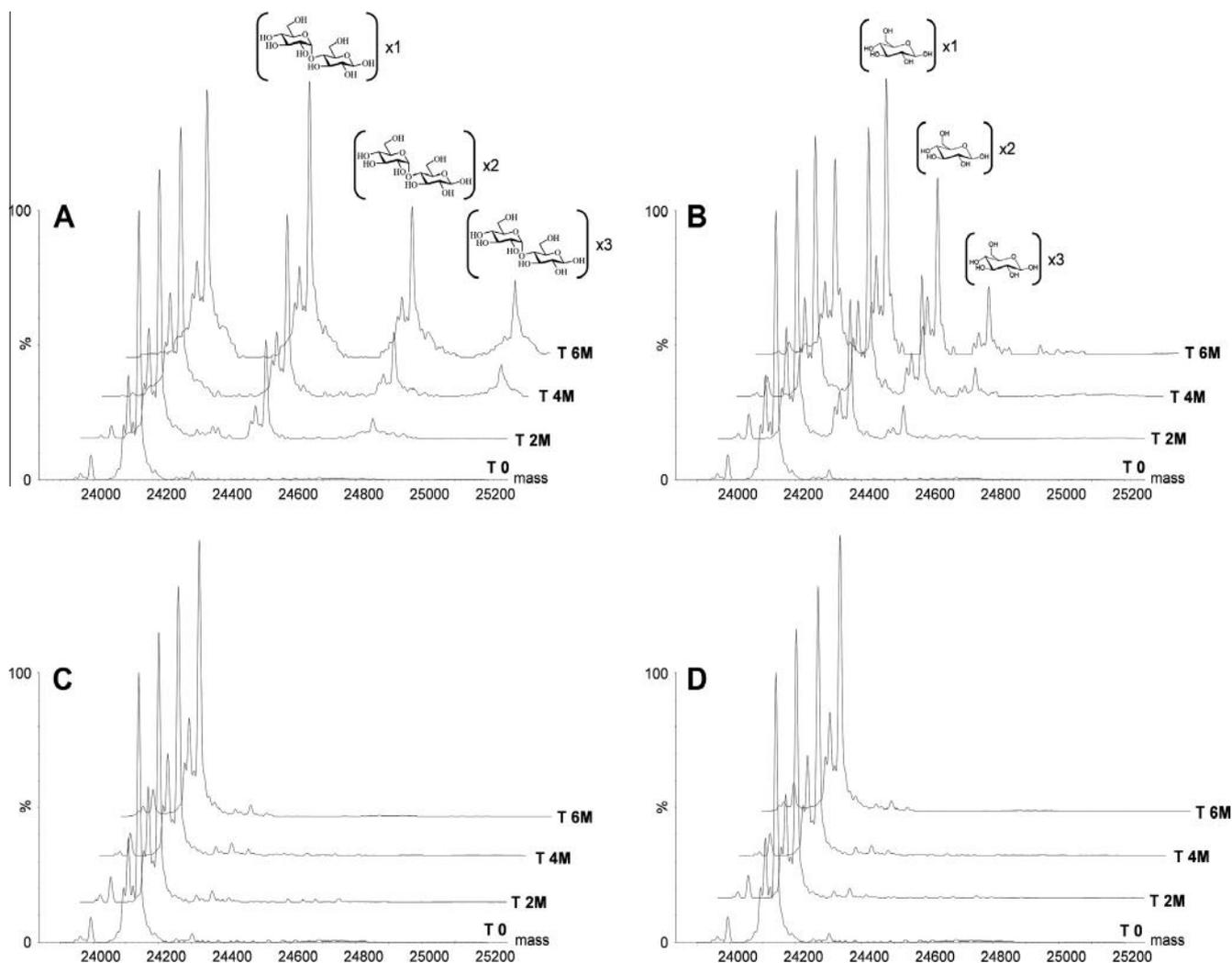


Fig. 3. IgG1 Fc/2 deconvoluted mass spectra of samples formulated with maltose (A), glucose (B), sucrose (C) and trehalose (D) stored from 0 to 6 months at 25 °C.

in vitro, by the use of radioactive D-[U-¹⁴C]-glucose, the number of glucose molecules bound per IgG to an average of 3.1 after incubation with glucose in the concentration characteristic for diabetics. In another study, Lapolla et al. [10] ranged from 7 to 28 the number of glucose units condensed on IgGs from badly controlled diabetic patients, using MALDI-MS. The present LC-MS method has the advantage to visually observe the addition of single glucose units to the Fc/2 of IgGs and our data indicate that IVIg products stored with reducing sugars at 25 and 30 °C can reach the same range of glucose addition as diabetics. Kennedy et al. have shown that glycation could restrain the binding of IgGs to their antigens and increase their clearance rate in mice [11]. An increase in permeability of glycated proteins across the blood-nerve barrier has been observed from patients with diabetic polyneuropathy [12] and Brownlee et al. [13] demonstrated a clear increase of trapped IgM and IgG in peripheral nerve myelin from diabetics which has been suggested to have detrimental effects on nerve functions. These reports raise the hypothesis of a possible relationship between the glycation status of pharmaceutical products and their tolerability.

4. Conclusion

Sugars are widely used by pharmaceutical companies for the stabilization of highly concentrated proteins, but to our knowledge, the glycation state of IVIg in pharmaceutical conditions of

stability has never been documented so far. This work investigates sugar excipients reactivity on IVIg and describes a MS-based method that is appropriate to monitor routinely the glycation status of IVIg as it is required for monoclonal antibodies (EMA/CHMP/BWP/157653/2007). Reducing sugar excipients currently used for commercialized products generate significant glycation reactions from 25 °C in a time frame as short as 6 months. The reaction follows the Arrhenius law; as a consequence the glycation effect is minimized at 5 °C but not abolished. The use of non-reducing sugars such as trehalose and sucrose was more successful to avoid glycation. Considering that some commercialized IVIg preparations are formulated with reducing sugars in liquid state [1], our results support strong evidence that glycation reactions are highly probable for these products and that the present LC-MS method is adequate to assess this criteria for the different claimed storage temperatures. As mentioned above, glycation of proteins may alter their physicochemical and biological properties. This study raises the question of possible tolerability issues in relation with the use of reducing sugars especially in the case of chronic impregnation with IVIg.

Conflict of interest

All authors are employees of LFB BIOTECHNOLOGIES or LFB BIOMEDICAMENTS, subsidiaries of LFB SA group, and commercializing IVIg preparations.

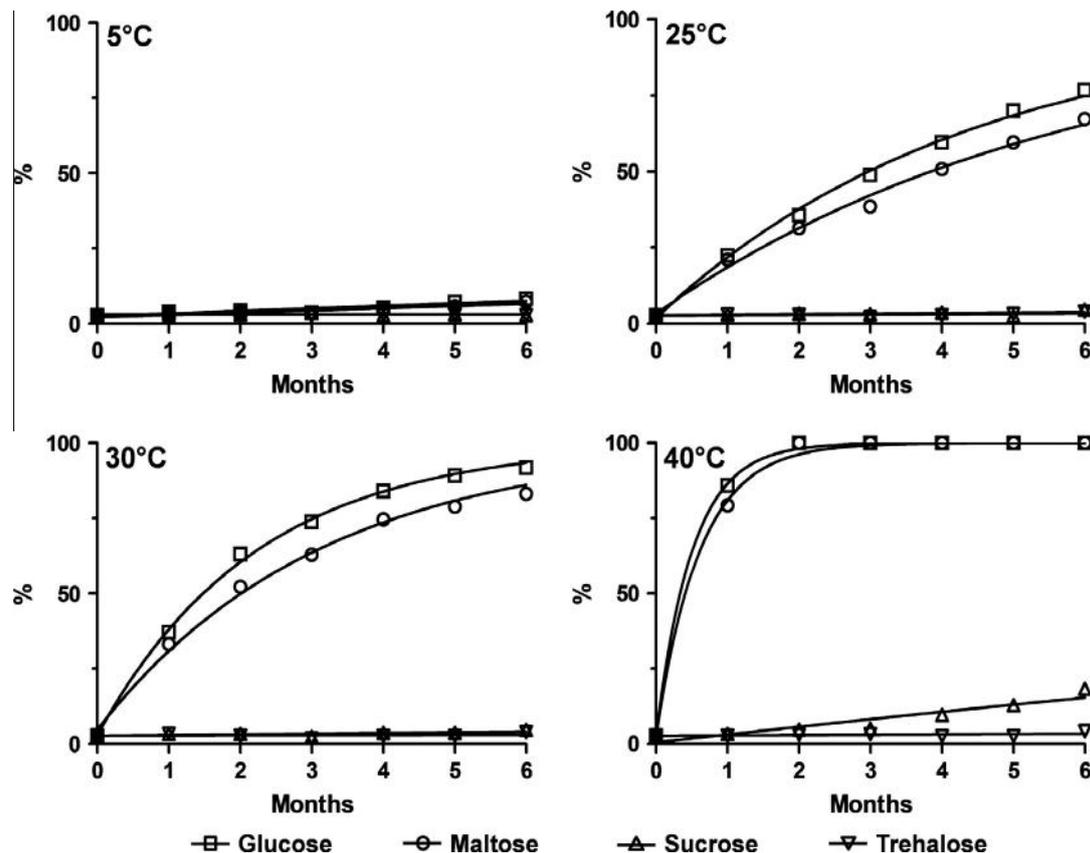


Fig. 4. Time course of Fc/2 glycation of IgGs stored at 5°C, 25°C, 30°C and 40°C and formulated with glucose (■), maltose (●), sucrose (▲) and trehalose (▼).

Acknowledgments

The authors thank Dr. Valegh Faid for his scientific expertise. We also thank Violaine Chapuis, Nolwenn Tilly and Christine Ramon for their technical advice.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.03.016>.

References

- [1] H. Abolhassani, M.H. Asgardoost, N. Rezaei, L. Hammarstrom, A. Aghamohammadi, Different brands of intravenous immunoglobulin for primary immunodeficiencies: how to choose the best option for the patient?, *Expert Rev Clin. Immunol.* 11 (2015) 1229–1243.
- [2] R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin, Advanced glycation end-products: a review, *Diabetologia* 44 (2001) 129–146.
- [3] C. Quan, E. Alcalá, I. Petkovska, D. Matthews, E. Canova-Davis, R. Taticek, S. Ma, A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior, *Anal. Biochem.* 373 (2008) 179–191.
- [4] S. Fischer, J. Hoernschemeyer, H.C. Mahler, Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 42–50.
- [5] A. Vrdoljak, A. Trescec, B. Benko, D. Hecimovic, M. Simic, In vitro glycation of human immunoglobulin G, *Clin. Chim. Acta* 345 (2004) 105–111.
- [6] Y. Leblanc, M. Romanin, N. Bihoreau, G. Chevreux, LC–MS analysis of polyclonal IgGs using IdeS enzymatic proteolysis for oxidation monitoring, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 961C (2014) 1–4.
- [7] A.M. Goetze, Y.D. Liu, T. Arroll, L. Chu, G.C. Flynn, Rates and impact of human antibody glycation in vivo, *Glycobiology* 22 (2012) 221–234.
- [8] M. Corzo-Martinez, R. Lebron-Aguilar, M. Villamiel, J.E. Quintanilla-Lopez, F.J. Moreno, Application of liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the characterization of galactosylated and tagatoseylated beta-lactoglobulin peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7205–7212.
- [9] D.L. Mendez, R.A. Jensen, L.A. McElroy, J.M. Pena, R.M. Esquerra, The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin, *Arch. Biochem. Biophys.* 444 (2005) 92–99.
- [10] A. Lapolla, L. Molin, P. Traldi, Protein glycation in diabetes as determined by mass spectrometry, *Int. J. Endocrinol.* 2013 (2013) 412103.
- [11] D.M. Kennedy, A.W. Skillen, C.H. Self, Glycation increases the vascular clearance rate of IgG in mice, *Clin. Exp. Immunol.* 94 (1993) 447–451.
- [12] J.F. Poduslo, G.L. Curran, Increased permeability across the blood–nerve barrier of albumin glycated in vitro and in vivo from patients with diabetic polyneuropathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 2218–2222.
- [13] M. Brownlee, H. Vlassara, A. Cerami, Trapped immunoglobulins on peripheral nerve myelin from patients with diabetes mellitus, *Diabetes* 35 (1986) 999–1003.

4. Investigation du niveau de réduction des ponts disulfures d'anticorps monoclonaux par protéolyses enzymatiques

I. Résumé de l'article

Les anticorps monoclonaux constituent une importante classe de protéines thérapeutiques dont la complexité structurale doit être caractérisée pour s'assurer de l'efficacité, de la sécurité et de l'uniformité de fabrication du produit et après sa commercialisation. Un élément majeur de structure qui doit être caractérisé est l'appariement des cystéines formant les ponts disulfures des anticorps. Les IgG1 sont typiquement constituées de 12 ponts disulfures intra-chaîne et de 4 ponts disulfures inter-chaîne, la réduction de l'un d'entre eux conduit à la formation de groupements sulfhydriles libres qui peuvent réagir entre eux pour former des dimères et des agrégats covalents. La présence de groupements sulfhydriles libres est également un indicateur d'instabilité structurale et d'espèces partiellement dénaturées, c'est la raison pour laquelle leur présence doit être caractérisée et leur criticité évaluée. Si la présence de groupements sulfhydriles est communément évaluée par spectroscopie de fluorescence après marquage chimique (réactif d'Ellman), la spectrométrie de masse constitue un outil puissant de caractérisation des ponts disulfures des protéines. L'approche middle-up, consistant en l'analyse LC-MS des sous-unités produites à l'aide d'enzymes spécifiques, a démontré son efficacité pour la caractérisation de modifications post-traductionnelles. Dans cette étude, l'approche *middle-up* a été utilisée pour la caractérisation de l'intégrité des ponts disulfures d'anticorps. Les enzymes IdeS et IgdE, permettant de cliver spécifiquement les parties inférieures et supérieures de la région charnière d'IgG1, ont été utilisées pour générer les fragments Fc/2, Fab et la partie charnière des anticorps monoclonaux. L'analyse LC-MS de ces fragments en conditions non-réductrices a permis de détecter des groupements sulfhydriles libres sur différents fragments d'anticorps monoclonaux.

Pour cette étude, l'action combinée de l'IdeS et de l'IgdE a été appliquée à un anticorps monoclonal de référence, développé par le *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Les fragments générés ainsi que leurs protéoformes ont ensuite été analysés à l'aide de la méthode LC-MS décrite précédemment (voir chapitre 2). Aucune dégradation ni modification de la partie charnière de l'anticorps correspondant au peptide dimérique [H₂₂₇-G₂₃₉]₂, stabilisé par les ponts disulfures C₂₂₉-C₂₂₉ et C₂₃₂-C₂₃₂, n'a été détectée. Cela indique une

intégrité structurale complète de cette partie de l'anticorps, concernant plus particulièrement les ponts disulfures inter-chaînes. L'analyse du fragment Fc/2 a mis en évidence plusieurs modifications post-traductionnelles liées à la N-glycosylation, à la présence de lysine en position C-terminale, et au clivage de la liaison peptidique D₂₇₃-P₂₇₄. Trois modifications post-traductionnelles ont cependant été observées sur la partie Fab de l'anticorps : la pyroglutamilation de la glutamine N-terminale de la chaîne lourde (-17 Da), une forme glyquée mineure (+162 Da) de l'anticorps ainsi que le clivage d'une liaison peptidique (+18 Da). En raison de la fragilité connue de la liaison peptidique Asp-Pro, cette dernière modification correspond vraisemblablement au clivage de la liaison Asp₈₈-Pro₈₉ de la chaîne lourde, mais nous ne pouvons pas totalement exclure qu'il s'agisse d'une protéoforme combinant une oxydation (+16 Da) et une réduction de pont disulfure (+2 Da). L'absence de chaîne légère libre indique une préservation complète du pont disulfure inter-chaîne du fragment Fab. Une espèce correspondant au fragment Fab associé au peptide dimérique de la région charnière a également été détectée du fait de la digestion incomplète de l'enzyme IgDE.

Comme énoncé précédemment la colonne chromatographique porteuse de groupements diphényles apporte une sélectivité intéressante qui permet la séparation des fragments protéiques en fonction du statut d'oxydation des ponts disulfures. Dans le cas de l'anticorps N1ST, des formes partiellement réduites de ponts disulfures intra-chaîne des fragments Fc/2 et Fab sont éluées après les formes natives. Ces formes partiellement réduites ont été identifiées comme correspondant à la réduction d'une seule liaison S-S à l'aide des spectres de masse qui présentent une variation de +2 Da, ainsi qu'un décalage de la distribution des états de charge vers des m/z plus faibles par rapport aux formes natives. Ceci est caractéristique d'une perte de structure des fragments protéiques. La détection de plusieurs pics chromatographiques pour chaque forme partiellement réduite suggère la présence de plusieurs conformères se différenciant par la localisation du pont disulfure réduit. Pour confirmer la réduction partielle des ponts disulfures de l'anticorps, une S-alkylation de l'échantillon a été effectuée en présence d'iodoacétamide. Les résultats de l'alkylation montrent une disparition totale des formes partiellement réduites et l'apparition de pic avec des intensités similaires correspondant à leurs homologues bi-S-alkylés et caractérisés par une variation de masse de +114 Da.

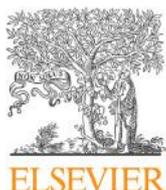
Au cours de cette étude, les performances de la méthode ont été évaluées par l'analyse de quatre anticorps monoclonaux présentant des degrés d'hydrophobie et des pI différents. L'efficacité et la spécificité des enzymes se sont révélées comparables pour les quatre anticorps et la méthode a démontré son efficacité pour l'évaluation de l'intégrité de leurs ponts disulfures. La performance de la digestion à l'Igde a également été étudiée. Elle démontre une efficacité de clivage optimale à une concentration en tampon phosphate de 150 mM. Enfin, l'incubation de l'anticorps NIST avec des concentrations croissantes d'un agent réducteur tel que le dithiothréitol a permis de mettre en évidence la capacité de la méthode à détecter la réduction de ponts disulfures inter-chaîne.

Dans cette étude, nous avons introduit l'utilisation d'une nouvelle enzyme clivant en conditions non-réductrices et avec une haute spécificité la partie supérieure de la région charnière des IgG1. Cette nouvelle enzyme utilisée en combinaison avec l'Ides, permet une caractérisation simple et robuste par LC-MS du statut d'oxydation des ponts disulfures des anticorps. Au-delà de l'évaluation de l'intégrité des ponts disulfures, cette méthode peut être utile à la caractérisation d'autres modifications post-traductionnelles d'anticorps monoclonaux (oxydation, clivage de liaisons peptidiques...).

II. Publication

Cette étude a été publiée dans *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* :

V. Faid, Y. Leblanc, N. Bihoreau, G. Chevreux, Middle-up analysis of monoclonal antibodies after combined Igde and Ides hinge proteolysis: Investigation of free sulfhydryls, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 149 (2018) 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.046>.



Short communication

Middle-up analysis of monoclonal antibodies after combined IgD and IdeS hinge proteolysis: Investigation of free sulfhydryls

Valegh Faid, Yann Leblanc, Nicolas Bihoreau, Guillaume Chevreux*

Analytical Department, LFB Biotechnologies, 3 avenue des Tropiques, 91958 Courtaboeuf, Les Ulis, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2017

Received in revised form

10 November 2017

Accepted 19 November 2017

Available online 21 November 2017

Keywords:

Disulfide bonds

Free sulfhydryls

IdeS

IgdE

Mass spectrometry

Monoclonal antibody

ABSTRACT

Despite significant analytical improvements during this last decade, characterizing the whole integrity of monoclonal antibodies during their bioproduction remains a challenge. In this study, we report a new analytical approach to evaluate the overall heterogeneity/integrity of mAbs by LC–MS after combined proteolysis at their lower- and upper-hinge sites using the immunoglobulin-degrading enzymes IdeS and IgdE respectively. The whole sample preparation did not use any harsh conditions such as low pH, high temperature or reductive conditions and enables the splitting of mAbs structure into three fragments, namely the hinge dimer, Fab and Fc/2. Using the NIST mAb reference material, this method was demonstrated to be particularly suited for the analysis of mAbs disulfide bridges. The three fragments as well as their corresponding free sulfhydryl forms were well separated by chromatography and identified online by mass spectrometry. The method was then successfully applied to several mAbs of variable hydrophobicities.

© 2017 LFB BIOTECHNOLOGIES. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are an important class of protein therapeutics. These large Y-shape proteins contain several levels of structure complexity which must be characterized to ensure their safety, efficacy and manufacturing consistency. Most of these sources of heterogeneities (glycosylation, oxidation, glycation, deamidation, etc.) [1] are usually investigated by MS, following reduction/alkylation of cysteines, at the peptide or protein level. Pairing of cysteines to form disulfide bonds is another structural feature of complexity and IgG1 basically contains 12 intra-chain and 4 inter-chain disulfide bonds. Reduction of disulfide bonds leads to free sulfhydryl groups, which can react to cross-link monomers into undesired covalent dimers and aggregates of higher molecular weight. The free sulfhydryl content of a mAb preparation can also be a good indicator of the presence of unfolded or misfolded species [2] and was demonstrated in one study to be directly linked to mAb stability [3]. As a consequence, free sulfhydryls

should be monitored at early stages of process development to improve understanding of its criticality [4]. For this purpose, Ellman's reagent is usually used to report a global amount of free sulfhydryls per mole of protein but fluorescence methods were reported to be more sensitive [5]. Chumsae et al. [6] proposed to label free sulfhydryls with a fluorescent tag and use MS on the intact and digested protein to detect and localize the reduced disulfide bonds. They found antibody-dependent levels of free sulfhydryls in either their constant and variable domains and interestingly they observed that it was rather intra-chain reduced disulfide bonds. Similar results were also found by an alternative method using MS, based on differential cysteine labelling with heavy and light iodoacetic acid [7]. The general presence of low amount of free sulfhydryls was attributed to an incomplete formation of disulfide bonds during antibodies manufacturing while other mechanisms of disulfide bonds degradation were not ruled out [8]. In another study, the same approach was used to assess the susceptibility of IgG disulfide bonds to reduction [9] in progressive reducing conditions. Inter-chain disulfide bonds that are highly exposed to solvent were confirmed to be more reactive than intra-chain disulfide bonds and their susceptibility to reduction was ranked.

For several years, middle-up approaches involving the use of specific proteases have been developed [10–12] in order to characterize post translational modifications (PTMs) and the appropriate sequence of mAbs. LC–MS analysis of mAbs subunits instead of the intact molecule is indeed advantageously used for a better chro-

Abbreviations: Fab, monovalent Fragment-antigen binding; F(ab')₂, bivalent Fab; Fc/2, constant fragment of IgG heavy chain; Fd, variable fragment of IgG heavy chain; LC, light chain; IdeS, cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*; IgdE, cysteine protease from *Streptococcus agalactiae*; IgG, immunoglobulin G; PTMs, post-translational modifications.

* Corresponding author.

E-mail address: chevreuxg@lfb.fr (G. Chevreux).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.046>

0731-7085/© 2017 LFB BIOTECHNOLOGIES. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

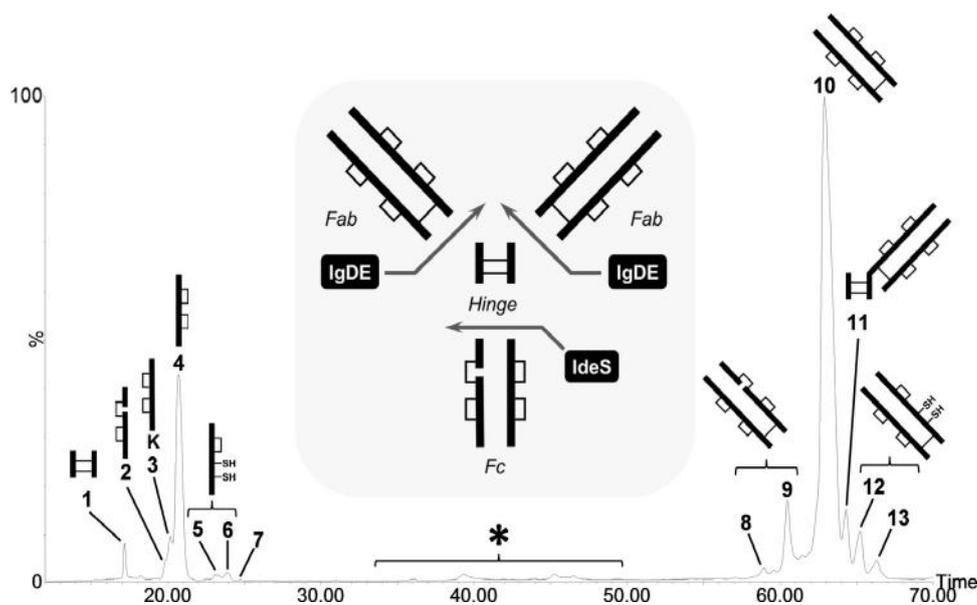


Fig. 1. LC/MS profile of the NIST mAb fragments after combined digestions using IgDE and IdeS. The corresponding assignments are listed in Table 1. Inset depicts the schematic representation of mAb structure and IdeS- and IgDE-driven fragmentation. The asterisk indicates peaks arisen from the protease preparation.

matographic separation of isoforms, a better mass accuracy with lower masses and for rapid positioning of a modification on the constant versus variable region. Thanks to its high specificity and high digestion efficacy in the lower hinge region, IdeS has become the most important enzyme used to cleave human IgGs for analytical purpose [13–16]. Interestingly, Ren et al. [17] described a limited proteolysis in the upper hinge region using Lys-C followed by a chromatographic separation on diphenyl columns with on-line MS identification to resolve and quantify protein variants containing free sulfhydryls. However, limited proteolysis can be challenging to implement with high robustness and other enzymes cleaving at the upper hinge region (like papain) require slightly reducing conditions to generate Fc and Fab fragments which preclude analysis of free sulfhydryls.

Recently, a new cysteine protease that digests human IgG1 at one specific site above the hinge (...KSCDKT/HTCPPCP...) with no need for reducing conditions has been released under the branding IgDE FabALACTICA® [18,19]. In this report, we describe the combine use of IgDE and IdeS to generate with high specificity and robustness three mAbs fragments *i.e.* Fc/2, hinge peptide dimer and Fab that can be further analyzed in non-reducing conditions with diphenyl columns coupled to MS. This improved LC–MS method gives a good chromatographic separation of each fragment and highlights the presence of free sulfhydryls of intra-chain disulfide bonds of Fc/2 and Fab fragments for several antibodies of different hydrophobicities. The method is straightforward with limited sample preparation and can be used routinely to assess critical quality attributes of mAbs and especially free sulfhydryls.

2. Material and methods

2.1. Materials

IdeS (FabRICATOR®) and IgDE (FabALACTICA®) immunoglobulin-degrading endoproteases were obtained from Genovis AB (Lund, Sweden). NIST IgG1 mAb standard (RM 8671) was purchased from National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide, and phosphate buffer saline (PBS) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetonitrile (MeCN) was HPLC reagent grade and purchased from JT Baker (Philipsburg, NJ, USA). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Merck Bio-

sciences (Darmstadt, Germany). All the aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (18.2 MΩ cm resistivity at 25 °C, total organic carbon (TOC) < 5 ppb).

2.2. IgG enzymatic digestions

Formulated mAbs were diluted to 1 g/L using 100 mM phosphate buffer pH 7.0 and digested by IgDE protease at an enzyme-to-substrate (E/S) ratio of 1/10 (w/w) overnight at 37 °C corresponding to 100 units per 100 μg mAbs. According to initial mAbs concentration, the final phosphate buffer concentration was comprised between 50 and 90 mM. The sample was further digested by IdeS protease by incubating 67 units per 100 μg mAbs, 1 h at 37 °C.

2.3. LC–MS analysis

Separation of the Fc/2, hinge dimer peptide and Fab fragments was carried out on an ACQUITY UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a UV detector and an electrospray mass spectrometer (SYNAPT G2S, Waters, Milford, MA, USA). 15 μg of sample were injected on a Pursuit Diphenyl 150 × 2.0 mm column (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equilibrated at 70 °C and operated at a flow rate of 200 μL/min. An elution gradient was applied using solvent A (0.1% TFA in water) and solvent B (90% MeCN, 10% water and 0.1% TFA), after an isocratic elution at 10% B for 5 min, B was raised to 38% in 10 min and to 47% in an additional 57 min. The column was then washed for 4 min at 80% of B and further re-equilibrated during 10 min at 10% B. The mass spectrometer was operated in the positive resolution mode and data were recorded from m/z 500–4000. Chromatogram figures were presented as extracted-ion chromatograms from m/z 1200–3500 to improve signal-to-noise ratio. Mass spectra were deconvoluted using the MassLynx software.

3. Results and discussion

3.1. Description of the combined IgDE and IdeS digestion for middle-up analysis of a mAb reference material under non-reducing conditions

In a first attempt, the mAb reference material (NIST RM 8671) was used to evaluate results that can be derived from the combined

Table 1

Result summary of masses observed by LC/MS for NIST mAb after combined IdeS and IgdE enzymatic proteolysis.

Peak No	RT (min.)	Species ID	Glycoforms	Calc. Mass (Da) ^a	Exp. Mass (Da)	SD ^e	Deviation (ppm)
1	17.2	Hinge Peptide Dimer [H ₂₂₇ -G ₂₃₉] ₂	NA	1,332.6080 ²⁺	1,332.6085 ²⁺	NA	0
2	19.8	Cleaved Fc/2 ^b [G ₂₄₀ -G ₄₄₉]	G0F	25250.3	25,250.1	0.22	-6
3	20.2	Fc/2 + Lys	G0F	25,360.4	25,360.4	0.06	0
4	20.7	Fc/2	G0F	25,232.2	25,232.2	0.03	-3
			G1F	25,394.4	25,394.3	0.03	-2
			G2F	25,556.5	25,556.5	0.03	-2
			G2F α Gal	25,718.7	25,718.5	0.07	-7
5	23.2	Unglycosylated Fc/2	NA	23,786.9	23,787.1	0.57	9
		Fc/2 (SH) ₂	G0F	25,234.2	25,234.6	0.55	14
6	23.9	Fc/2 (SH) ₂	G0F	25,234.2	25,234.2	0.73	-2
7	24.7	LC [D ₁ -C ₂₁₃]	NA	23,123.7	23,124.0	0.33	11
8	58.8	Cleaved Fab ^c	NA	47,508.3	47,508.5	0.35	4
9	60.5	Cleaved Fab ^c	NA	47,508.3	47,508.2	0.69	-3
10	62.9	Fab	NA	47,490.3	47,490.5	0.22	4
		Fab + Hex	NA	47,652.4	47,652.3	0.23	-3
11	64.3	Fab-Hinge ^d	NA	50,137.4	50,137.4	0.45	0
		Fab (SH) ₂	NA	47,492.3	47,492.9	0.96	12
12	65.2	Fab (SH) ₂	NA	47,492.3	47,492.1	0.61	-5
13	66.3	Fab (SH) ₂	NA	47,492.3	47,492.9	1.38	12

^a Average masses M, except for the hinge dimer peptide identified by its monoisotopic mass [M+H]⁺.^b Cleavage presumably at D₂₇₃-P₂₇₄ bond.^c Cleavage presumably at D₈₈-P₈₉ bond and at another site.^d Intermediate digestion product of IgdE.^e Standard deviations of the deconvolution process done using the Transform function.

use of IgdE and IdeS digestion followed by an LC-MS analysis in non-reducing conditions. Fig. 1 shows the resulting chromatogram obtained by MS detection. Three major fragments of interest were generated and detected: the hinge dimeric peptide [H₂₂₇-G₂₃₉]₂ labeled as peak 1, the Fc/2 [G₂₄₀-G₄₄₉] labeled as peak 4, and the Fab labeled as peak 10, composed of the HC [pQ₁-T₂₂₆] disulfide-linked to the LC [D₁-C₂₁₃]. These three components and their major variants were identified by the measurement of their molecular weight by MS with an average mass accuracy better than 20 ppm (see Table 1).

The hinge moiety eluting at RT 17.2 min was released as a dimer stabilized by the two C₂₂₉-C₂₂₉ and C₂₃₂-C₂₃₂ disulfide bonds and detected as a dicharged protonated species at monoisotopic *m/z* 1332.6085. No other hinge-related peaks were found, indicating full integrity of the fragment, especially in terms of disulfide bond pairing. The Fc/2 moiety was eluted in the RT range 19–24 min as multiple post-translationally modified variants. The major peak at 20.7 min (peak 4) encompasses glycoforms of an Fc/2 covering the sequence [G₂₄₀-G₄₄₉] and dominated by two species carrying fucosylated, agalactosylated (G0F) and monogalactosylated (G1F) biantennary structures, identified at average masses of 25,232.2 Da and 25,394.3 Da respectively (see Fig. 2A and Table 1). Other minor glycovariants were detected, corresponding to additionally galactosylated forms (G2F and G2F α Gal). Peak 3 differs from peak 4 by the presence of a C-terminal lysine (+128 Da) and mass of peak 2 exhibits a +18 Da mass difference *versus* the major form, probably due to an artefactual internal cleavage at D₂₇₃-P₂₇₄ bond, as described for the reference material [20]. The Fab moiety of the antibody was eluted in the RT range 60–70 min. The major form at 62.9 min (peak 10) exhibits an average mass of 47490.5 Da (see Fig. 2C) in accordance with the Fab sequence and taking into account the pyroglutamination of the N-terminus glutamine of the HC. A minor glycosylated form was also detected at 47,652.3 Da, in accordance with the characterization data of this reference material [20]. By exhibiting a mass difference of +18 Da *versus* the major form, peaks 8 and 9 were also attributed to artefactual internal cleavages of the Fab, one of them probably at the D₈₈-P₈₉ bond as described [20]. Finally, with a detected mass of 50,137.4 Da, peak 11 was attributed to a Fab-hinge fragment originating from an incomplete digestion of the IgdE enzyme. In the conditions used for this experiment an IgdE digestion yield of about 95% was consistently

achieved. Some interfering peaks eluting in the RT range 35–50 min, were attributed to the IgdE enzyme with MW measured at about 70 kDa.

The chromatographic separation on a diphenyl column displays an interesting selectivity toward species differing by the reduced or non-reduced state of their disulfide bonds. In our experiment, partially reduced forms of both the Fc/2 and Fab fragments, eluting later than their native counterparts, were evidenced as two minor isoforms of the Fc/2 at RT of 23.2 and 23.9 min (peaks labeled as 5 and 6) and of the Fab at RT of 65.2 and 66.3 min (peaks 12 and 13). All these partially reduced isoforms contain one single reduced S-S bond as deduced from their mass spectra that present both a +2 Da mass shift and a shifted charge state envelope toward lower *m/z* versus the native form (see Fig. 2B and D). This latter observation is in accordance with the general knowledge stating a loss of compaction of a protein upon internal disulfide bond reduction, leading to additional basic amino acids accessible for protonation during the ESI process. The observation of multiple reduced forms at different RT suggests the presence of distinct conformers differing by the respective position of their reduced disulfide bond. Interestingly, mass spectra of these reduced forms display additional +32 and +48 Da shoulders assumed to be due to a combination of cysteines presenting various oxidation states *i.e.* most probably sulfenic and/or sulfinic forms. For information, the chromatographic separation using classical C4 sorbent was also tested but demonstrated lower performance for the same gradient (see supportive Fig. S1) with reduced conformers that were hardly separated from the native form and evidenced after mass deconvolution.

Despite a good mass accuracy confirming a +2 Da mass shift, an S-alkylation of the sample was conducted using iodoacetamide as a control. It led to a complete disappearance of all partially reduced forms, followed by the appearance in similar intensity of peaks corresponding to their bi-S-alkylated counterparts and characterized by a +114 Da mass shift (see supportive Fig. S2). As a consequence, the whole mAb integrity and particularly the oxidative state of inter-chain and intra-chain disulfide bonds can be easily and rapidly investigated by this approach. Although MS detection overestimates these partially reduced isoforms because of a better ionization *versus* their native counterparts, free sulfhydryl-containing isoforms were estimated at about 6.5% for the Fc and

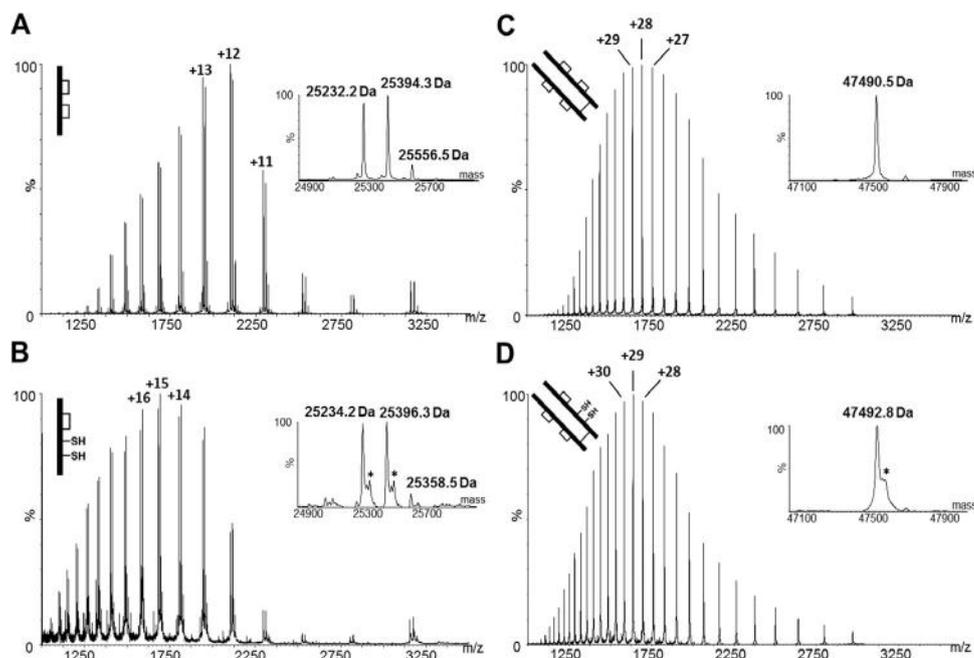


Fig. 2. Combined ESI mass spectra of NIST mAb Fc/2 (A) and Fab (C) fragments and their respective variants containing a free sulfhydryl group (B and D). Inserts represent deconvoluted mass spectra obtained using the Transform function of MassLynx. Asterisks point out peaks at +32 and +48 Da apart from the free thiol-containing Fab/Fc variants and assumed to be oxidized forms.

6.1% for the Fab of the NIST RM (see supportive Table S1 for comparison of MS and UV detection).

3.2. Performance study of the analytical approach

IdeS has been extensively used for mAbs characterization in the last few years demonstrating its ability to operate with high digestion yields with a robust and easy sample preparation [15]. Similarly, the digestion performance of the new IgdE enzyme was investigated.

As illustrated previously with the NIST RM, a digestion yield of about 95% (based on MS intensities) was commonly achieved with an IgdE-to-mAb ratio of 1/10 (w/w) in presence of 90 mM phosphate buffer pH 7.0 and during 16 h at 37 °C. By lowering the IgdE-to-mAb ratio to 1/20 (w/w), in order to reduce the intensity of enzyme derived interfering peaks, the digestion yield decreased to about 90% and even less, with significant appearance of the Fab-hinge intermediate fragment eluted at 64.3 min. Different concentrations of the diluting phosphate buffer were also tested using the E/S ratio of 1/10 (w/w). At 10 mM, results were worse with an increase of Fab-hinge and appearance of F(ab')₂ fragments, for an estimated digestion yield of 74%. This result indicates that the final concentration of phosphate buffer is critical for optimal digestion. Digestion efficiencies with high recoveries were reproducibly obtained using buffer final concentrations close to 100 mM (see supportive Table S2). For optimal analytical performance, it should thus be advised to carry out the IgdE digestion in a fixed phosphate buffer concentration as high as 150 mM, as illustrated by the digestion conditions used for the definition of one unit by Genovis AB (see information on website).

Secondly, we evaluated the performance of the method for several IgG1 mAbs differing by their respective pI and hydrophobicity profiles, theoretically calculated using the GPMW tool from the ExPASy website (pI ranging from 8.53 to 9.25 and H index from -0.37 to -0.44). Fig. 3 shows the chromatographic profiles obtained for four mAbs named A to D. The digestion efficiency and cleavage specificity were comparable for all four mAbs. As expected, Fc/2 and hinge dimer fragments were eluted at the same RT range and exhibited very close profiles with few differences for the Fc/2 moiety,

mostly attributed to relative proportions of oxidation, C-terminal lysine and free sulfhydryls. The Fab moieties and their respective isoforms eluted at different RT because of the intrinsic hydrophobicity of their variable domains. These results confirmed that the structure/sequence of the Fab region does not seem to be rate-limiting for the digestion by IgdE and that common formulation excipients such as polysorbate and amino-acids do not disturb the digestion efficiency. Interestingly, free sulfhydryls corresponding exclusively to intra-chains disulfide bridges were detected at different levels for all four mAbs *i.e.* from 9 to 13% for the Fc domain and from 2 to 14% for the Fab domain. These differences may originate from the manufacturing process used for each mAb [6]. This hypothesis was also supported by study from Chung et al. [8], who attributed mAb inter- or intrachain disulfide bond reductions to some upstream/downstream process steps, for instance, during the harvest process due to some reducing enzymes. Finally, we also tested the ability of the method to detect inter-chain reduced disulfide bonds by analyzing the NIST RM under slightly reducing conditions. Fig. 4 shows the resulting chromatograms after incubation with 0, 0.01 and 0.1 mM DTT in the sample preparation with a focused view on the hinge dimer and Fc/2 elution region. Increasing the DTT concentration resulted in the appearance of free LC as well as hinge peptide monomers as a consequence of the most solvent-exposed inter-chain disulfide bond reduction. It should also be noticed that reduced intra-chain disulfide bonds were also increasing slightly in intensity. Interestingly new peaks related to the hinge fragment appeared and were identified by MS as the result of a partial truncation of the N-terminal “His-Thr” dipeptide (see peaks 2, 3, 5 and 6). This observation was confirmed by the MS spectrum of the Fab peak, which showed a progressive shift of the average molecular weight of the Fab fragment from 47,490.3 Da to 47,728.5 Da (see supportive Fig. S3), corresponding to a mass increase in accordance with the presence of the His-Thr dipeptide at its complementary C-terminal end. This result demonstrates a loss of IgdE specificity when digesting in a reducing environment with at least the presence of a second cleavage site. But the use of the IgdE enzyme should not be affected by this result since its best attribute is indeed to be active and highly specific in non-reducing conditions.

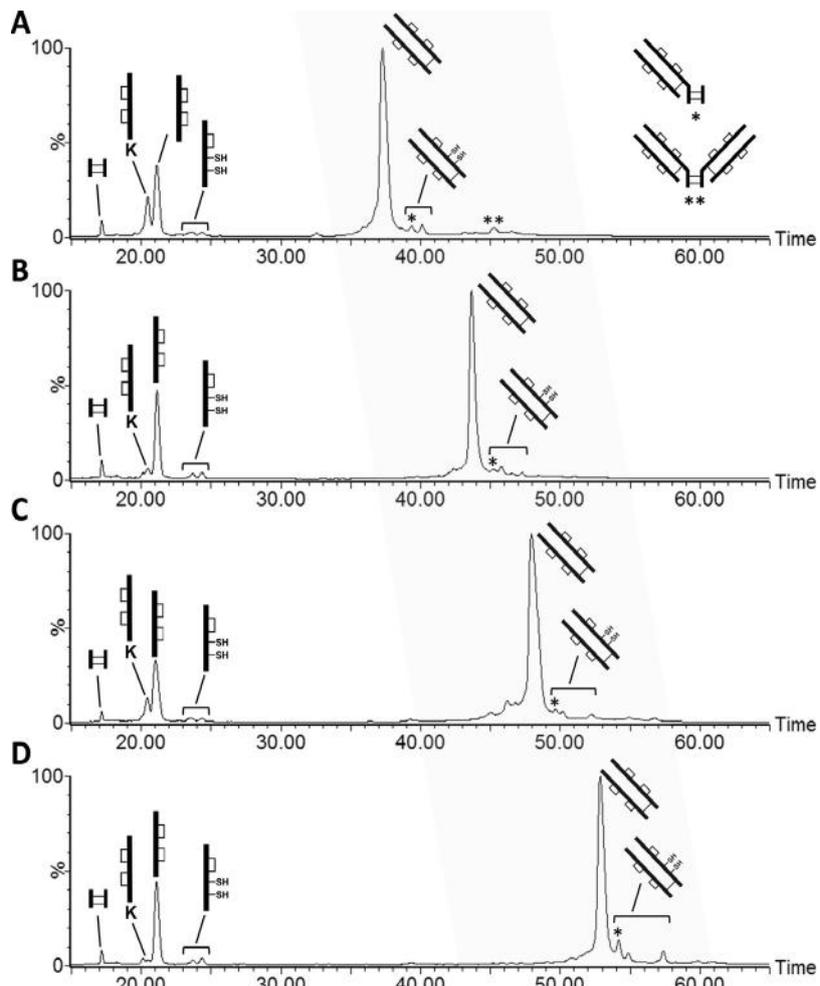


Fig. 3. LC/MS profile of the Hinge, Fc/2 and Fab fragments from four unique mAbs. The annotation of the fragments was done as in Fig. 1.

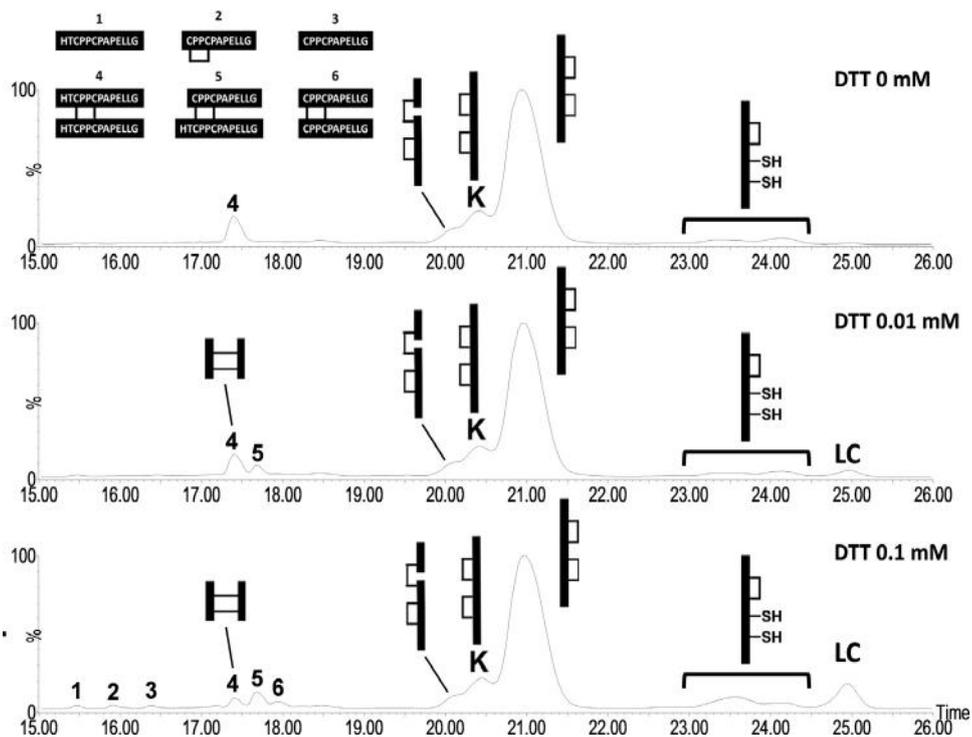


Fig. 4. LC/MS of NIST mAb hinge dimer and Fc/2 fragments in presence of DTT. The annotation of the fragments was done as in Fig. 1.

4. Conclusions

Analyzing the integrity of disulfide bridges by non-reducing peptide mapping is often very time-consuming and difficult to implement routinely. In this study, we introduced the use of a new enzyme (IgdE) that cleaves mAbs with high specificity at their upper hinge region in non-reducing conditions to investigate their disulfide bridge oxidation state. The use of a combined digestion with IdeS and IgdE provide three fragments, *i.e.* the hinge dimer, Fc/2 and Fab that are easily resolved by RP-HPLC coupled to MS. This method is easy to use, generic for mAbs and presents the advantage to deal with the whole complexity of a single mAb molecule by generating three well separated smaller and less heterogeneous fragments. Besides a direct application to the detection of intra- and inter-chain free sulfhydryls, this combined digestion could be promising to investigate other mAbs quality attributes.

Funding

This study was fully supported by LFB Biotechnologies.

Disclosure of interest

All the authors are employees of LFB Biotechnologies.

Acknowledgements

The authors kindly acknowledge Jonathan Sjögren and Stephan Björk from Genovis AB for providing the IgdE enzyme and for fruitful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.046>.

References

- [1] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianferani, Characterization of therapeutic antibodies and related products, *Anal. Chem.* 85 (2013) 715–736.
- [2] M.V. Trivedi, J.S. Laurence, T.J. Siahaan, The role of thiols and disulfides on protein stability, *Curr. Protein Pept. Sci.* 10 (2009) 614–625.
- [3] E.R. Lacy, M. Baker, M. Brigham-Burke, Free sulfhydryl measurement as an indicator of antibody stability, *Anal. Biochem.* 382 (2008) 66–68.
- [4] H. Liu, K. May, Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function, *MAbs* 4 (2012) 17–23.
- [5] W. Zhang, M.J. Czupryn, Free sulfhydryl in recombinant monoclonal antibodies, *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 509–513.
- [6] C. Chumsae, G. Gaza-Bulseco, H. Liu, Identification and localization of unpaired cysteine residues in monoclonal antibodies by fluorescence labeling and mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6449–6457.
- [7] T. Xiang, C. Chumsae, H. Liu, Localization and quantitation of free sulfhydryl in recombinant monoclonal antibodies by differential labeling with 12C and 13C iodoacetic acid and LC-MS analysis, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8101–8108.
- [8] W.K. Chung, B. Russell, Y. Yang, M. Handlogten, S. Hudak, M. Cao, J. Wang, D. Robbins, S. Ahuja, M. Zhu, Effects of antibody disulfide bond reduction on purification process performance and final drug substance stability, *Biotechnol. Bioeng.* 114 (2017) 1264–1274.
- [9] H. Liu, C. Chumsae, G. Gaza-Bulseco, K. Hurkmans, C.H. Radziejewski, Ranking the susceptibility of disulfide bonds in human IgG1 antibodies by reduction, differential alkylation, and LC-MS analysis, *Anal. Chem.* 82 (2010) 5219–5226.
- [10] G. Chevreux, N. Tilly, N. Bihoreau, Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 212–214.
- [11] J. Kim, L. Jones, L. Taylor, G. Kannan, F. Jackson, H. Lau, R.F. Latypov, B. Bailey, Characterization of a unique IgG1 mAb CEX profile by limited Lys-C proteolysis/CEX separation coupled with mass spectrometry and structural analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1973–1981.
- [12] G.D. Pipes, P. Campbell, P.V. Bondarenko, B.A. Kerwin, M.J. Treuheit, H.S. Gadgil, Middle-down fragmentation for the identification and quantitation of site-specific methionine oxidation in an IgG1 molecule, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 4469–4476.
- [13] R. Mukherjee, L. Adhikary, A. Khedkar, H. Iyer, Probing deamidation in therapeutic immunoglobulin gamma (IgG1) by 'bottom-up' mass spectrometry with electron transfer dissociation, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 879–884.
- [14] J. Sjögren, F. Olsson, A. Beck, Rapid and improved characterization of therapeutic antibodies and antibody related products using IdeS digestion and subunit analysis, *Analyst* 141 (2016) 3114–3125.
- [15] Y. An, Y. Zhang, H.M. Mueller, M. Shameem, X. Chen, A new tool for monoclonal antibody analysis: application of IdeS proteolysis in IgG domain-specific characterization, *MAbs* 6 (2014) 879–893.
- [16] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: case study after a long-term storage at +5 degrees C, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1048 (2017) 130–139.
- [17] D. Ren, G. Pipes, G. Xiao, G.R. Kleemann, P.V. Bondarenko, M.J. Treuheit, H.S. Gadgil, Reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of site-specific chemical modifications in intact immunoglobulin molecules and their fragments, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 198–204.
- [18] C. Sperry, J. Seele, P. Valentin-Weigand, C.G. Baums, U. von Pawel-Rammingen, Identification and characterization of IgdE, a novel IgG-degrading protease of streptococcus suis with unique specificity for porcine IgG, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 7915–7925.
- [19] C. Sperry, P. Hessle, M.J. Lewis, L. Paton, J.M. Woof, U. von Pawel-Rammingen, Novel IgG-degrading enzymes of the IgdE protease family link substrate specificity to host tropism of streptococcus species, *PLoS One* 11 (2016) e0164809.
- [20] J.E. Schiel, D.L. Davis, O.V. Borisov, State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study, 2015.

5. Conclusion

Les trois études présentées dans ce chapitre décrivent l'utilisation de l'approche middle-up pour caractériser les modifications post-traductionnelles d'anticorps par chromatographie de phase inversée couplée à la spectrométrie de masse. Cette approche, consistant à analyser des sous-unités d'IgG, rend possible la caractérisation de modifications post-traductionnelles d'IgG polyclonales (IGIV) malgré le caractère très hétérogène de ce type de protéine. Par exemple, le niveau d'oxydation des fragments Fc/2 d'IgG polyclonales a pu être déterminé pour des préparations d'IGIV soumises à un stress de photo-oxydation. La sensibilité des IgG à ce type de stress a été mise en évidence par la détection de deux et trois méthionines oxydées respectivement pour les IgG1 et IgG2. La caractérisation de ces méthionines constitue une avancée importante pour le suivi des IGIV puisque la modification de ces résidus induit une baisse significative de l'affinité de la partie Fc de l'IgG pour le récepteur néo-natal Fc (FcRn). Cette méthodologie a également été appliquée avec succès à la caractérisation de la glycation d'IGIV. L'analyse LC-MS du fragment Fc/2 d'IgG polyclonales a permis de suivre le niveau de glycation d'IGIV formulées avec des sucres réducteurs. Cette étude a montré des niveaux importants de glycation pour des IGIV commerciales formulées avec des sucres réducteurs et stockées dans des conditions préconisées par les fabricants. Il existe encore aujourd'hui de nombreuses IGIV commerciales formulées avec ce type de sucres, alors que les risques associés à la glycation concernent potentiellement l'altération de la structure et de l'activité biologique des protéines. Dans le cas des IgG, qui ont une demi-vie prolongée dans le plasma (≈ 21 jours), les formes glyquées peuvent également évoluer en produits avancés de glycation (AGE) qui sont délétères pour l'organisme. Enfin, nous avons appliqué l'approche middle-up à la caractérisation d'anticorps monoclonaux et plus particulièrement à l'évaluation de l'intégrité des ponts disulfures. L'utilisation de deux enzymes, clivant les IgG au niveau de deux sites spécifiques, permet de générer des fragments correspondant aux parties variables (Fab), constantes (Fc/2) et charnière (« hinge ») de l'anticorps. Une méthode LC-MS optimisée a permis de détecter des formes partiellement réduites de ponts disulfures intra-chaîne sur les parties constante et variable de cinq anticorps monoclonaux. Dans ce chapitre, l'approche *middle-up* associée à une méthode LC-MS performante a permis de caractériser efficacement des modifications post-traductionnelles d'anticorps, et a rendu possible la caractérisation de

modifications d'IgG polyclonales très hétérogènes en focalisant l'analyse sur la partie constante de ce type de protéines.

Chapitre IV : Caractérisation de protéines thérapeutiques par spectrométrie masse native : Couplage IEX-MS

1. Introduction

Les analyses en conditions natives, *i.e.* proches de celles observées *in vivo*, présentent l'avantage de préserver certaines structures et interactions non-covalentes des protéines et complexes protéiques. Cette démarche rend alors possible la caractérisation des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines, ainsi que des interactions non-covalentes avec des ligands pour l'étude de complexes protéiques. Des techniques chromatographiques telles que l'IEX ou la SEC existent depuis des décennies pour l'analyse en conditions natives des protéines alors que la spectrométrie de masse native ne s'est véritablement développée qu'au cours des années 1990. Traditionnellement, ces méthodes chromatographiques natives emploient des sels minéraux non-volatils (Cl^- , Na^+ , ou PO_4^{3-}), comme contre-ions échangeables ou pour la stabilisation du pH, donnant à ces dernières la réputation d'être incompatibles avec un couplage direct avec la spectrométrie de masse. Ce n'est que récemment que le couplage efficace et fiable de techniques chromatographiques comme l'IEX et la SEC avec la spectrométrie de masse a pu être réalisé grâce à l'utilisation des sels d'ammonium volatils.

Trois articles décrivant des méthodes développées pour l'identification directe par spectrométrie de masse des isoformes de protéines thérapeutiques séparées par IEX (IEX-MS) sont présentés dans ce chapitre. Le premier article décrit pour la première fois une méthode IEX-MS développée pour la caractérisation d'un anticorps monoclonal. Dans cette étude, la méthode IEX-MS a été combinée à une approche *middle-up* pour l'identification des principales modifications impactant un anticorps ayant subi une conservation longue en solution et à basse température, telles que l'oxydation et la déamidation. La seconde étude présente une méthode IEX-MS polyvalente et employant une nouvelle technologie de colonne IEX pour la caractérisation d'anticorps. Ces nouvelles colonnes utilisent une technologie de phase stationnaire permettant de limiter les interactions hydrophobes secondaires pour de meilleures performances chromatographiques (largeur et symétrie de pic, résolution...). Cette méthode permet l'analyse d'une large gamme d'anticorps monoclonaux, combinée ou non à

l'approche *middle-up*, pour une caractérisation structurale approfondie par IEX-MS. Enfin, le dernier article présente l'utilisation de l'IEX-MS pour la caractérisation des modifications post-traductionnelles de la sérumalbumine humaine (HSA). Cette protéine, disposant d'une demi-vie prolongée dans le plasma, est susceptible de subir un grand nombre de modifications dont la caractérisation peut être utile au diagnostic de pathologies, ou pour vérifier la qualité et l'intégrité structurale d'albumines thérapeutiques.

2. Caractérisation des isoformes d'un anticorps monoclonal par couplage de la chromatographie d'échange d'ions à la spectrométrie de masse native

I. Résumé de l'article

Certaines modifications post-traductionnelles peuvent impacter la charge des protéines et doivent être caractérisées lors du développement de produits bio-thérapeutiques. Des modifications telles que la déamidation ou la glycation ont pour conséquences une variation de la charge nette des protéines, caractérisée par l'apparition d'une charge négative, ou la perte d'une charge positive. D'autres modifications comme l'oxydation peuvent induire des changements conformationnels conduisant à une variation de la distribution locale des charges sur la protéine. Lorsque ces modifications impactent des acides aminés impliqués dans le site actif d'une protéine, cela peut conduire à une diminution, voire une perte de l'activité biologique de la protéine modifiée. La méthode de référence pour caractériser ces variations de charges est la chromatographie d'échange d'ions (IEX). Le caractère non-volatil des ions traditionnellement utilisés en IEX est connu pour perturber l'ionisation des protéines en électrospray avec l'apparition d'adduits sur les spectres de masse, rendant le couplage de l'IEX avec la MS impossible. C'est la raison pour laquelle l'identification des isoformes séparées par cette méthode est généralement effectuée après collecte des fractions puis une analyse LC-MS/MS de type *bottom-up*. Cette méthodologie est cependant particulièrement chronophage et peut s'accompagner de dégradations artéfactuelles liées aux étapes de préparation d'échantillon telles que la collecte des fractions, le dessalage ou la digestion enzymatique. Des stratégies ont alors été développées pour une détection directe par spectrométrie de masse des isoformes séparées par IEX, parmi lesquelles la chromatographie bidimensionnelle ou l'utilisation de sels volatils dans la phase mobile chromatographique. Dans cette étude, une

méthode IEX a été développée avec des sels d'ammonium, compatibles avec une ionisation des protéines par électronébulisation, pour permettre une identification directe par spectrométrie de masse native des isoformes d'un anticorps monoclonal. Pour améliorer les performances de séparation et d'identification, cette méthode a été associée à l'approche *middle-up* consistant à digérer l'anticorps avec des enzymes spécifiques. Des investigations ont été menées sur un échantillon de référence et sur un échantillon dégradé (conservé 9 ans à +5°C) présentant un profil chromatographique complexe. L'approche *middle-up* associée à la méthode IEX-MS a permis d'identifier des formes déamidées, oxydées et clivées parmi les protéoformes des anticorps analysés. Ces résultats se sont révélés cohérents et complémentaires à ceux obtenus par l'analyse des échantillons avec une méthode orthogonale de type *bottom-up*.

Analyse des échantillons avec une méthode IEX standard

L'analyse de l'échantillon de référence avec une méthode IEX standard (tampon phosphate/NaCl, anticorps entier) montre un profil normal avec un pic majoritaire représentant 80% de l'aire totale du chromatogramme et environ 10% de formes acides et basiques. Les formes acides et basiques désignent les protéoformes éluées respectivement avant et après le pic principal, présentant donc des pI plus acides ou plus basiques que la protéoforme majoritaire. L'analyse de l'échantillon dégradé avec cette méthode présente quant à lui un profil plus complexe, avec 74% de formes acides suggérant un taux important de modifications liées au stockage prolongé de cet échantillon à 5°C sous forme liquide, à pH neutre et sans formulation.

Analyse *middle-up* des échantillons par IEX-MS

Une analyse *middle-up* des échantillons par IEX-MS a été entreprise pour une caractérisation approfondie de cet anticorps. L'approche *middle-up* consiste à générer des fragments Fc/2 et F(ab')₂ par clivage enzymatique de la partie charnière de l'anticorps avec l'IdeS. L'analyse de sous-unités protéiques permet de réduire la complexité chromatographique liée à l'effet cumulatif de plusieurs modifications chimiques sur l'anticorps et d'obtenir des masses plus petites pour une analyse MS plus précise. La méthode IEX a été développée avec des sels volatils pour le couplage MS et avec une élution hybride basée sur un gradient de sels et de

pH pour une séparation optimale des isoformes. L'échantillon de référence analysé avec cette méthode présente un profil chromatographique avec deux pics principaux, correspondant aux fragments Fc/2 et F(ab')₂. Environ 6% et 16% de formes acides sont observées respectivement pour les fragments Fc/2 et F(ab')₂, et 24% de formes basiques sont détectées sur le fragment Fc/2 (dues à l'hétérogénéité du nombre de lysines C-terminales, voir article pour plus de détails). Comme attendu, l'échantillon dégradé présente un profil plus complexe avec l'apparition de deux pics acides représentant 15% et 45% du fragment Fc/2, et une augmentation significative des formes acides (37%) du pic F(ab')₂. Le couplage à la spectrométrie de masse rend possible une identification directe de ces protéoformes. Les conditions natives d'analyse permettent également de maintenir les interactions non-covalentes entre les domaines CH3 des fragments Fc/2. Ainsi, malgré l'absence de ponts disulfures inter-chaînes, le dimère (Fc/2)₂ est conservé lors de l'analyse IEX-MS. Les deux principaux pics acides du fragment (Fc/2)₂ de l'échantillon dégradé présentent des variations de masse de +1 Da et +2 Da par rapport à la masse du pic (Fc/2)₂ majoritaire (M_{Théo(G0/G0)}=50108,1 Da) de l'échantillon de référence. Ces variations de masse et l'élution de ces pics vers des temps de rétention compatibles avec la présence de formes acides suggèrent fortement que la principale modification subie par l'échantillon stocké 9 ans à +5°C est la déamidation de la région Fc de l'anticorps. Parmi les autres dégradations observées pour cet échantillon, des clivages de liaisons peptidiques dans les régions inférieures et supérieures de la région charnière de l'anticorps ont été mis en évidence. Les spectres de masse des formes acides du fragment F(ab')₂ suggèrent également la présence de formes oxydées (+16 Da) et déamidées, mais la précision de masse obtenue pour des fragments avec une masse moléculaire aussi élevée (M_{Théo}=99705,2 Da) ne permet pas de l'affirmer avec certitude.

Dans le but d'identifier les modifications de la partie Fab de l'anticorps, l'enzyme KGP clivant les IgG dans la partie supérieure de la région charnière a été utilisée pour générer des fragments Fab (M_{Théo}=48437,2 Da) deux fois plus petits que le fragment F(ab')₂ (M_{Théo}=99705,2 Da) généré par l'IdeS. L'analyse IEX-MS des fragments générés par cette enzyme a permis de confirmer la présence de formes oxydées et/ou déamidées sur la région Fab de l'échantillon dégradé.

Analyse des échantillons par LC-MS/MS

Des cartes peptidiques de l'échantillon dégradé ont été effectuées avec cinq endoprotéases différentes pour fournir une couverture de séquence complète et une localisation fiable des modifications post-traductionnelles. Le nombre élevé de peptides générés par cette approche multi-enzymes a permis d'estimer un niveau moyen de modification pour chaque MPT sur la base des aires relatives des chromatogrammes d'ions extrait des peptides modifiés *versus* non-modifiés. Deux sites de déamidation, Asn₇₄ et Asn₃₉₈, et deux sites d'oxydation, Met₁₂₁ et Met₂₆₁, ont été identifiés sur la chaîne lourde exclusivement. Les modifications de la Met₁₂₁ et de l'Asn₇₄, localisées sur la partie Fab de l'anticorps, présentent des niveaux de modification correspondant à 14,5 % et 14,4% du signal, respectivement. Concernant la partie Fc de l'anticorps, un taux d'oxydation de 7,3% a été observé pour Met₂₆₁, et un taux de déamidation de 37,0% a été observé pour Asn₃₉₈. Cette dernière modification correspond à la principale dégradation observée pour l'échantillon ayant subi un stockage prolongé à 5°C et semble cohérent avec les données obtenues par IEX-MS. En effet, en considérant l'état dimérique du fragment Fc/2 observé en conditions natives, et la réaction de déamidation comme un événement indépendant, un niveau de déamidation de 37% du résidu Asn₃₉₈ conduit statistiquement à une abondance de 47% de fragment (Fc/2)₂ avec une déamidation (+1 Da) et de 14% de fragments (Fc/2)₂ avec deux déamidation (+2 Da). Les calculs statistiques sont décrits ci-dessous :

$$(Fc/2)_2(1 \text{ déamidation}) = ((\text{Taux déamidation Asn}_{398}) \times (1 - \text{Taux déamidation Asn}_{398})) \times 2$$

$$(Fc/2)_2(2 \text{ déamidations}) = (\text{Taux déamidation Asn}_{398}) \times (\text{Taux déamidation Asn}_{398})$$

Ces résultats sont cohérents avec les aires relatives des pics acides du fragment (Fc/2)₂ observés par IEX-MS, soit 45% pour le pic avec une déamidation (+1 Da) et 15% pour le pic avec deux déamidations (+2 Da). De même, les données LC-MS/MS confirment la présence des formes oxydées et déamidées observées par IEX-MS sur la région Fab.

En conclusion, cette étude décrit le couplage d'une méthode de chromatographie d'échange d'ions avec la spectrométrie de masse pour une identification directe des protéoformes d'un anticorps monoclonal. Dans le but d'améliorer la résolution chromatographique, la précision de masse et pour obtenir une première localisation des modifications présentes sur l'anticorps, cette méthode IEX-MS a été associée à une approche *middle-up* consistant à focaliser l'analyse

sur les sous-unités de l'anticorps générées à l'aide d'enzymes. La caractérisation d'isoformes de protéines implique généralement l'utilisation de stress forcés (pH, oxydation, chauffage...), mais dans cette étude, c'est l'évolution à long terme d'un anticorps stocké à 5°C qui a été évaluée. Les résultats obtenus par IEX-MS, et confirmés par LC-MS/MS, ont mis en évidence des modifications secondaires telles que l'oxydation et la déamidation de la partie Fab et le clivage de liaisons peptidiques au niveau de la région charnière de l'anticorps. Durant le stockage prolongé à basse température, la modification majeure observée est la déamidation du résidu Asn₃₉₈ de la partie Fc de l'anticorps. Sachant que les études de dégradations forcées ont tendance à montrer la présence de multiples sites de dégradations, notre étude suggère que l'évolution lente de cet anticorps a conduit à une dégradation très spécifique, suggérant une sensibilité de la partie Fc à la déamidation dans des conditions de stockage prolongées à basse température.

II. Publication

Cette étude a été publiée dans *Journal of Chromatography B* :

Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 °C, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 1048 (2017) 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017>.



Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 °C



Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux*

LFB Biotechnologies, 3 Avenue des Tropiques, 91958, Courtabœuf, Les Ulis, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2016

Received in revised form 20 January 2017

Accepted 14 February 2017

Available online 20 February 2017

Keywords:

Mass spectrometry

Ion exchange chromatography

IdeS

Deamidation

Monoclonal antibody

Charge variants

ABSTRACT

Numerous putative post-translational modifications may induce variations of monoclonal antibodies charge distribution that can potentially affect their biological activity. The characterization and the monitoring of these charge variants are critical quality requirements to ensure stability and process consistency. Charge variants are usually characterized by preparative ion exchange chromatography, collection of fractions and subsequent reverse-phase liquid chromatography with mass spectrometry analysis. While this process can be automatized by on-line two-dimensional chromatography, it remains often complex and time consuming. For this reason, a straightforward on-line charge variant analysis method is highly desirable and analytical laboratories are actively pursuing efforts to overcome this challenge.

In this study, a mixed mode ion exchange chromatographic method using volatile salts and coupled on-line to native mass spectrometry was developed in association with a middle-up approach for a detailed characterization of monoclonal antibodies charge variants. An aged monoclonal antibody, presenting a complex charge variant profile was successfully investigated by this methodology as a case study. Results demonstrate that deamidation of the heavy chain was the major degradation pathway after long-term storage at 5 °C while oxidation was rather low. The method was also very useful to identify all the clipped forms of the antibody.

© 2017 LFB Biotechnologies. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are complex proteins susceptible to numerous post translational modifications (PTMs) that may induce charge heterogeneity. The monitoring of these PTMs during the development of therapeutic products is an important quality requirement for regulatory authorities.

Charge variations of proteins differ within the type of modification; some PTMs directly modify the net charge of proteins while others induce conformational changes and variation of local charge distribution. The loss of a positive charge may occur during the upstream process of monoclonal antibodies by the clipping of C-terminal lysine [1,2] or through a non-enzymatic reaction

of glycation in which reducing sugars covalently link amines of lysine residues [3–5]. Cyclization of N-terminal glutamines to form pyroglutamic acids is another example of positive charge loss of antibodies by the conversion of the N-terminal amine to a neutral amide [6,7]. Deamidation is a common degradation pathway of proteins that modifies non-enzymatically asparagine residues to aspartic acid and/or isoaspartic residues, resulting in the appearance of a negative charge [8–10]. Some other PTMs affect the local charge distribution without modification of the net charge of the proteins like methionine oxidation [11] or aspartic acid isomerization leading to the insertion of an extra methyl group into the backbone protein to form isoaspartic acid [12]. The modifications of charge profiles can potentially affect the structure and the biological activity of proteins. If C-terminal lysine clipping and N-terminal glutamine cyclization may not impact necessarily the functionality [13,14], oxidation of the Fc region [15] and asparagine deamidation in the Complementary Determining Region (CDR) of antibodies can cause significant reduction in receptor and antigen binding affinity [16].

Abbreviations: IgG, immunoglobulin G; RT, retention time; MS, mass spectrometry; IEX, ion exchange chromatography; mAbs, monoclonal antibodies; SEC, size exclusion chromatography; RP-HPLC, reverse phase high performance liquid chromatography.

* Corresponding author.

E-mail address: chevreuxg@lfb.fr (G. Chevreux).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017>

1570-0232/© 2017 LFB Biotechnologies. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Ion exchange chromatography (IEX) is the gold standard method for the characterization of protein charge variants and plenty of studies during the last decade describe charge profiles of mAbs [17–21]. Most of these studies report the impact of forced stress degradation at elevated temperature or alkaline pH on mAbs charge variants [22–24]. Degradations observed with such stresses mainly lead to an increase of acidic species, reflecting deamidation or oxidation reactions of proteins [25–27]. Identification of these different species is often performed by bottom-up approaches involving enzymatic digestion and LC–MS/MS analysis after collection of IEX fractions. Besides the high workload, peptide mapping can induce artefactual degradations due to the number of preparation steps and especially during enzymatic digestions [8,28,29]. Recently, online two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry (2D-LC–MS) associated with a middle-up approach has been undertaken for charge variants characterization [30]. The direct assignment of the IEX peaks of the first chromatographic dimension is allowed by the reverse phase chromatography of the second dimension compatible with MS detection. However, 2D-LC remaining a complex and time consuming method [31,32], other strategies looking for the direct coupling of MS with non-denaturing chromatographic methods by the use of volatile salts are emerging [33]. Muneeruddin et al. analyzed successfully proteins of relatively modest size like lysozyme and stressed interferon- β by IEX-MS [34]. They also developed in another study a size exclusion chromatographic method with native MS detection for the characterization of small protein aggregates and oligomers [35]. Beyond the direct identification of isoforms by MS, the non-denaturing conditions used in these methodologies should also profit to investigative studies of conformational integrity by the use of ion mobility or interpretation of the mass spectra charge state distribution [36].

In this study, a mixed mode IEX chromatography coupled online to native MS was developed in association with a middle-up approach for the routine characterization of mAbs charge variants. An aged mAb, stored for nine years at 5 °C and presenting a complex charge variant profile was investigated by IEX-MS. Peptide mapping was additionally used to identify PTMs sites and bring orthogonal quantitative information. Results show a remarkable consistency and complementarity between IEX-MS and peptide mapping analysis. This study provides also valuable information regarding the slow process of mAbs degradation at 5 °C, whereas most of the reported charge variants data in literature come from forced degradation studies.

2. Material and methods

2.1. Material

The aged antibody was an internally produced drug substance at a concentration of 6.1 g/L and stored in the dark at +5 °C during 9 years in pure water pH 7.2 after sterile filtration. The reference antibody was also produced internally and stored for less than 2 years at 5 °C in a developed on purpose formulation buffer. The endoproteases FabRICATOR (IdeS) and GingisKHAN (KGP) were obtained from Genovis (Lund, Sweden). Acetonitrile (MeCN) was HPLC reagent grade and purchased from JT Baker (Philipsburg, NJ, USA). Ammonium acetate for mass spectrometry, ammonium formate, formic acid, sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasique (Na₂HPO₄), HCl, Dithiothreitol (DTT) and Iodoacetamide (IAA) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Trifluoroacetic acid (TFA) and acetic acid (glacial) were obtained from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany). Trypsin Gold mass spectrometry grade and pepsin were purchased from Promega (Madison, USA), Endoproteinase Glu-C

sequencing grade and Chymotrypsin were obtained from Roche Diagnostic (Mannheim, Germany), Proteinase K was purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). All the aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (18.2 M Ω cm resistivity at 25 °C, total organic carbon (TOC) < 5 ppb).

2.2. Ion exchange chromatography (IEX) of the intact IgG

100 μ g of intact IgG were analyzed on an Ultimate 3000 system using a MAbPac SCX-10 4 mm \times 250 mm column (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) equilibrated at 30 °C and operated at a flow rate of 0.7 ml/min. The mobile phases consisted of 20 mM Na₂HPO₄ (Buffer A) and of 20 mM of Na₂HPO₄ with 250 mM of NaCl (Buffer B) and were buffered at pH 7. After an isocratic elution at 20% of B for 5 min, a linear gradient was applied from 20% to 50% of B in 40 min. The column was then washed for 5 min at 70% of B and further equilibrated during 25 min at 20% of B. Elution was monitored by UV absorbance at 280 nm.

2.3. Enzymatic digestions of IgG

Enzymatic proteolysis with IdeS was achieved by incubating 10 μ l of IgG at a concentration of 10 mg/ml in a phosphate saline buffer with 100 UI of FabRICATOR (IdeS) for 1 h at 37 °C. IgG proteolysis with KGP was carried out by incubating 10 μ l of IgG at a concentration of 10 mg/ml in a phosphate saline buffer with 100 UI of GingisKHAN (KGP) and 2 μ l of reducing agent (to yield 2 mM cysteine in reaction) for 2 h at 37 °C.

2.4. Cation exchange chromatography coupled to native mass spectrometry (IEX-MS)

Separation of IgG fragments generated by enzymatic digestions was performed by an Acquity system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a UV detector and an electrospray mass spectrometer (Synapt G2S, Waters, Milford, MA, USA). Mass spectrometry compatible mobile phases used for ion exchange chromatography were 50 mM ammonium formate buffered with formic acid at pH 3.9 (Buffer A) and 500 mM ammonium acetate pH 7.4 (Buffer B). Around 50 μ g of sample were injected on a MAbPac SCX-10 4 mm \times 150 mm column (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) equilibrated at 30 °C and operated at a flow rate of 0.4 ml/min. After an isocratic elution at 15% of B for 5 min, a linear gradient was applied from 15% to 50% of B in 55 min. The column was then washed for 5 min at 70% of B and further equilibrated during 25 min at 15% of B. The mass spectrometer was operated in the positive resolution mode and data were recorded from m/z 2000–6000. Calibration was achieved on the acquisition range using cluster ions generated by a NaI solution diluted at 2 g/L in a mixture of water/isopropanol 50/50 (V/V) according to manufacturer's procedure. Source parameters were optimized to get the best transmission and desolvation of ions. Source and desolvation temperature were set at 80 °C and 200 °C respectively. The cone voltage was at 130 V and the source offset at 65 V. The nebulizer gas flow was set at 6 bar and the source pressure of 5 mbar was not modified and corresponds to the standard operating pressure of the stepwave based interface of the mass spectrometer. Native protein mass spectra were deconvoluted manually using the MassLynx software and taking into account the three to five most intense charge states (5% intensity cutoff) depending on mass spectra.

2.5. Peptide mapping

The protein (200 μ g) was vacuum-dried and dissolved in 25 μ l of 8 M urea, 0.2 M ammonium acetate solution pH 7.2. Reduction was accomplished by adding 10 μ l of a 85 mM DTT solution in water and

incubating the resulting mixture for 15 min at 50 °C. After cooling at room temperature, 10 μ l of a 170 mM IAM solution in water were added and the solution was incubated at RT for 15 min in the dark.

Digestions were conducted overnight at 37 °C with a substrate/enzyme ratio of 1/10 w/w and 1/30 w/w (proteinase K) after an eight-fold dilution with water (final pH of 6.9 after dilution). Five separate digestions were done with trypsin, Chymotrypsin, Glu-C, proteinase K and pepsin enzymes. In the particular case of pepsin, pH was adjusted to 2.0 by adding HCl before digestion.

Peptides obtained after digestion (40 μ g) were injected on a CSH C18 column (2.1 \times 150 mm, 1.7 μ m) using an ACQUITY UPLC system interfaced with a SYNAPT G2-S HDMS mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The column was equilibrated at 60 °C and operated at a flow rate of 300 μ l/min. An aqueous solution containing 0.1% FA and MeCN containing 0.1% FA were respectively used as buffer A and buffer B, proteins were eluted by using an increasing gradient of buffer B. The mass spectrometer was operated in the positive mode, at a 20000 FWHM resolution, using a capillary voltage of 3 kV, a source block temperature of 80 °C and a desolvation temperature of 150 °C. Calibration was carried out according to manufacturer's procedure using NaI cluster ions. MS data were recorded from m/z 200 to m/z 2000 and MS/MS launched in HDDA mode to enhance fragments ions sensitivity with the wide-band enhancement option (1MS in 1 s and 3MS/MS in 0.5s). Data were analyzed with Peaks Studio 8.0 software with a parent mass error tolerance of 25 ppm, a fragment mass error tolerance of 0.1 Da and a FDR of 5%. The Peaks PTM module was used after DeNovo sequencing and database search to find the position of MPTs. All putative MPTs were considered as variable modifications while carbamidomethylation was the only one to be fixed.

3. Results

3.1. Analysis of intact IgG charge variants by standard IEX chromatography

Fig. 1 displays ion exchange chromatograms of both reference and aged samples analyzed using a salt gradient at pH 7.0. The chromatogram of the reference sample (see Fig. 1A) shows acidic variants representing 10% of the total UV area, a main peak eluting at 27.4 min (80%) and two basic forms eluting at 29.0 min and 31.0 min (10%). The two basic forms were identified as lysine variants because of the observed loss of their related peaks following carboxypeptidase B treatment and thus enzymatic clipping of the heavy chains C-terminal lysine residues (data not shown). The variant eluting as the main peak corresponds obviously to the antibody without any heavy chain C-terminal lysine residues while acidic forms should probably result from cumulative PTMs giving supplementary negative charges such as deamidation or sialylation.

The IEX chromatogram of the aged sample, displayed in Fig. 1B, shows a high level of acidic variants (74%) in comparison with the reference sample (10%). These acidic variants are mostly eluted as an acidic pre-peak at 26.9 min. As a consequence, the major peak previously observed for the reference batch decreased dramatically at 22% for the aged sample (elution at 27.6 min) which indicates the occurrence of important chemical modifications of the antibody at 5 °C.

3.2. Middle-up analysis of IgG charge variants by IEX-MS

IdeS enzyme was used to specifically cleave the heavy chains in the hinge region to generate Fc/2 and F(ab')₂ fragments [37,38] before IEX analysis. This sample treatment, generating two mAb fragments, was introduced to decrease the chromatographic cumulative effect of multiple PTMs and to get lower masses more

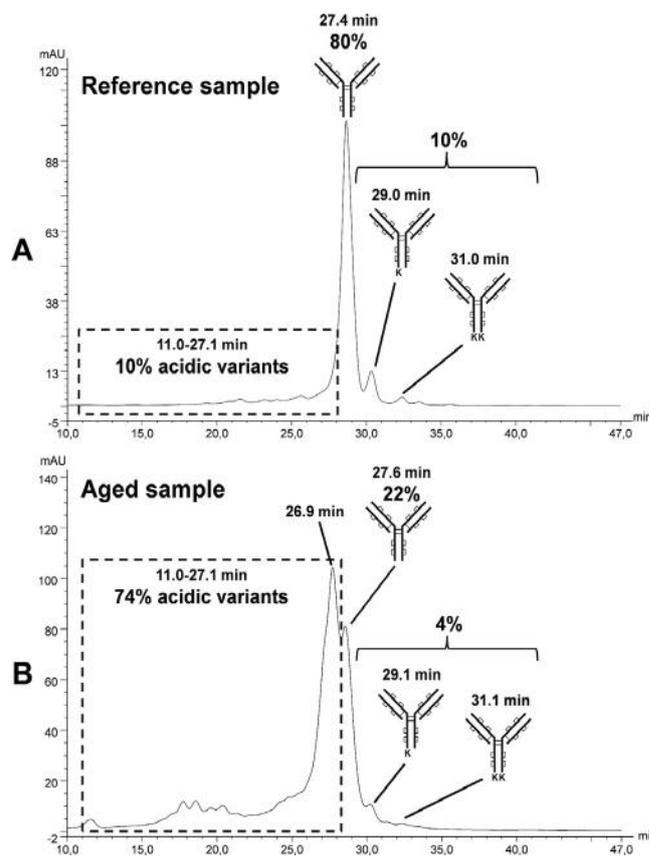


Fig. 1. Ion exchange chromatograms of the reference sample (A) and the degraded sample (B) with UV detection at 280 nm.

amenable to mass measurement with high accuracy. A particular attention has been paid to get high IEX chromatographic resolution using only volatile salts compatible with mass spectrometry. For this purpose, a mixed mode IEX separation based on both pH and salt gradient was developed successfully to separate charge variants of IdeS derived antibody fragments. For information, similar chromatographic profiles were obtained with a modified method using traditional sodium phosphate and chloride buffers as control (data not shown). Fig. 2 presents IEX chromatograms of both aged and reference antibodies after IdeS digestion. The IEX profile of the reference (see Fig. 2A) shows species eluted at retention times lower than 20 min and identified as dimers of Fc/2 fragment. This chromatogram shows 6% of acidic variants, 24% of basic forms due in part to the presence of C-terminal lysines and a main peak eluting at 16.1 min, corresponding to the Fc/2 dimer without C-terminal lysines and accounting for 70% of the Fc/2-related total UV area. Two shoulders associated to each peak were observed and attributed to species containing one or two fucosylated glycans. Differentially fucosylated glycans were indeed easily separated by IEX but to reduce charge variant complexity efforts were made to minimize this effect. F(ab')₂ fragments were eluted much later, at retention times between 45 and 60 min. The main peak eluting at 55.0 min accounted for 84% of F(ab')₂-related signal and 16% of acidic variants were detected between 45.9–54.5 min. No basic forms were detected in accordance with the fact that C-terminal heavy chain lysine is the major cause of basic variants for this monoclonal antibody.

The IEX profile of the aged sample, displayed in Fig. 2B, shows a higher level of acidic variants for the Fc/2 related peaks characterized by two early eluted peaks at 13.1 min and 14.7 min, accounting for respectively 15% and 45% of the Fc/2 related signals. No clear basic peaks were detected, probably due to cumulative modifications leading to overlapping peaks. MS was used to identify online

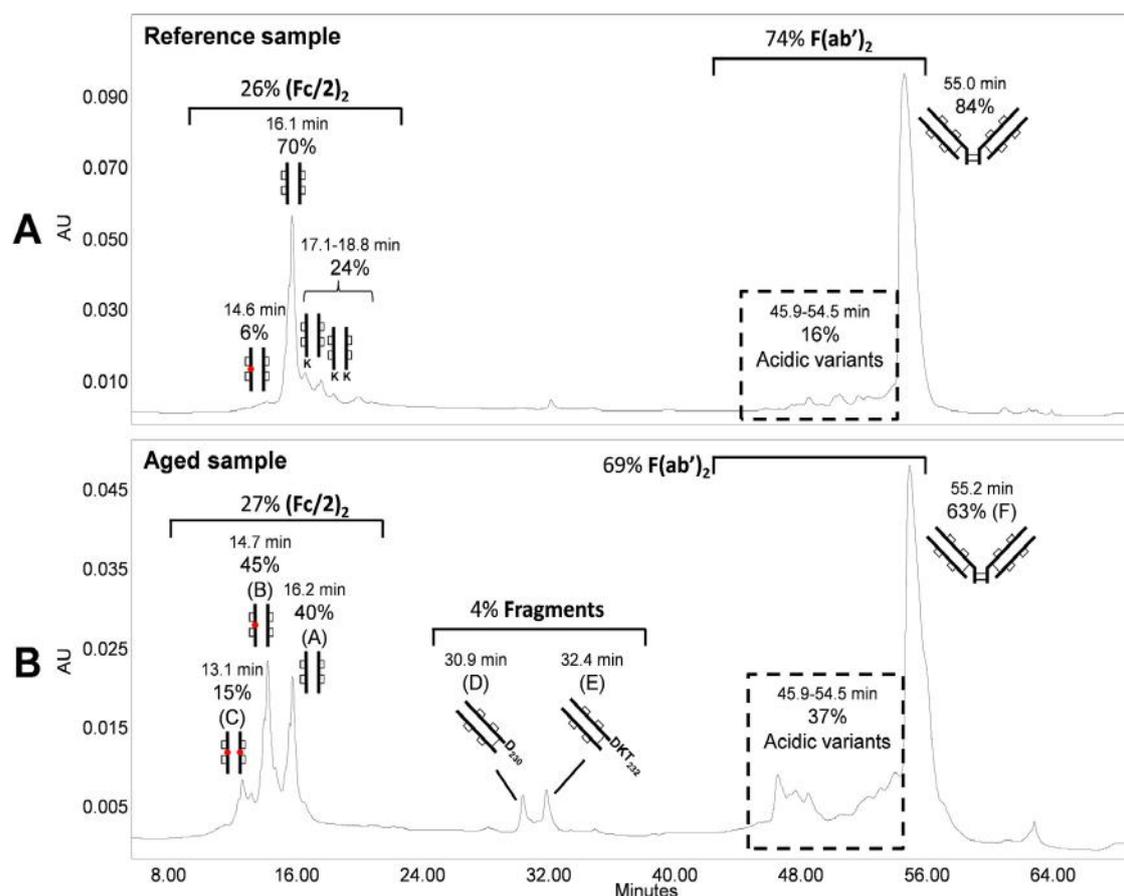


Fig. 2. Ion exchange chromatograms of the reference sample (A) and the aged sample (B) after IdeS enzymatic digestion (UV detection at 280 nm).

the eluted species by recording mass spectra in non-denaturing conditions. The non-deconvoluted mass spectra of these three major peaks are displayed in Fig. 3 panels A to C in accordance with the labelling of the respective peaks in Fig. 2B. The spectra present overall comparable ion charge state distribution suggesting similar structural conformation between the charge variants.

The native conditions of analysis provided by the present IEX-MS method enable the conservation of non-covalent interactions between the CH3 domains of the Fc/2 fragments [39,40]. Thus, despite the absence of inter-chain disulfide bonds, the dimeric state of the Fc/2 is conserved in the gas phase of the mass spectrometer. A high mass heterogeneity is thus expected due to the large number of glycan structures combination. Only the lowest mass corresponding to one Fc/2 dimer with two agalactosylated, afucosylated biantennary glycan structures (G0) was indicated in Fig. 3 while all the deconvoluted masses are summarized in Table 1. The experimental mass of the reference peak (Fig. 3, panel A) was of 50108.6 ± 0.2 Da, in close accordance with the theoretical one of 50108.1 Da (considering a couple of G0 glycan structures). The two major acidic charge variants displayed masses of 50109.3 ± 0.1 Da (panel B) and 50110.3 ± 0.3 Da (panel C) showing successive additions of +1 Da, strongly indicative of deamidation reactions.

Therefore, the acidic form eluting at 14.7 min corresponds to the dimeric form of Fc/2 with one deamidation, while the most acidic form eluting at 13.1 min is deamidated two times. Same conclusions were drawn by the comparison of deconvoluted masses given with other couple of glycoforms (see Table 1). Moreover, the comparative analysis of the reference sample (see Fig. 2A) supported also the result of one deamidation for the first acidic variant and showed that oxidized species were detected as minor basic variants in addition to C-terminal lysine variants (data not shown).

The aged sample displayed also two peaks eluted at 30.9 and 32.4 min (see Fig. 2B) and representing 4% of the total UV area. Their mass spectra show masses of 48309.0 ± 0.3 Da (Fig. 3D) and 48538.3 ± 0.2 Da (Fig. 3E) respectively. These experimental masses match with the theoretical ones of Fab fragments with a heavy chain cleaved between D₂₃₀-K₂₃₁ ($M_{\text{theo}} = 48308.9$ Da) and between T₂₃₂-H₂₃₃ ($M_{\text{theo}} = 48538.2$ Da). Other minor masses were detected on Fig. 3D-E and attributed to the complementary Fab + hinge fragment with terminal clipping heterogeneity (data not shown). These peaks were not detected for the reference sample.

Considering peaks eluted from 45 to 60 min (see Fig. 2B), a major variant is still observed for the aged sample (at 55.2 min) but decrease in abundance from 84% to 63% compared to the reference sample. An increase of acidic variants from 16% to 37% is also noticed.

The mass spectrum of the main peak displayed in Fig. 3F shows an experimental major mass of 99708.2 ± 1.8 Da that matches with the theoretical one of the intact F(ab')₂ fragment ($M_{\text{theo}} = 99705.4$ Da). Two lower masses of respectively 99423 Da and 99139 Da were also detected and corresponding to successive decreases of about 285 Da. This loss of mass was attributed to the loss of the three C-terminal amino acids of the heavy chain (LLG). Interestingly, this cleavage and loss of three amino acids does not induce any variant separation by IEX. Combined spectra in the area related to acidic variants indicated masses close to the one of the main peak and with about +16 Da (data not shown). These results suggest also deamidation and oxidation reactions during ageing of the product but mass accuracy is not high enough to draw clear conclusions on this high molecular weight fragment.

In order to investigate specifically the Fab related charge variants, the KGP enzyme was used to cleave specifically the antibody in the upper hinge region to generate Fab fragments with lower

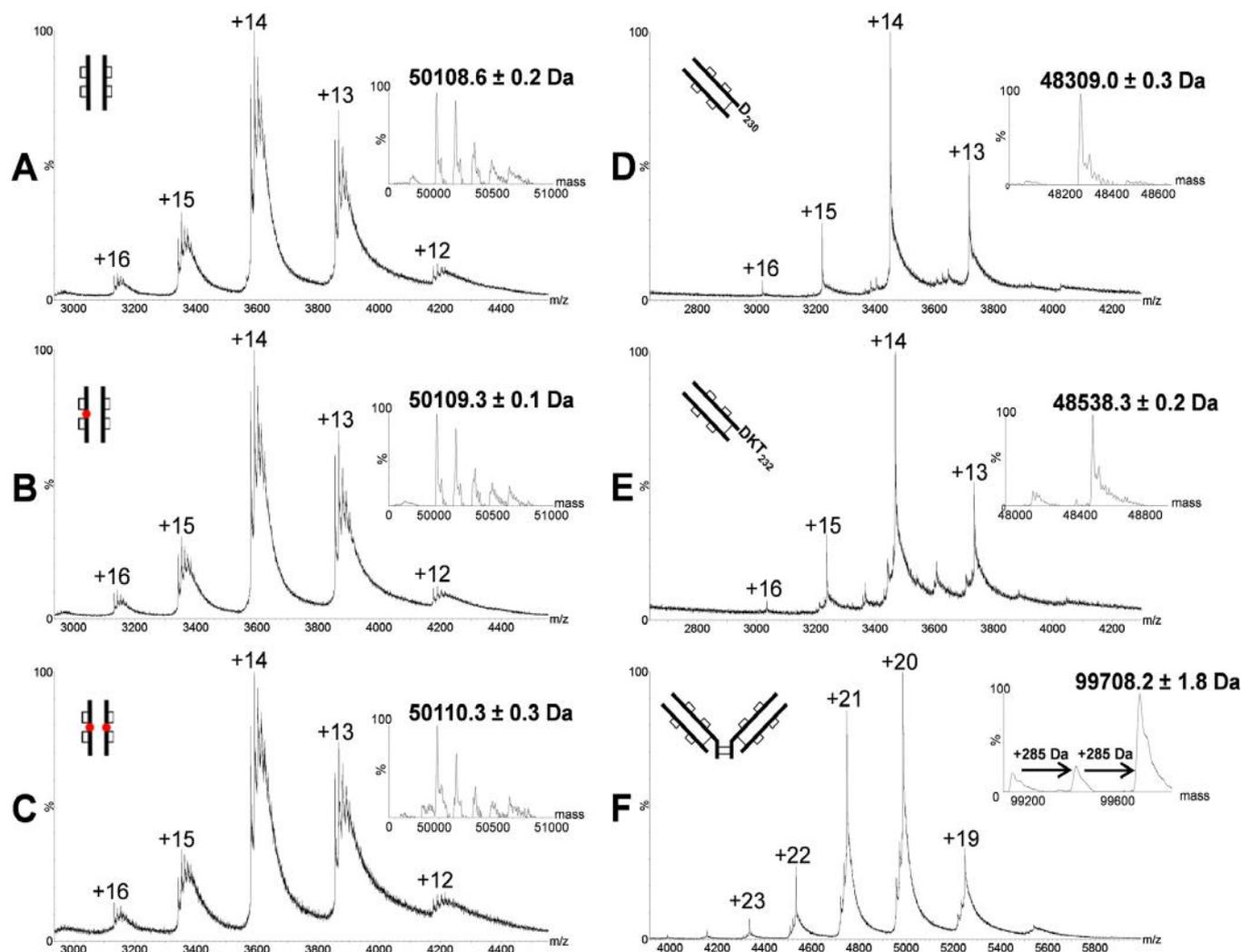


Fig. 3. Native mass spectra of the aged sample charge variants after IdeS enzymatic digestion with the labelling of the respective peaks in Fig. 2B. Inserts represent deconvoluted mass spectra.

Table 1

Result summary of masses observed by IEX-MS for the aged sample after IdeS enzymatic proteolysis.

Retention Time (min)	Residues	Theoretical Mass (Da)	Experimental Mass (Da)	Error
16.2	(Fc/2) ₂ (G0/G0)	50108.1	50108.6 ± 0.2	10 ppm
	(Fc/2) ₂ (G0/G1)	50270.2	50269.6 ± 0.2	8 ppm
	(Fc/2) ₂ (G1/G1)	50432.2	50430.3 ± 1.6	37 ppm
	(Fc/2) ₂ (G1/G1F)	50578.3	50578.3 ± 0.4	0 ppm
14.7	(Fc/2) ₂ (G0/G0) + 1 deamidation	50109.1	50109.3 ± 0.1	4 ppm
	(Fc/2) ₂ (G0/G1) + 1 deamidation	50271.2	50270.8 ± 0.2	8 ppm
	(Fc/2) ₂ (G1/G1) + 1 deamidation	50433.2	50432.9 ± 0.3	6 ppm
	(Fc/2) ₂ (G1/G1F) + 1 deamidation	50579.3	50579.2 ± 3.4	2 ppm
13.1	(Fc/2) ₂ (G0/G0) + 2 deamidations	50110.1	50110.3 ± 0.3	4 ppm
	(Fc/2) ₂ (G0/G1) + 2 deamidations	50272.2	50272.2 ± 0.2	0 ppm
	(Fc/2) ₂ (G1/G1) + 2 deamidations	50434.2	50434.4 ± 3.9	4 ppm
	(Fc/2) ₂ (G1/G1F) + 2 deamidations	50580.3	50579.6 ± 3.5	14 ppm
30.9	Fragment Fab – K ₂₃₁	48308.9	48309.0 ± 0.3	2 ppm
32.4	Fragment Fab + T ₂₃₂	48538.2	48538.3 ± 0.2	2 ppm
55.2	(Fab') ₂	99705.4	99708.2 ± 1.8	28 ppm

molecular weights than F(ab')₂ fragments. This enabled a better MS characterization of Fab-related charge variants but induced a chromatographic focalization of the Fc and Fab fragments leading to overlapping peaks. For this reason, the recorded UV trace was not useable for quantification of Fab-related charge variants but native MS could still be used for identification. Mass spectra of the Fab charge variants are displayed in Fig. 4. Panel A shows an experimental mass of 48437.3 ± 0.3 Da for the major variant in keeping with the theoretical mass of the Fab ($M_{\text{theo}} = 48437.2$ Da) while

mass spectra of acidic species show masses of 48438.5 ± 0.5 Da (Panel B) and 48453.3 ± 0.4 Da (Panel C) corresponding respectively to deamidated (+1 Da) and oxidized (+16 Da) Fab variants. As explained earlier, series of non-labelled ions related to the Fc are also observed on panel C due to the co-elution of the Fc and Fab acidic isoforms. These results confirm the presence of only deamidated and oxidized variants as acidic species of Fab fragments.

Table 2

Relative quantification of the identified PTMs deduced from the peptide mapping experiments by comparison of XIC areas of modified versus non-modified peptides.

Modification sites	Peptides (Endoprotease)	Relative quantification (%)	Average (%)	Standard deviation
Asp₇₄	Ser ₇₁ -Tyr ₈₀ (Chymotrypsine)	15.4	14.4	1.2
	Thr ₆₉ -Leu ₇₉ (Pepsine)	14.6		
	Asp ₇₃ -Arg ₉₈ (Trypsine)	13.1		
Met₁₂₁	Trp ₁₀₄ -Lys ₁₃₀ (Trypsine)	14.0	14.5	0.7
	Phe ₁₁₃ -Met ₁₂₁ (Pepsine)	15.0		
Met₂₆₁	Met ₂₆₁ -Phe ₂₈₄ (Chymotrypsine)	4.2	7.3	3.4
	Leu ₂₄₃ -Glu ₂₆₇ (Glu-C)	11.1		
	Thr ₂₅₉ -Glu ₂₆₇ (Glu-C)	4.6		
	Asp ₂₅₈ -Arg ₂₆₄ (Trypsine)	9.2		
Asp₃₉₈	Gly ₃₈₀ -Lys ₄₀₁ (Trypsine)	36.1	37.0	4.3
	Gly ₃₈₀ -Lys ₄₁₈ (Trypsine)	41.1		
	Trp ₃₉₀ -Lys ₄₀₁ (Trypsine)	36.2		
	Glu ₃₉₁ -Tyr ₄₀₀ (Chymotrypsine)	29.3		
	Glu ₃₉₁ -Tyr ₄₁₆ (Proteinase K)	33.1		
	Glu ₃₉₁ -Phe ₄₁₄ (Proteinase K)	40.7		
	Trp ₃₉₀ -Phe ₄₁₄ (Proteinase K)	41.8		
	Trp ₃₉₀ -Tyr ₄₁₆ (Proteinase K)	37.3		

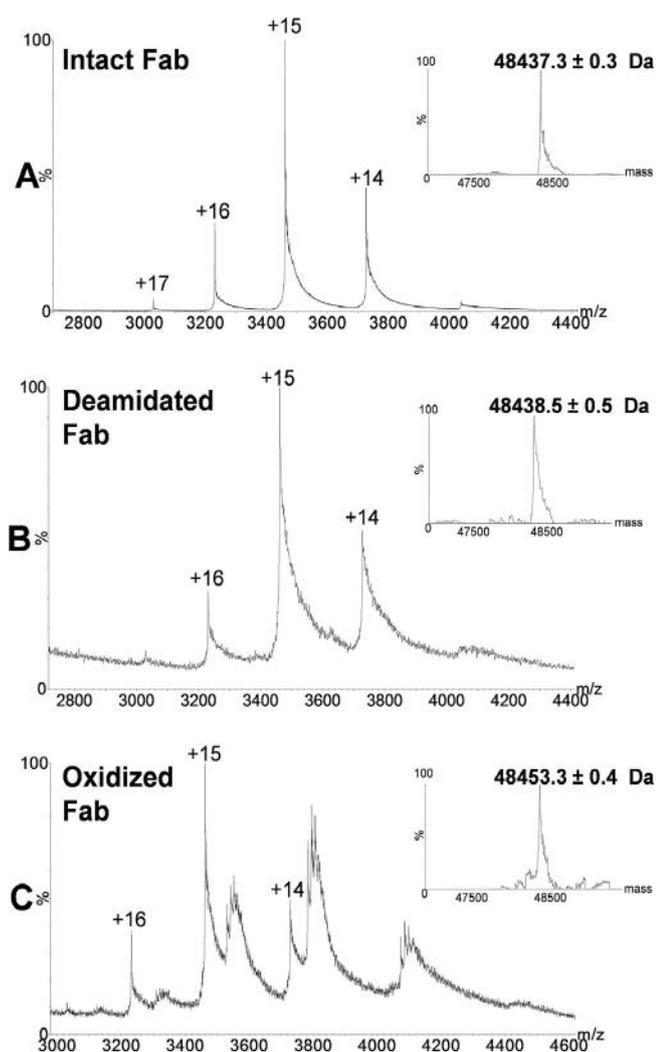


Fig. 4. Native mass spectra of Fab (Panel A), deamidated Fab (Panel B) and oxidized Fab (Panel C) after KGP enzyme digestion of the aged sample. Inserts represent deconvoluted mass spectra.

3.3. LC-MS/MS analysis of IgG charge variants

Peptide mapping analysis of the aged sample was performed using five orthogonal endoproteases in independent digestions. Cumulative coverage from five independent LC-MS/MS analysis was obtained after data processing using the Peaks studio software to provide full sequence coverage and to localize PTMs sites after

DeNovo sequencing of peptides. Due to the high number of peptides generated by the multi-enzyme approach, an average level of modification of the detected “hotspots” was estimated based on areas of the extracted ion chromatograms of modified versus non-modified isotope envelopes of peptides. The significant modified sites were deduced from the PTM module search (see Supplementary Fig. S1 in the online version at DOI: [10.1016/j.jchromb.2017.02.017](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017)). Two deamidation sites, Asn₃₉₈ and Asn₇₄, and two oxidation sites, Met₁₂₁ and Met₂₆₁, were identified as hotspots of degradation, exclusively located on the heavy chains while no modifications were observed on the light chains. Table 2 summarizes the quantification calculations based on MS signals. Met₁₂₁ of the heavy chain was oxidized at 14.5% and Asn₇₄ residue located in the variable region of the heavy chain was found deamidated at 14.4%. It can be noticed that this site was found deamidated in both asp and isoasp residues. These two residues are localized on the Fab region of the antibody. On the constant region of the heavy chain, Met₂₆₁ was oxidized at only 7.3% while a high extent of deamidation was detected at position 398 with a 37.0% conversion of Asn₃₉₈ residue into Asp₃₉₈ only.

As an example, Fig. 5A shows the extracted ion chromatogram (XIC) of peptide W₃₉₀ESNGQPEN₃₉₈NYK₄₀₁ identified as the most susceptible to deamidation. The two peaks eluted at 8.4 min and 9.2 min represent respectively intact and deamidated form of the peptide as shown by their monoisotopic mass spectra displayed in inserts. Other peaks observed on the XIC correspond to other tryptic peptides indicating that deamidation reaction leads here to only one product. The MS/MS spectrum of the deamidated peptide eluted at 9.2 min (see Fig. 5B) demonstrates the localization of the deamidation site at Asn₃₉₈ while deamidation at Asn₃₉₃ and Asn₃₉₉ were not detected. All these results are consistent with those reported by Robinson and Robinson who proposed a major hydrolysis-based mechanism for Asn deamidation that generates only the Asp residue unless it is followed by a small, flexible Gly residue on the C-terminus side [41,42]. It can also be noticed that Asn₃₉₉ has a large Tyr hydrophobic residue on its C-terminus side which generally lead to very slow deamidation.

4. Discussion

In this study, an aged antibody stored for 9 years at 5 °C under a neutral pH was investigated by conventional IEX chromatography and showed a dramatic increase of acidic variants in comparison to one reference. To further characterize the observed charge variants, a middle-up subunit analysis of this antibody was undertaken through the development of a specific IEX chromatography coupled on-line to native MS. The middle-up analysis of mAb sub-

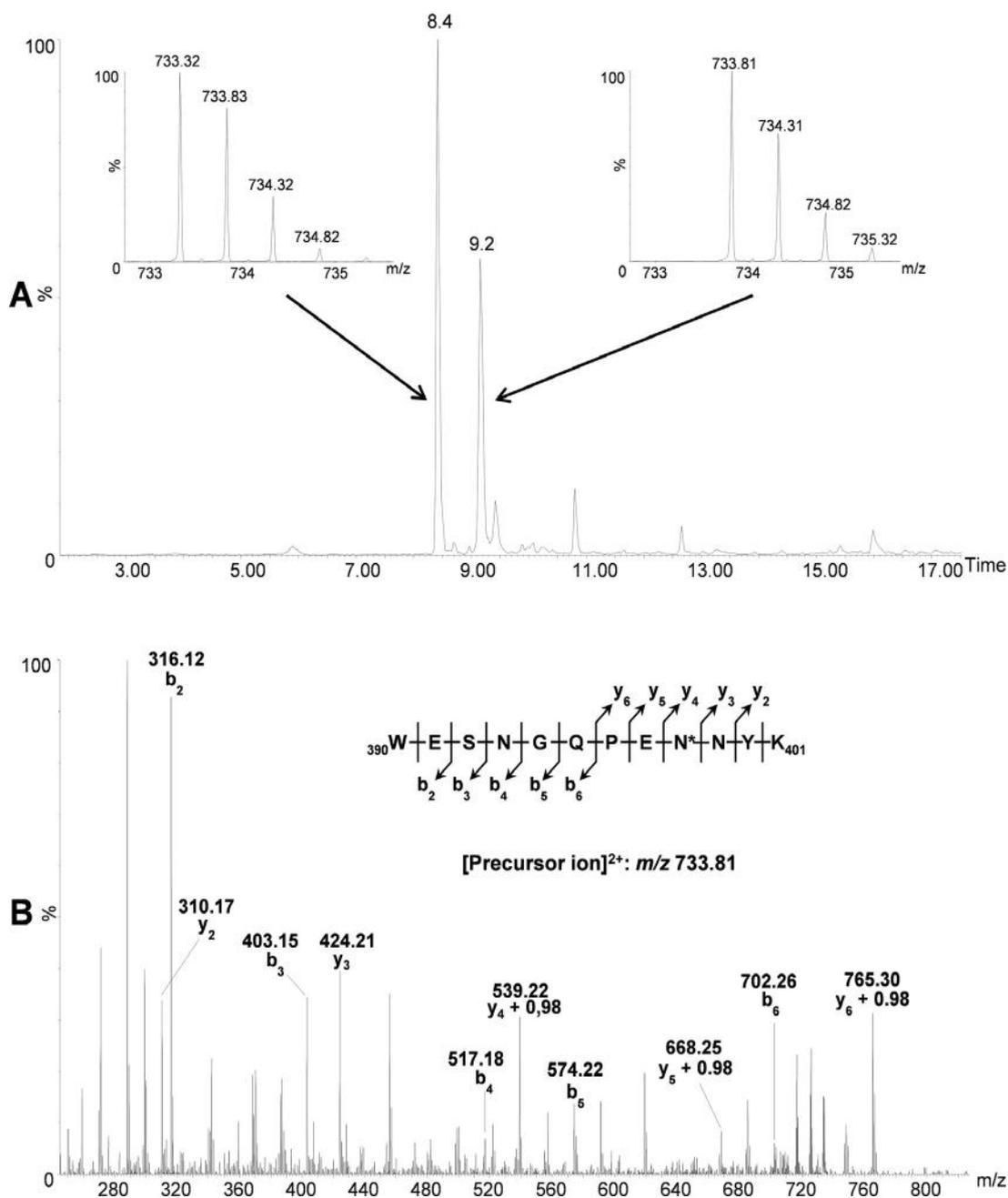


Fig. 5. Panel A represents the ion extracted chromatogram of Asn₃₉₈ modification in peptide W₃₉₀ESNGQPEN₃₉₈NYK₄₀₁ of the aged sample. Inserts represent monoisotopic mass spectra of the intact and deamidated peptide. Panel B displays the MS/MS spectrum of the deamidated peptide.

units is increasingly popular, especially using the IdeS enzyme and RP-HPLC analysis of the released subunits [11,37,43]. Studying subunits presents major advantages like the improvement of chromatographic resolution, a better mass accuracy and a first idea of the localization of modifications. However, hyphenation of a middle-up sample preparation to IEX chromatography was first challenging to set up, due to the large difference of isoelectric point (pI) that might appear between the Fc/2 and the F(ab')₂ fragments of IgGs. Thus, a mixed mode IEX method was developed here, consisting of both pH and salt gradient. An initial acidic pH of the mobile phase was required to bind the Fc/2 to the stationary phase due to the overall low pI of this subunit, while high salt concentration and neutral pH were essential to eluate the F(ab')₂ subunit having a much higher pI. Moreover, the coupling of IEX and mass spectrometry required the use of volatile salts like ammonium acetate/formate [44]. Despite all of these constraints, a successful chromatographic separation of the two subunits and

their related charge variants was obtained, allowing the relative quantification of the different isoforms. This method was also used successfully in the case of other antibodies (not shown) which suggests that it could be widely applicable to IgG1 with some case by case adjustments. Furthermore, other enzymes such as GKP could be an alternative to IdeS by clipping IgGs in the upper hinge region to generate Fc and Fab fragments. IEX chromatography with on-line native MS detection has been already reported for the separation and analysis of beta₂-microglobulin folding conformers [45] but to our knowledge, this is the first proof of concept that this approach is applicable to IgGs. MS data can thus be gathered more straightforwardly than with fraction collection [46–48] or more complex 2D set-up [30–32].

Frequently, the study of isoforms is based on material derived from accelerated degradation protocols involving high temperature, extreme pH, add of oxidizing agents or other stresses. In this study, the very long term evolution of an antibody at 5 °C has been

investigated and only few specific degradation sites were identified. Deamidation was from far the major modification detected on the Fc/2 by IEX-MS. It was traduced by the appearance of two acidic consecutive peaks estimated at 15% and 45% of the total Fc/2-related signal. On-line MS identified these forms as doubly and singly deamidated Fc/2 respectively. It has to be noticed that in the native conditions used with the IEX-MS analysis, the Fc/2 was detected as a dimer by MS, showing the conservation of some non-covalent interactions involving the CH3 domains of the heavy chains. Peptide mapping revealed an almost exclusive deamidation of the constant region of the heavy chain at the Asn₃₉₈ position corresponding here to the CH₃ domain with the amino acid sequence SNGQPEN₃₉₈NYK. Deamidation into Asp only was detected as previously described for this site [49]. Based on intensities of multiple deamidated *versus* non-deamidated peptides obtained with several digesting enzymes, the level of deamidation of Asn₃₉₈ was estimated at 37.0%. Considering Fc/2 eluted as a dimer by IEX and that deamidation is an independent event, this level of deamidation gives a statistical abundance of the singly deamidated Fc/2 dimer of 47% and of 14% for the doubly deamidated variant. This result was thus in very close accordance with the profile found by IEX chromatography and the estimation of these species at 45% and 15% respectively. Chelius et al. demonstrated that deamidation of human IgGs depends on the tri-dimensional structure and the primary amino acid sequence of the proteins, highlighting amino acid motifs susceptible to deamidation [50]. At physiological pH, the major deamidation pathway of the Fc has been described to be related to the SNGQPENNYK sequence in which the deamidation of the first two asparagines has been previously observed [22,24,49,51]. Other sites of deamidation have been identified in the conserved region of IgGs such as in the VSNK motif at Asn₃₃₀ [24] occurring under thermal stress conditions at mildly acidic pH or in the WLNGK motif of the CH₂ domain [28,52]. Our data indicates instead a very specific deamidation at the second asparagine only (Asn₃₉₈) of the sequence SNGQPEN₃₉₈NYK and, in addition, in significant levels. As deamidation could be a very slow process at physiological pH and low temperature, most of studies related to deamidation are conducted with material issued from stress conditions. However this result suggests that hot spots identified in forced degradation studies could be in fact fewer in number when the antibody is stored at low temperature (2–8 °C). For information, a representative IEX degradation profile was obtained in our case using forced degradation conditions described by Ponniah et al. [27] and involving short incubation at 40 °C in ammonium bicarbonate buffer pH 8 (see supplementary Fig. S2 in the online version at DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.02.017). Deamidation was also observed on the Fab domain both by IEX-MS and by peptide mapping. In our experiments, only Asn₇₄ residue within a DN₇₄SQD motif was identified deamidated and to an extent of 14.4%. A large number of studies described deamidation/isomerization at Asn₅₅ position of the heavy chain CDR2 region or at Asn_{30,33} of the light chain CDR1 [51] but these results should be strongly antibody-dependent as they are located in variable regions.

After IdeS digestion and IEX separation, a couple of very well separated peaks eluting between Fc and (Fab')₂ fragments were identified as clipped (Fab')₂ fragments resulting from cleavages in the upper hinge region. This result is very consistent with cleavage sites already reported in the literature [53]. Indeed, the flexible upper hinge region of IgGs has been reported as very sensitive to fragmentation mechanisms like direct hydrolysis, β-elimination, copper-mediated cleavage or free-radical catalysis [54–56]. Interestingly, another undescribed cleavage site was found in our aged sample. It corresponds to a cleavage in the lower hinge region, C-terminally to the glutamic acid from the motif PAPELLG. In our IEX-MS experiment involving a prior IdeS digestion, this cleavage is followed by the loss of the tripeptide LLG on the (Fab')₂ fragment

and does not induce either a modification of its isoelectric point and chromatographic separation. This cleavage was rather identified on the mass spectrum of the (Fab')₂ fragment and was also confirmed by classical RP-HPLC analysis of heavy and light chains after mAb reduction (data not shown). It should be noticed that the appearance of these first mono-clipped forms does not induce a mass shift observable in native conditions as used in size exclusion chromatography (SEC) experiments due to non-covalent interactions between CH3 domains. As a consequence, the monitoring of this lower hinge cleavage during stability studies by SEC could be more difficult than upper hinge cleaved forms.

The oxidation state of our aged antibody was not particularly high as already reported for storage in the dark and low temperature conditions [57]. In IEX-MS experiments, oxidized forms of the Fc were eluted as basic forms relatively to the Fc in accordance with Chumsae et al. observations [58] while oxidation of the (Fab')₂ induced an acidic shift. Only two methionine residues of the heavy chain at positions 121 and 261 were found oxidized by peptide mapping and estimated at a level of 14.5% and 7.3% respectively based on MS signals. Oxidation of the Fc has been widely described in the literature [59]. Two particular Met residues in humanized and fully human antibodies have been described as highly susceptible to oxidation reactions after exposure to high temperature, oxidative agent (tBHP) and intense light [57,58]. These Met residues are conserved within the constant part of the Fc domain and are located in the CH₂–CH₃ interface at positions 261 and 437 (using the present antibody numbering). Oxidation of Met₄₃₇ was hardly detected in the case of our aged antibody, which indicates that, under low oxidative conditions *i.e.* in the dark at 5 °C, Met₂₆₁ is the most sensitive to oxidation as already reported by Pan et al. [15]. Met₂₆₁ was also reported by the same authors to be involved in the binding of the FcRn receptor; therefore its oxidation may be expected to have detrimental effect on the biological activity of our antibody. Met₁₂₁ residue is part of the fragment region that binds to the antigen but is not located in any of the three hypervariable regions of our antibody which suggests a rather low functional importance of this modification. Results of this long-term stability in pure water and the fact that an appropriate formulation with protective excipients could mitigate the kinetic of antibody oxidation both suggest that oxidation could be confidently controlled at low level for this product.

In conclusion, an ion exchange chromatography method coupled on-line to native MS has been developed for the characterization of monoclonal antibodies charge variants. When combined with specific hinge digestion, isoforms of F(ab')₂ and Fc fragments were successfully resolved and analyzed on-line by native MS, demonstrating an easy way to monitor antibody charge variants. An aged antibody stored 9 years in the dark at 5 °C was studied by this methodology and by peptide mapping. While forced stress studies often describe numerous degradation sites, our results show that only few residues are modified and exclusively on the heavy chain. This suggests that forced stress studies should be taken with caution. Although deamidation reactions were observed on both the Fc and the F(ab')₂ regions, the Fc appeared as the most sensitive. Deamidation of Asn₃₉₈ residue into Asp₃₉₈ was identified and its quantification from peptide mapping experiments correlated very well with results of IEX chromatography considering deamidation of one and two heavy chains as independent statistical events. In fact, deamidation of Asn₃₉₈ contributed almost exclusively to the acidic charge variant profile of the Fc. Deamidation of Asn₇₄ residue into Asp and Isoasp residues was also detected and contributes, in combination with Met₁₂₁ oxidation, to the acidic variants of the F(ab')₂ fragment. Finally, the presented IEX-MS method was also very useful to detect cleaved forms of the antibody.

Conflict of interest

All authors are employees of LFB BIOTECHNOLOGIES, subsidiary of LFB SA group.

Acknowledgements

We wish to acknowledge all colleagues at LFB Biotechnologies and LFB Biomufacturing who contributed to monoclonal antibodies projects.

References

- [1] J. Vlasak, R. Ionescu, Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9 (2008) 468–481.
- [2] A. Beck, M.C. Bussat, N. Zorn, V. Robillard, C. Klinguer-Hamour, S. Chenu, L. Goetsch, N. Corvaia, A. Van Dorsselaer, J.F. Haeuw, Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NS0 cells, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 819 (2005) 203–218.
- [3] Y. Leblanc, N. Bihoreau, M. Jube, M.H. Andre, Z. Tellier, G. Chevreux, Glycation of polyclonal IgGs: effect of sugar excipients during stability studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 102 (2016) 185–190.
- [4] M. Habberger, K. Bomans, K. Diepold, M. Hook, J. Gassner, T. Schlothauer, A. Zwick, C. Spick, J.F. Kepert, B. Hienz, M. Wiedmann, H. Beck, P. Metzger, M. Molhoj, C. Knoblich, U. Grauschopf, D. Reusch, P. Bulau, Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies: susceptibility vs. functionality of critical quality attributes, *MAbs* 6 (2014) 327–339.
- [5] C. Quan, E. Alcalá, I. Petkovska, D. Matthews, E. Canova-Davis, R. Taticek, S. Ma, A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior, *Anal. Biochem.* 373 (2008) 179–191.
- [6] W. Zhang, M.J. Czupryn, Analysis of isoaspartate in a recombinant monoclonal antibody and its charge isoforms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1479–1490.
- [7] R.J. Harris, B. Kabakoff, F.D. Macchi, F.J. Shen, M. Kwong, J.D. Andya, S.J. Shire, N. Bjork, K. Totpal, A.B. Chen, Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 752 (2001) 233–245.
- [8] P. Hao, S.S. Adav, X. Gallart-Palau, S.K. Sze, Recent advances in mass spectrometric analysis of protein deamidation, *Mass Spectrom. Rev.* (2016).
- [9] D. Gervais, Protein deamidation in biopharmaceutical manufacture: understanding, control and impact, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 569–575.
- [10] H. Liu, G. Gaza-Bulsecu, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426–2447.
- [11] Y. Leblanc, M. Romanin, N. Bihoreau, G. Chevreux, LC-MS analysis of polyclonal IgGs using IdeS enzymatic proteolysis for oxidation monitoring, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 961C (2014) 1–4.
- [12] K. Diepold, K. Bomans, M. Wiedmann, B. Zimmermann, A. Petzold, T. Schlothauer, R. Mueller, B. Moritz, J.O. Stracke, M. Molhoj, D. Reusch, P. Bulau, Simultaneous assessment of Asp isomerization and Asn deamidation in recombinant antibodies by LC-MS following incubation at elevated temperatures, *PLoS One* 7 (2012) e30295.
- [13] G. Jiang, C. Yu, D.B. Yadav, Z. Hu, A. Amurao, E. Duenas, M. Wong, M. Iverson, K. Zheng, X. Lam, J. Chen, R. Vega, S. Ulufatu, C. Leddy, H. Davis, A. Shen, P.Y. Wong, R. Harris, Y.J. Wang, D. Li, Evaluation of heavy-chain C-terminal deletion on product quality and pharmacokinetics of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 2066–2072.
- [14] B. Hintersteiner, N. Lingg, P. Zhang, S. Woen, K.M. Hoi, S. Stranner, S. Wiederkum, O. Mutschlechner, M. Schuster, H. Loibner, A. Jungbauer, Charge heterogeneity: basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors, *MAbs* 8 (2016) 1548–1560.
- [15] H. Pan, K. Chen, L. Chu, F. Kinderman, I. Apostol, G. Huang, Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn, *Protein Sci.* 18 (2009) 424–433.
- [16] J. Vlasak, M.C. Bussat, S. Wang, E. Wagner-Rousset, M. Schaefer, C. Klinguer-Hamour, M. Kirchmeier, N. Corvaia, R. Ionescu, A. Beck, Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody, *Anal. Biochem.* 392 (2009) 145–154.
- [17] H. Lau, D. Pace, B. Yan, T. McGrath, S. Smallwood, K. Patel, J. Park, S.S. Park, R.F. Latypov, Investigation of degradation processes in IgG1 monoclonal antibodies by limited proteolysis coupled with weak cation-exchange HPLC, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 868–876.
- [18] A. Neill, C. Nowak, R. Patel, G. Ponniah, N. Gonzalez, D. Miano, H. Liu, Characterization of recombinant monoclonal antibody charge variants using OFFGEL fractionation, weak anion exchange chromatography, and mass spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6204–6211.
- [19] K. Sandra, I. Vandenhede, P. Sandra, Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization, *J. Chromatogr. A* 1335 (2014) 81–103.
- [20] G. Teshima, M.X. Li, R. Danishmand, C. Obi, R. To, C. Huang, J. Kung, V. Lahidji, J. Freeberg, L. Thorner, M. Tomic, Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2091–2097.
- [21] S. Wang, R. Ionescu, N. Peekhaus, J.Y. Leung, S. Ha, J. Vlasak, Separation of post-translational modifications in monoclonal antibodies by exploiting subtle conformational changes under mildly acidic conditions, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6496–6502.
- [22] S. Gandhi, D. Ren, G. Xiao, P. Bondarenko, C. Sloey, M.S. Ricci, S. Krishnan, Elucidation of degradants in acidic peak of cation exchange chromatography in an IgG1 monoclonal antibody formed on long-term storage in a liquid formulation, *Pharm. Res.* 29 (2012) 209–224.
- [23] J. Kim, L. Jones, L. Taylor, G. Kannan, F. Jackson, H. Lau, R.F. Latypov, B. Bailey, Characterization of a unique IgG1 mAb CEX profile by limited Lys-C proteolysis/CEX separation coupled with mass spectrometry and structural analysis, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1973–1981.
- [24] Y.T. Zhang, J. Hu, A.L. Pace, R. Wong, Y.J. Wang, Y.H. Kao, Characterization of asparagine 330 deamidation in an Fc-fragment of IgG1 using cation exchange chromatography and peptide mapping, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 965 (2014) 65–71.
- [25] L. Huang, J. Lu, V.J. Wroblewski, J.M. Beals, R.M. Riggan, In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1432–1439.
- [26] H. Liu, G. Gaza-Bulsecu, J. Sun, Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 837 (2006) 35–43.
- [27] G. Ponniah, A. Kita, C. Nowak, A. Neill, Y. Kori, S. Rajendran, H. Liu, Characterization of the acidic species of a monoclonal antibody using weak cation exchange chromatography and LC-MS, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9084–9092.
- [28] G. Gaza-Bulsecu, B. Li, A. Bulsecu, H.C. Liu, Method to differentiate asn deamidation that occurred prior to and during sample preparation of a monoclonal antibody, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9491–9498.
- [29] D. Ren, G.D. Pipes, D. Liu, L.Y. Shih, A.C. Nichols, M.J. Treuheit, D.N. Brems, P.V. Bondarenko, An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins, *Anal. Biochem.* 392 (2009) 12–21.
- [30] D.R. Stoll, D.C. Harmes, J. Danforth, E. Wagner, D. Guillaume, S. Fekete, A. Beck, Direct identification of rituximab main isoforms and subunit analysis by online selective comprehensive two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 8307–8315.
- [31] M. Alvarez, G. Tremintin, J. Wang, M. Eng, Y.H. Kao, J. Jeong, V.T. Ling, O.V. Borisov, On-line characterization of monoclonal antibody variants by liquid chromatography-mass spectrometry operating in a two-dimensional format, *Anal. Biochem.* 419 (2011) 17–25.
- [32] D. Stoll, J. Danforth, K. Zhang, A. Beck, Characterization of therapeutic antibodies and related products by two-dimensional liquid chromatography coupled with UV absorbance and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1032 (2016) 51–60.
- [33] B. Chen, Y. Peng, S.G. Valeja, L. Xiu, A.J. Alpert, Y. Ge, Online hydrophobic interaction chromatography-mass spectrometry for top-down proteomics, *Anal. Chem.* 88 (2016) 1885–1891.
- [34] K. Muneeruddin, M. Nazzaro, I.A. Kaltashov, Characterization of intact protein conjugates and biopharmaceuticals using ion-exchange chromatography with online detection by native electrospray ionization mass spectrometry and top-down tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 10138–10145.
- [35] K. Muneeruddin, J.J. Thomas, P.A. Salinas, I.A. Kaltashov, Characterization of small protein aggregates and oligomers using size exclusion chromatography with online detection by native electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10692–10699.
- [36] C.S. Kaddis, J.A. Loo, Native protein MS and ion mobility large flying proteins with ESI, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1778–1784.
- [37] G. Chevreux, N. Tilly, N. Bihoreau, Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 212–214.
- [38] Y. An, Y. Zhang, H.M. Mueller, M. Shameem, X. Chen, A new tool for monoclonal antibody analysis: application of IdeS proteolysis in IgG domain-specific characterization, *MAbs* 6 (2014) 879–893.
- [39] R.J. Rose, A.F. Labrijn, E.T. van den Bremer, S. Loverix, I. Lasters, P.H. van Berkel, J.G. van de Winkel, J. Schuurman, P.W. Parren, A.J. Heck, Quantitative analysis of the interaction strength and dynamics of human IgG4 half molecules by native mass spectrometry, *Structure* 19 (2011) 1274–1282.
- [40] K. Gunasekaran, M. Pentony, M. Shen, L. Garrett, C. Forte, A. Woodward, S.B. Ng, T. Born, M. Retter, K. Manchulenko, H. Sweet, I.N. Foltz, M. Wittekind, W. Yan, Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 19637–19646.
- [41] N.E. Robinson, A.B. Robinson, Prediction of primary structure deamidation rates of asparaginyl and glutaminyl peptides through steric and catalytic effects, *J. Pept. Res.* 63 (2004) 437–448.
- [42] N.E. Robinson, A.B. Robinson, Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 4367–4372.

- [43] A.M. Goetze, Z. Zhang, L. Liu, F.W. Jacobsen, G.C. Flynn, Rapid LC-MS screening for IgG Fc modifications and allelic variants in blood, *Mol. Immunol.* 49 (2011) 338–352.
- [44] J.A. Loo, Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes, *Int. J. Mass Spectrom.* 200 (2000) 175–186.
- [45] L. Bertoletti, L. Regazzoni, G. Aldini, R. Colombo, F. Abballe, G. Caccialanza, E. De Lorenzi, Separation and characterisation of beta2-microglobulin folding conformers by ion-exchange liquid chromatography and ion-exchange liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 771 (2013) 108–114.
- [46] C.M. Eakin, A. Miller, J. Kerr, J. Kung, A. Wallace, Assessing analytical methods to monitor isoAsp formation in monoclonal antibodies, *Front. Pharmacol.* 5 (2014) 87.
- [47] K.A. Johnson, K. Paisley-Flango, B.S. Tangarone, T.J. Porter, J.C. Rouse, Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain, *Anal. Biochem.* 360 (2007) 75–83.
- [48] Y. Lyubarskaya, D. Houde, J. Woodard, D. Murphy, R. Mhatre, Analysis of recombinant monoclonal antibody isoforms by electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for streamlining characterization of recombinant monoclonal antibody charge heterogeneity, *Anal. Biochem.* 348 (2006) 24–39.
- [49] S. Sinha, L. Zhang, S. Duan, T.D. Williams, J. Vlasak, R. Ionescu, E.M. Topp, Effect of protein structure on deamidation rate in the Fc fragment of an IgG1 monoclonal antibody, *Protein Sci.* 18 (2009) 1573–1584.
- [50] D. Chelius, D.S. Rehder, P.V. Bondarenko, Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6004–6011.
- [51] Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, K. May, H. Liu, Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies, *MAbs* 4 (2012) 578–585.
- [52] R. Mukherjee, L. Adhikary, A. Khedkar, H. Iyer, Probing deamidation in therapeutic immunoglobulin gamma (IgG1) by 'bottom-up' mass spectrometry with electron transfer dissociation, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 879–884.
- [53] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, E. Lundell, Assessment of antibody fragmentation by reversed-phase liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 876 (2008) 13–23.
- [54] J. Vlasak, R. Ionescu, Fragmentation of monoclonal antibodies, *MAbs* 3 (2011) 253–263.
- [55] G. Gaza-Bulseco, H. Liu, Fragmentation of a recombinant monoclonal antibody at various pH, *Pharm. Res.* 25 (2008) 1881–1890.
- [56] A.J. Cordoba, B.J. Shyong, D. Breen, R.J. Harris, Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 818 (2005) 115–121.
- [57] X.M. Lam, J.Y. Yang, J.L. Cleland, Antioxidants for prevention of methionine oxidation in recombinant monoclonal antibody HER2, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1250–1255.
- [58] C. Chumsae, G. Gaza-Bulseco, J. Sun, H. Liu, Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 850 (2007) 285–294.
- [59] G. Gaza-Bulseco, S. Faldu, K. Hurkmans, C. Chumsae, H. Liu, Effect of methionine oxidation of a recombinant monoclonal antibody on the binding affinity to protein A and protein G, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 870 (2008) 55–62.

3. Optimisation d'une méthode de chromatographie d'échange d'ions couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse d'anticorps monoclonaux

I. Résumé de l'article

Les anticorps constituent l'une des principales classes de protéines thérapeutiques en raison de la haute spécificité avec laquelle ils peuvent cibler des antigènes, de leur demi-vie prolongée et de la tolérance de traitement qu'ils fournissent. Néanmoins, il s'agit de biomolécules complexes dont la caractérisation présente de nombreuses difficultés analytiques. Une des techniques privilégiées par les autorités pharmaceutiques pour la caractérisation de ces produits est la chromatographie d'échange d'ions (IEX) qui permet de séparer les protéines en fonction de leur charge et de caractériser des modifications telles que la déamidation ou la glycation. Cependant, des sels minéraux non-volatils sont traditionnellement utilisés dans les phases mobiles utilisées en IEX rendant impossible l'identification directe par MS des isoformes séparées. Mais l'utilisation de sels volatils tel que l'acétate d'ammonium dans la phase mobile rend possible le couplage direct de l'IEX à une source *electrospray* pour la caractérisation des isoformes par spectrométrie de masse. Dans cette étude, une nouvelle technologie de colonne (Bioresolve SCX mAb), composée de particules de polymère non-poreuses et modifiées chimiquement, pour limiter les interactions secondaires, a été évaluée pour la séparation des isoformes d'anticorps monoclonaux. Des sels volatils d'ammonium ont été utilisés dans la phase mobile pour permettre le couplage à la spectrométrie de masse et un gradient unique a été optimisé pour l'analyse des anticorps au niveau de la protéine entière ou au niveau de sous-unités après digestion avec les enzymes IdeS et IgdE. La méthode chromatographique est basée sur une phase mobile de faible concentration en sels d'ammonium (200 mM) et un gradient de sels court (16 min) concomitant avec une variation de pH (pH 5,6 à 7,0) pour obtenir une séparation optimale des isoformes. La colonne et la méthode ont été évaluées par l'analyse d'un anticorps de référence du NIST (*National Institut of Standard and Technology*) et de différents anticorps monoclonaux présentant des pI élevés. Les performances chromatographiques de la colonne ont été examinées en termes de linéarité, répétabilité et résolution.

Analyse de l'anticorps entier par IEX-MS

L'analyse d'anticorps entiers permet d'obtenir rapidement des informations non biaisées sur la structure de la protéine, même si l'hétérogénéité de biomolécules aussi grandes peut limiter les informations apportées par la chromatographie et la spectrométrie de masse. L'analyse de l'anticorps NIST entier par IEX-MS avec la colonne Bioresolve a néanmoins permis de fournir de précieuses informations structurales. Ainsi, La pyroglutamylation N-terminale (-17 Da), l'hétérogénéité du nombre de lysines C-terminales des chaînes lourdes (+/- 128 Da) et des clivages (-18 Da) de la région charnière de l'anticorps ont pu être identifiées. De même, des informations sur la N-glycosylation de l'anticorps ont été obtenues, avec l'identification sur le spectre de masse du pic principal de la structure G0F/G0F de l'anticorps ($M_{\text{Théo}}=148038$ Da) et de 6 additions de masses consécutives de +162 Da correspondant aux différentes combinaisons de structures G0F, G1F et G2F, ainsi qu'à la présence possible de α -Gal et de glycation. Par ailleurs, une isoforme mineure présente en très faible abondance (<0.1%) et compatible avec une N-glycosylation de la partie Fab a également été détectée.

Analyses de l'anticorps par IEX-MS après digestion à l'IdeS

Cette méthode permet aussi l'analyse de sous-unités de l'anticorps NIST. Le clivage de la partie inférieure de la région charnière de l'anticorps par l'enzyme IdeS conduit à la formation de deux fragments, un dimère non-covalent de fragments Fc/2 ($M_{\text{Théo(G0F/G0F)}}=50465$ Da) et un fragment F(ab')₂ ($M_{\text{Théo}}=97608$ Da), dont les formes acides et basiques peuvent être étudiées indépendamment pour une caractérisation détaillée et spécifique de chaque domaine. Le spectre de masse du pic principal du fragment (Fc/2)₂ permet la caractérisation du profil de N-glycosylation avec une meilleure résolution que pour l'anticorps entier avec notamment la détection de plusieurs formes mineures glycosylées sans GlcNAc terminales (-203 Da). Les formes basiques liées à l'absence de lysine C-terminales sont bien séparées et des isoformes déamidées (+1 Da) et sialylées (+306 Da) ont été détectées dans les formes acides du fragment (Fc/2)₂. Le spectre de masse du pic principal du fragment F(ab')₂ présente une masse expérimentale ($M_{\text{Exp}}=97613$ Da) proche de la masse théorique ($M_{\text{Théo}}=97608$ Da) malgré la taille importante de ce fragment. Un taux significatif de glycation est observé sur ce spectre suggérant la sensibilité de cette partie de l'anticorps à ce type de réaction. Les clivages déjà détectés lors de l'analyse de l'anticorps entier sont observés dans les formes acides du

fragment $F(ab')_2$, ainsi qu'une isoforme présentant un réarrangement des ponts disulfures inter-chaînes de la partie charnière pour former un pont disulfure intra-chaîne $Cys_{229}-Cys_{232}$. Cette isoforme n'a pas été détectée lors de l'analyse de l'anticorps entier en raison des interactions non-covalentes des domaines CH3 de la partie Fc maintenant l'intégrité de l'anticorps en conditions natives malgré l'absence des liaisons covalentes de la partie charnière reliant les deux chaînes lourdes. Mais le clivage de la chaîne lourde par l'IdeS rend possible l'identification de cette protéoforme en séparant le fragment $F(ab')_2$ de la partie $(Fc/2)_2$ dont les interactions non-covalentes maintenaient la structure de cette protéoforme. Enfin, la forme glycosylée (+2239 Da) du fragment $F(ab')_2$ a été identifiée à un temps de rétention légèrement inférieur à celui du pic principal.

Analyses de l'anticorps par IEX-MS après digestion à l'IgDE

Comme l'IdeS, l'enzyme IgDE est une protéase bactérienne qui a la capacité de cliver spécifiquement les IgG dans la partie supérieure de la région charnière pour libérer les sous-unités Fc et Fab de l'anticorps ayant des masses d'environ 50 kDa. En général, la faible différence de masses moléculaires entre ces deux fragments induit une sélectivité de séparation plus faible qu'entre les fragments $(Fc/2)_2$ et $F(ab')_2$ générés par l'IdeS. Mais l'utilisation de l'IgDE constitue une alternative intéressante pour obtenir une meilleure précision de masse pour la caractérisation des modifications de la partie Fab des anticorps. L'analyse du fragment Fc de l'anticorps NIST fournit des informations similaires à celles apportées par le fragment $(Fc/2)_2$, cependant, les histidines en position N-terminale du fragment Fc généré par l'IgDE peuvent induire la chélation d'ions métalliques avec pour conséquences des adduits sur les spectres de masse et une asymétrie des pics chromatographiques. L'analyse du fragment Fab a permis d'estimer un taux de glycation de 8% et de détecter de possibles formes déamidées et oxydées. Enfin, un taux de N-glycosylation de 0,05% de la partie Fab a pu être déterminé, ainsi que la détection de clivages de la partie charnière en cohérence avec les précédentes analyses.

Cette méthode a été appliquée à trois anticorps monoclonaux différents présentant des pl élevés (pl de 8,7 à 9,4) qui peuvent théoriquement poser des problèmes d'élution en chromatographie d'échange de cations. Les résultats ont montré que seul le fragment $F(ab')_2$ de l'anticorps ayant le pl le plus élevé a présenté des problèmes d'élution. Par ailleurs, une

séparation incomplète des fragments Fc et Fab de l'anticorps avec le pl le plus faible a été observée. De manière générale, la concentration en sels et le gradient de pH utilisés peuvent être modulés suivant le pl de l'anticorps et en fonction du type de sous-unités analysées. Les fragments F(ab')₂ peuvent demander un pouvoir d'élution plus important, alors qu'une séparation optimale des fragments Fc et Fab peut nécessiter un gradient avec une variation plus faible du pH ou de la concentration en sels.

Application de la méthode à différents anticorps monoclonaux

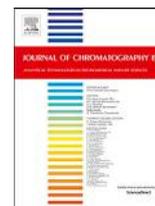
La robustesse de la méthode a été évaluée à travers des études de linéarité et de répétabilité par l'analyse de l'anticorps NIST entier et de ses sous-unités. Une linéarité des aires et des hauteurs de pics a été observée jusqu'à 10 µg de produit injecté. La répétabilité inter-analyse présente une grande stabilité de pression compatible avec une large gamme de systèmes chromatographiques. Une très bonne répétabilité est aussi observée en termes de temps de rétention, de résolution de pics et de taux de recouvrement. L'utilisation de six colonnes « Bioresolve » provenant de trois lots de production différents a démontré une uniformité satisfaisante en termes de pression, de taux de recouvrement, de temps de rétention et de résolution. Seule l'analyse du fragment Fc généré par l'enzyme IgD E présente des performances chromatographiques légèrement inférieures en termes de largeur et de symétrie de pic.

Lors de cette étude, nous avons évalué les performances d'une nouvelle colonne de chromatographie d'échange de cations pour l'analyse d'anticorps monoclonaux. Pour cela, une méthode a été développée afin de permettre le couplage direct avec un spectromètre de masse grâce à l'utilisation de sels volatils, mais également pour permettre l'analyse des anticorps à l'échelle de la protéine entière et de sous-unité avec un même gradient. Les résultats ont montré une très bonne sensibilité de la méthode avec la détection de formes peu abondantes (<0.1%), tout en étant compatible avec des systèmes chromatographiques standards. Enfin, la méthode a démontré sa capacité d'analyse d'une large gamme d'anticorps monoclonaux et une robustesse satisfaisante en termes de temps de rétention, de résolution de pics et de taux de recouvrement.

II. Publication

Cette étude a été publiée dans *Journal of Chromatography B* :

Y. Leblanc, V. Faid, M.A. Lauber, Q. Wang, N. Bihoreau, G. Chevreux, A generic method for intact and subunit level characterization of mAb charge variants by native mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 1133 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121814>.



A generic method for intact and subunit level characterization of mAb charge variants by native mass spectrometry

Y. Leblanc^a, V. Faid^a, M.A. Lauber^b, Q. Wang^{b,c}, N. Bihoreau^a, G. Chevreux^{a,*}

^a Analytical Department of LFB Biotechnologies, 3 Avenue des Tropiques, 91958 Courtabœuf, France

^b Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA 01757-3696, United States

^c Bristol Myers Squibb, 38 Jackson Rd, Devens, MA 01434, United States



ARTICLE INFO

Keywords:

Ion exchange chromatography
Charge variant
mAbs
Native mass spectrometry
Non-covalent

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (mAbs) are heterogeneous macromolecules that display a complex isoform profile as a result of the large series of modifications they can undergo. Product-related charge variants that are associated with a loss of biological activity or affected half-life and immunogenicity are especially important. Consequently, they are often considered critical quality attributes such that acceptance criteria and controls should be established. The characterization of mAbs charge variants has long been a time and resource consuming task. Recent successes in the use of salt mediated pH gradient ion exchange chromatography with volatile mobile phases have shown there to be significant promise in using online mass spectrometric (MS) detection to facilitate peak detection.

In this study, a newly developed 3 μm non-porous cation exchange column technology was investigated for its capability to be hyphenated to MS for the purpose of characterizing mAb charge variants. A 2 mm ID format was selected for the ease of configuring it to classical MS ESI ion sources. A monoclonal antibody reference material from NIST (RM 8671; NISTmAb) was used in its intact and IdeS/IgE-digested forms to test for column performance and MS sensitivity. Furthermore, three different mAbs with highly basic isoelectric points (pI) were analyzed in their native and proteolyzed forms to demonstrate the straightforward application of the developed technique even with mAbs having strong retention on cation exchange media. The MS detection of low-abundance charge variant species (< 0.1%) demonstrated there to be acceptable sensitivity and dynamic range even from routine analyses. The capability of the column to separate different mAbs having high basic pI was demonstrated, and it was found that slight adjustment of ammonium acetate concentration in the eluent can be a convenient way to rapidly optimize a separation if necessary. Linearity was shown to exist between protein mass loads of 2.5 and 50 μg while an optimal balance between chromatographic resolution and MS sensitivity was observed between 5 and 10 μg . Excellent run-to-run and column-to-column repeatability was achieved in terms of retention times, resolution and recovery.

1. Introduction

Antibodies are components of the blood produced by B lymphocytes and intended to bind specifically to foreign antigens. Monoclonal antibodies (mAbs) have become an important and popular class of medicines, given their high specificity, relatively long half-life and good tolerance obtained through advances in molecular biology and antibody engineering over the past three decades. From a development perspective, mAbs are nevertheless large biomolecules with complex post-translational modifications (PTMs) and are highly susceptible to

degradation [1]. Consequently, the heterogeneous and evolving content of mAb isoforms presents a challenging analytical task for characterization and stability testing. The use of analytical methods based on charge separations is especially encouraged by pharmaceutical authorities as these methods are stability indicating [2–4].

Ion exchange chromatography (IEX) has been widely used to achieve such product characterization. The method separates charge variants and gives the chance to collect isoforms for subsequent protein identification by MS analysis. This methodology has been successfully applied for years and a wide range of PTMs have been identified such as

Abbreviations: mAbs, monoclonal antibodies; PTMs, post-translational modifications; SCX, strong cation exchange; pI, isoelectric point; RT, retention time; Rs, resolution

* Corresponding author.

E-mail address: guillaume.chevreux@gmail.com (G. Chevreux).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121814>

Received 23 July 2019; Received in revised form 19 September 2019; Accepted 23 September 2019

Available online 16 October 2019

1570-0232/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

N- and C-terminus modifications, deamidation, isomerization, oxidation, fragmentation, aggregation, glycation etc. [3,5–35]. However, this experimental approach involves the collection of multiple fractions combined with both top-down and bottom-up approaches for characterization, which is expensive and time consuming. As a consequence, evaluation of charge variants remains a serious bottleneck in early developability assessment of mAbs while this information is of high importance at this stage [36–38]. Alternative automated 2D approaches have been proposed [39,40]; and more recently, mAb characterization by IEX directly coupled to native MS was successfully demonstrated [41]. Thereafter, the publication of new native MS-related work [42–45] suggested there to be significant interest in this application that expands upon more traditional tools for mAb characterization. In particular, Yan et al. [43] reported the development of an ultrasensitive IEX-MS method based on a 4.6 mm ID SCX column coupled to a nanospray ion source via a postcolumn passive splitter. Using this apparatus, they were able to detect a previously undetected low abundance Fab glycoform of NISTmAb.

Around the same time, a new column technology was introduced for separations of mAb charge variants (Bioresolve SCX mAb). Its stationary phase is based on a non-porous, 3 μm polymer particle grafted with a sulfonic acid ligand and a chemical modification to minimize hydrophobic secondary interactions. In the present study, this column was investigated with respect to its ability to separate mAb charge variants under native conditions with volatile mobile phase components and direct coupling to MS. A 2.1 mm ID column configuration was preferred for its easy coupling with classical, robust electrospray ionization (ESI) MS sources. It was also preferred that the column be based on a strong cation exchanger so that there would be little to no effects from column buffering capacity, which can sometimes be more readily observed with a weak cation exchanger. A protocol comprising the systematic analysis of mAbs at both their intact and IdeS/Igde digested molecular levels was employed along with a unique chromatographic gradient and three independent injections. Characterization results thus obtained for the NISTmAb RM 8671 (NISTmAb) were presented in order to assess MS sensitivity and the extent of information that could be ascertained with an easy-to-replicate protocol. The applicability to other challenging mAbs of higher pI was demonstrated and, finally, the chromatographic performance of the column was examined including linearity, repeatability, recovery and resolution.

2. Material and methods

2.1. Material

NIST IgG1 mAb standard (RM 8671) was purchased from National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Therapeutic mAbs 1, 2 and 3 (all IgG1) were produced internally at LFB Biomanufacturing (Alès, France). Endoproteases FabRICATOR (IdeS) and FabALACTICA (IgdE) were obtained from Genovis (Lund, Sweden). Ammonium acetate for mass spectrometry, sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) and HCl were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetic acid (glacial) was obtained from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany). All aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (18.2 M Ω ·cm resistivity at 25 °C, total organic carbon (TOC) < 5 ppb).

2.2. Enzymatic digestions

Enzymatic proteolysis with IdeS was achieved by incubating 10 μl of IgG at a concentration of 10 mg/ml in a phosphate saline buffer with 100 UI of IdeS for 1 h at 37 °C. For IgG proteolysis with IgdE, mAbs were diluted to 1 g/L using 100 mM phosphate buffer pH 7.0 and digested by IgdE protease at an enzyme-to-substrate (E/S) ratio of 1/10 (w/w) overnight at 37 °C corresponding to 100 units per 100 μg of mAbs. To note, mAbs digested with IgdE, may need a 10 kDa cut off UF

membrane concentration step to allow injection of the desired protein load if there is a restriction with the sample loop volume of the chromatographic system.

2.3. IEX chromatography

Separations of intact mAbs and fragments generated by enzymatic digestion were performed by an Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a UV detector and an electrospray mass spectrometer (Synapt G2S, Waters, Milford, MA, USA). Mass spectrometry compatible mobile phases used for ion exchange chromatography were 20 mM ammonium acetate buffered with acetic acid at pH 5.6 (Buffer A) and 200 mM ammonium acetate pH 7.0 (Buffer B). Around 5 μg of sample were injected onto a Bioresolve SCX mAb (2.1 mm \times 100 mm, 3 μm) column (Waters, Milford, MA, USA) equilibrated at 30 °C and operated at a flow rate of 0.1 ml/min. After an isocratic elution at 22% of B for 2 min, a linear gradient was applied from 22% to 100% of B in 16 min. The column was then washed for 9 min at 100% of B and further equilibrated during 17 min at 22% of B.

2.4. Mass spectrometry

The mass spectrometer was operated in positive resolution mode and data were recorded from m/z 2000 to 6000. Calibration was achieved on the acquisition range using cluster ions generated by a NaI solution diluted at 2 g/L in a mixture of water/isopropanol 50/50 (V/V). Source parameters were tuned to optimize the transmission and desolvation of ions. Source and desolvation temperatures were set at 80 °C and 200 °C, respectively. The cone voltage was set to 130 V and the source offset to 65 V. The nebulizer gas flow was set at 6 bars and the source pressure was 5 mbar, which corresponds to the standard operating pressure of the stepwave based interface of the mass spectrometer. Quadrupole MS profile settings were set as automatic. Data were visually inspected using the MassLynx software and native protein mass spectra were deconvoluted using the PMI Intact software (Protein Metrics, Cupertino, CA, USA) [46]. Theoretical masses were calculated using PeptideMass and GlycanMass tools provided by the ExPasy website [47] and Unimod [48] for others PTMs.

2.5. Qualification

Qualification experiments were all performed using an Acquity UPLC I-class system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to UV 280 nm detection. A protein load of 5 μg was used and the NISTmAb was analyzed as intact and IdeS/IgdE-digested samples. For run-to-run repeatability experiments, 5 consecutive injections were performed on a single column previously used for method development. For column-to-column experiments, five new columns were also tested and alternatively used after 2-h of equilibration in buffer A followed by the injection of 2 blanks. In total, 3 unique column batches were tested in duplicate. Recoveries were estimated using theoretical extinction coefficients (ϵ) of 1.42 ($\text{mL mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$) for intact NISTmAb [49] and calculations made via the ProtParam tool of the ExPasy website [47] and consideration of glycan mass fraction *i.e.* 1.40 for the (Fc/2)₂, 1.44 for the F(ab')₂, 1.34 for the Fc and 1.47 for the Fab subunit/domain.

3. Result and discussion

IEX chromatography of proteins is traditionally performed with an increasing gradient of exchangeable Cl⁻ or Na⁺ counterions. These non-volatile salts are well known to interfere with the electrospray ionization of proteins by generating multiple adducts on protein mass spectra, so many have assumed it to be impossible to directly couple IEX to ESI-MS. Despite the successful use of ammonium acetate buffer to investigate non-covalent complexes by MS, as reported in 1991 [50], hyphenation of IEX chromatography with MS, using ammonium acetate

buffer, was reported only recently [51]. Surprisingly, acceptable chromatographic resolution was obtained with these mobile phase conditions, even with large molecules like mAbs [41,42,45]. In an interesting paper, Farseng et al. [52] investigated salt-mediated pH gradients for IEX, albeit with non-volatile mobile phases. They observed that salt concentration and gradient steepness were the two most important chromatographic parameters to consider and they showed optimized parameters for improving resolution *i.e.* low salt concentration in buffer B and short gradient times or a higher salt concentration and long gradient times. In this study, we chose the first option with a relatively low volatile salt concentration of 200 mM ammonium acetate in the elution buffer paired with a short (16 min) salt gradient and a concomitant pH change from 5.6 to 7.0. These chromatographic conditions are comparable to those described by Yan *et al.*, the only differences being the final salt concentration (140 vs. 200 mM), final pH (7.4 vs. 7.0) and the column type/ID (4.6 mm vs. 2.1 mm). In addition, the appropriateness of these chromatographic conditions was substantiated by online size exclusion MS experiments in which the pH and concentration of ammonium acetate solutions were independently varied. In these experiments, as pH increased from pH 7 to 8 and beyond, a notable drop in ionization efficiency was observed. Yet, when the concentration of ammonium acetate was increased from 50 to 300 mM, there was seen to be only a marginal change in ion signal. Accordingly, we have found the most success with salt mediated pH gradients. To optimize the capabilities of this approach, the BioResolve SCX mAb column employed herein with its 2.1 mm ID format, was indeed preferred for its amenability to 0.1 ml/min flow rates and straightforward coupling to the conventional ESI ion source of the mass spectrometer.

3.1. IEX-MS analysis of the intact NISTmAb

Analyzing mAbs at their intact level is advantageous for quickly obtaining unbiased information with no sample preparation. However, the approach affords only limited chromatographic and mass spectrometric information because of the heterogeneity of such large molecules. The analysis of NISTmAb at the intact level is shown in Fig. 1 while Table 1 reports all the detected masses from this study with putative assignments based on mass accuracy. The main peak of the intact NISTmAb separation eluted at 15.6 min as displayed in panel A. MS data corresponding to this peak indicated that NISTmAb is pyroglutaminated at the N-terminus of its two heavy chains and free of C-terminal lysine. The corresponding deconvoluted mass spectrum in panel B highlights the glycosylation heterogeneity; a detected mass of 148041 Da is in accordance with a combination of G0F/G0F structures (M_{theo} 148038.2 Da) and up to six consecutive mass additions of about +162 Da were observed. These multiple mass increases result from the presence of additional galactose residues and different combinations of G0F, G1F and G2F structures. The presence of α -Gal epitopes and/or lysine glycation provide an explanation for peaks with up to 5 and 6 detected hexoses [53]. Furthermore, a partially aglycosylated form was detected at the same retention time (see panel C) at the mass of 146596.4 Da for the G0F-containing structure along with additional G1F and G2F structures. This variant was approximately estimated to be present at an abundance of about 0.3% based on peak to peak intensities of the deconvoluted mass spectra. Interestingly, this low abundance isoform has been reported so far by only one other group that used size exclusion coupled to a high resolution QTOF mass spectrometer [53]. On the right side of the main peak (Fig. 1A), three distinct peaks were separated and they can be attributed to basic variants having one and two C-terminal lysine residues (RT 16.1 and 16.8 min, respectively). One last minor peak eluted at 17.3 min with a mass and chromatographic behavior (basic shift) consistent with a lack of N-terminal pyroglutamination (see Table 1). In the acidic region of the chromatogram, two zones were of interest. A deconvoluted mass spectrum was obtained even for the low

abundance species at RT 15.1 min (panel D). Although the quality of this spectrum is somewhat inferior, an assignment to a potential structure could still be made. The observed mass of 150277.5 Da matches to the main molecule with two G0F glycans and one additional mass of +2239 Da, which was previously reported as being a very low abundance Fab-glycosylated variant (< 0.1%) with a G3FS structure comprising (HexNAc)₄(Hex)₆(DeoxyHex)₁(NeuGc)₁ [43]. Finally, a couple of early eluting peaks were detected in the acidic region between 10.9 and 12.9 min. Their deconvoluted masses are presented in panel E and correspond to Fab-related species released by upper-hinge cleavages at positions Cys₂₂₃, Asp₂₂₄ and His₂₂₇. Interestingly, these cleaved forms were not detected by Yan *et al.* [43]. However, in their study, they were able to identify the related fragment counterparts after deglycosylation of the sample. It might be that the detection of these Fab-related fragments was enabled by the column used in this study. Murisier *et al.* recently demonstrated the BioResolve SCX mAb 3 μ m to be more retentive than other commercialized cation-exchanger columns [54].

3.2. IEX-MS analysis of IdeS-digested NISTmAb

Immunoglobulin degrading enzyme from *Streptococcus* (IdeS) is a bacterial cysteine protease that specifically cleaves immunoglobulin G molecules at their lower hinge and it is regularly used in reverse phase chromatography to facilitate the analysis of mAbs [55]. Under native conditions, the enzyme releases two mAbs subunits, a dimerized non-covalent Fc/2 and a F(ab')₂ subunit weighing about 50 and 100 kDa, respectively. With an IEX separation, the acidic and basic charge variants of each subunit can be separately studied allowing for more detailed domain specific characterization. Fig. 2 panel A shows the chromatogram obtained for IdeS digested NISTmAb wherein two major peaks eluted at 7.7 min and 15.3 min. By mass analysis, these peaks were found to correspond to the (Fc/2)₂ and F(ab')₂ subunits. Panel B shows the deconvoluted mass spectrum of the (Fc/2)₂ subunit that was derived from the peak at 7.7 min. Glycosylation heterogeneity is still evident but it can be deciphered with better resolution. Experimental masses are in good agreement with combinations of G0F, G1F and G2F structures. Unlike the intact data, a second series of minor peaks could be observed and attributed to glycan compositions having lost a terminal GlcNAc. The basic lysine-related variants were well separated and detected at 8.5 and 9.6 min while deamidated and sialylated variants were detected in the acidic region between RT 7.0 and 7.2 min (see Table 1). At RT 15.3 min, an observed mass of 97612.7 Da is in reasonably good agreement with the theoretical mass of 97607.7 Da of the F(ab')₂ subunit. The addition of one hexose was also detected in significant abundance which suggests preferential glycation reactions on this subunit. It is also worth noting the presence of minor salt adducts on the deconvoluted mass spectrum; while present, they did not significantly disturb mass assignments. Eluting before this peak, between RT 10.9 and 12.9 min, a series of clipped F(ab')₂ variants were detected (see panel D). Detected masses of 47146.7 and 47628.2 Da are suggestive of Fab domains formed by clips at Cys₂₂₃ and His₂₂₇ respectively. Interestingly, the two counterparts were also detected but at lower abundances and masses of 50001.5 and 50483.6 Da. Of importance, the major deconvoluted mass of 48805.7 Da agrees well with a Fab-related variant originating from the unusual self-pairing of Cys₂₂₉ and Cys₂₃₂ from the hinge. This species was not observed when the intact mAb was analyzed, probably because of CH₃-CH₃ non-covalent interactions [56]. This methodology is thus of interest to probe the proper formation of hinge disulfide bridges in near native conditions that do not generate artefactual reduction. Finally, panel E shows the deconvoluted mass spectrum of the N-glycosylated F(ab')₂ which was seen to elute at RT 14.8 min. The presence of this variant is thus orthogonally confirmed in this experiment. Two basic variants were also detected for the F(ab')₂ subunit. The one that eluted at RT 17.4 min was

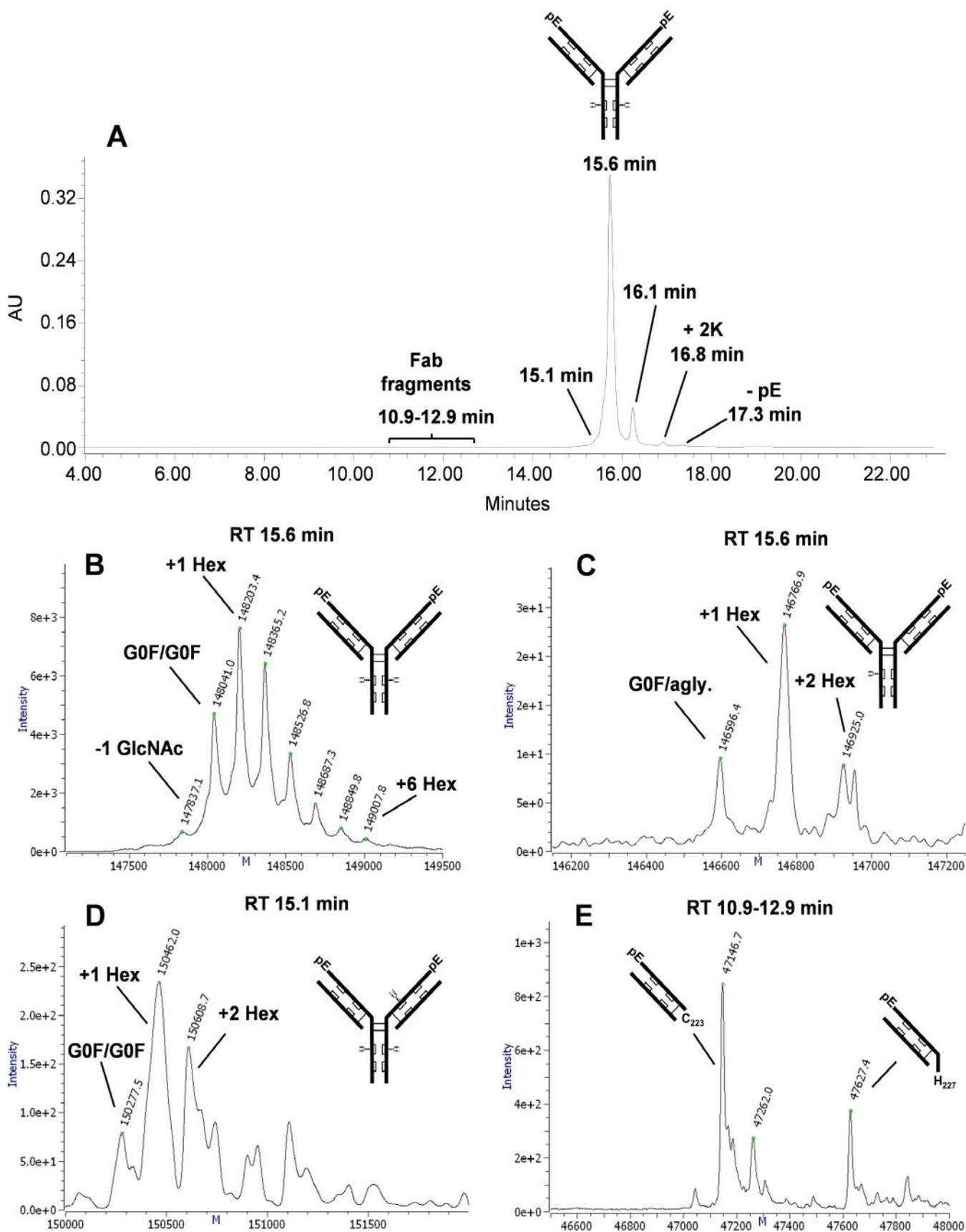


Fig. 1. Panel A represents the ion exchange chromatogram of the NISTmAb RM 8671 with UV detection at 280 nm. Panels B and C represent deconvoluted mass spectra at RT 15.6 min including the major isoform free of C-terminal lysine and N-terminally pyroglutaminated and a partially aglycosylated intact form, respectively. Panel D and E represent the deconvoluted mass spectra of a glycosylated-Fab isoform and Fab-related fragments, respectively.

Table 1
Result summary of NISTmAb RM 8671 masses observed by IEX-MS at intact and subunit levels.

Enzymatic treatment	Retention time (min)	Species	Glycoforms	Theo. masses (Da)	Exp. Masses (Da)	Errors (ppm)		
None (intact)	10.9–12.9	[Q1-C223] + LC	NA	47145.9	47146.7	17		
		[Q1-D224] + LC	NA	47261.0	47262.0	21		
		[Q1-H227] + LC	NA	47627.5	47627.4	-2		
	15.1	Main + Glycosylation	G0F/G0F + G3FS	150277.2	150277.5	2		
	15.6		Main	G0F/aglycosylated	146592.8	146596.4	25	
				G1F/aglycosylated	146754.9	146766.9	82	
				G2F/aglycosylated	146917.1	146925.0	54	
				G0F/G0F - GlcNAc	147835.0	147837.1	14	
				G0F/G0F	148038.2	148041.0	19	
				G0F/G1F	148200.3	148203.4	21	
				G1F/G1F	148362.4	148365.2	19	
				G1F/G2F	148524.6	148526.8	15	
				G2F/G2F	148686.7	148687.3	4	
		G2F/G2F + Hex		148848.9	148849.8	6		
		G2F/G2F + 2 Hex	149011.0	149007.8	-21			
	16.1	Intact + 1K	G0F/G0F	148166.3	148170.6	29		
	16.8	Intact + 2K	G0F/G0F	148294.5	148306.7	82		
	17.3	Intact + 1 N-ter Gln	G0F/G0F	148055.2	148062.1	47		
	IdeS	7.0–7.2	deamidated (Fc/2) ₂	G0F/G0F	50465.5	50465.8	6	
G0F/G1F				50627.6	50627.9	6		
G1F/G1F				50789.8	50790.6	16		
G1F/G2F				50951.9	50953.3	27		
Sialylated (Fc/2) ₂			G1F/G1F + NeuGc	51096.1	51097.7	31		
			G1F/G2F + NeuGc	51258.2	51258.6	8		
			G2F/G2F + NeuGc	51420.4	51421.4	19		
			G1F/G2F + 2NeuGc	51565.4	51562.9	-48		
			G2F/G2F + 2NeuGc	51727.6	51730.1	48		
			G0F/G0F	50464.5	50465.0	10		
7.7			(Fc/2) ₂	G0F/G0F	50626.6	50627.2	12	
				G1F/G1F	50788.8	50789.2	8	
		G1F/G2F		50950.9	50951.1	4		
		G2F/G2F		51113.1	51113.7	12		
		G2F/G2F + Hex		51275.3	51275.7	8		
		G0F/G0F - GlcNAc		50261.3	50261.6	6		
		G0F/G1F - GlcNAc		50423.4	50423.9	10		
		G1F/G1F - GlcNAc		50585.6	50586.3	14		
		G1F/G1F - GlcNAc		50747.7	50748.7	20		
		8.5		(Fc/2) ₂ + 1 K	G0F/G0F	50592.7	50593.2	10
					G0F/G1F	50754.8	50755.4	12
					G1F/G1F	50917.0	50917.5	10
G1F/G2F			51079.1		51078.5	-12		
9.6			(Fc/2) ₂ + 2 K		G0F/G0F	50720.8	50721.1	6
					G0F/G1F	50883.0	50883.6	12
10.9–12.9		HC[Q1-C223] + LC HC[Q1-D224] + LC HC[Q1-H227] + LC HC[Q1-G239] + LC HC[Q1-G239] + HC[T228-G239] + LC HC[Q1-G239] + HC[D224-G239] + LC	G1F/G1F	51045.1	51045.9	16		
			G1F/G2F	51207.3	51207.5	4		
			NA	47145.9	47146.7	17		
			NA	47261.0	47261.0	0		
			NA	47627.5	47628.2	15		
			NA	48804.8	48805.7	18		
			NA	50000.3	50001.5	24		
			NA	50481.8	50483.6	36		
			14.8	F(ab') ₂ + G3FS	G3FS	99846.7	99849.2	25
			15.3	F(ab') ₂	NA	97607.7	97612.7	51
				Glycated F(ab') ₂	1 Hex	97769.8	97771.6	18
			17.4	F(ab') ₂ + 1 N-ter Gln	NA	97624.7	97629.0	44
18.3		F(ab') ₂ + 341.1 Da	O-glucosylgalactosyl?	97948.0	97953.8	59		
IgDE		7.6–7.9	Deamidated Fc + Iron adducts	G0F/G0F	53094.6	53095.4	15	
				G0F/G1F	53256.7	53257.3	11	
				G1F/G1F	53418.8	53420.4	30	
				8.3	Fc (HC[His227-Gly249]2)	G0F/G0F	53093.6	53093.9
	G0F/G1F					53255.7	53256.5	15
	G1F/G1F					53417.9	53418.3	7
	G1F/G2F	53579.6	53580.3			13		
	G2F/G2F	53741.7	53743.3			30		
		G2F/G2F + Hex	53903.9	53905.6	32			
		G0F/G0F - GlcNAc	52891.4	52891.0	-8			
	9.3	Fc + 1 K	G0F/G0F	53221.7	53223.4	32		
	10.3–10.8	Fc + 2 K deamidated Fab	G0F/G0F	53349.9	53351.6	32		
			NA	47491.3	47492.2	19		
			Fab + G3FS	G3FS	49729.3	49730.1	16	
			Fab: (HC[Q1-T226] + LC)	NA	47490.3	47490.8	11	
	11.6	Glycated Fab	1 Hex	47652.4	47652.2	-4		
	12.9		HC[Q1-H227] + LC	NA	47627.4	47626.6	-17	
	15.8	Fab + 340.4 Da	O-glucosylgalactosyl?	47830.6	47831.2	13		

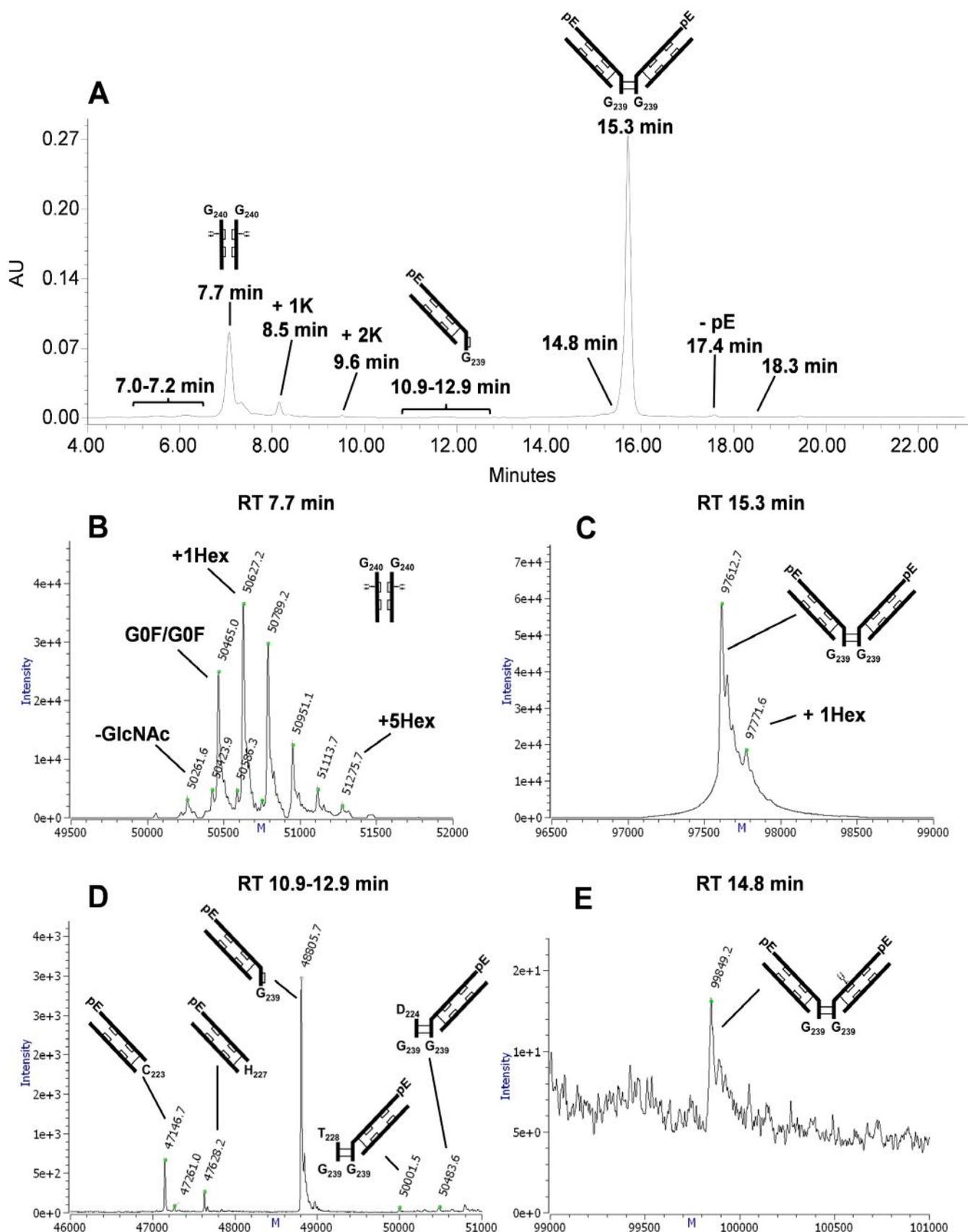


Fig. 2. Panel A represents the ion exchange chromatogram of the IdeS-digested NISTmAb RM 8671 with UV detection at 280 nm. Panels B and C represent deconvoluted mass spectra of dimerized noncovalent Fc/2 and F(ab')₂ subunits, respectively. Panels D and E represent deconvoluted mass spectra of clipped F(ab')₂ variants and F(ab')₂ isoform with a +341.1 Da mass shift, respectively.

attributed to an isoform comprising one unmodified N-terminal glutamine residue (having a free amino group). Meanwhile, the minor species that eluted at RT 18.3 min presented a mass difference of +341.1 Da versus the main subunit (see Table 1). This mass remains

unexplained though it could be speculated to be a glucosylgalactosyl hydroxylysine modification with a +340.3 Da mass addition. Lysine hydroxylation has been reported on an IgG1 in a XKG consensus sequence that is found at Lys₁₂₄ position on NISTmAb [57].

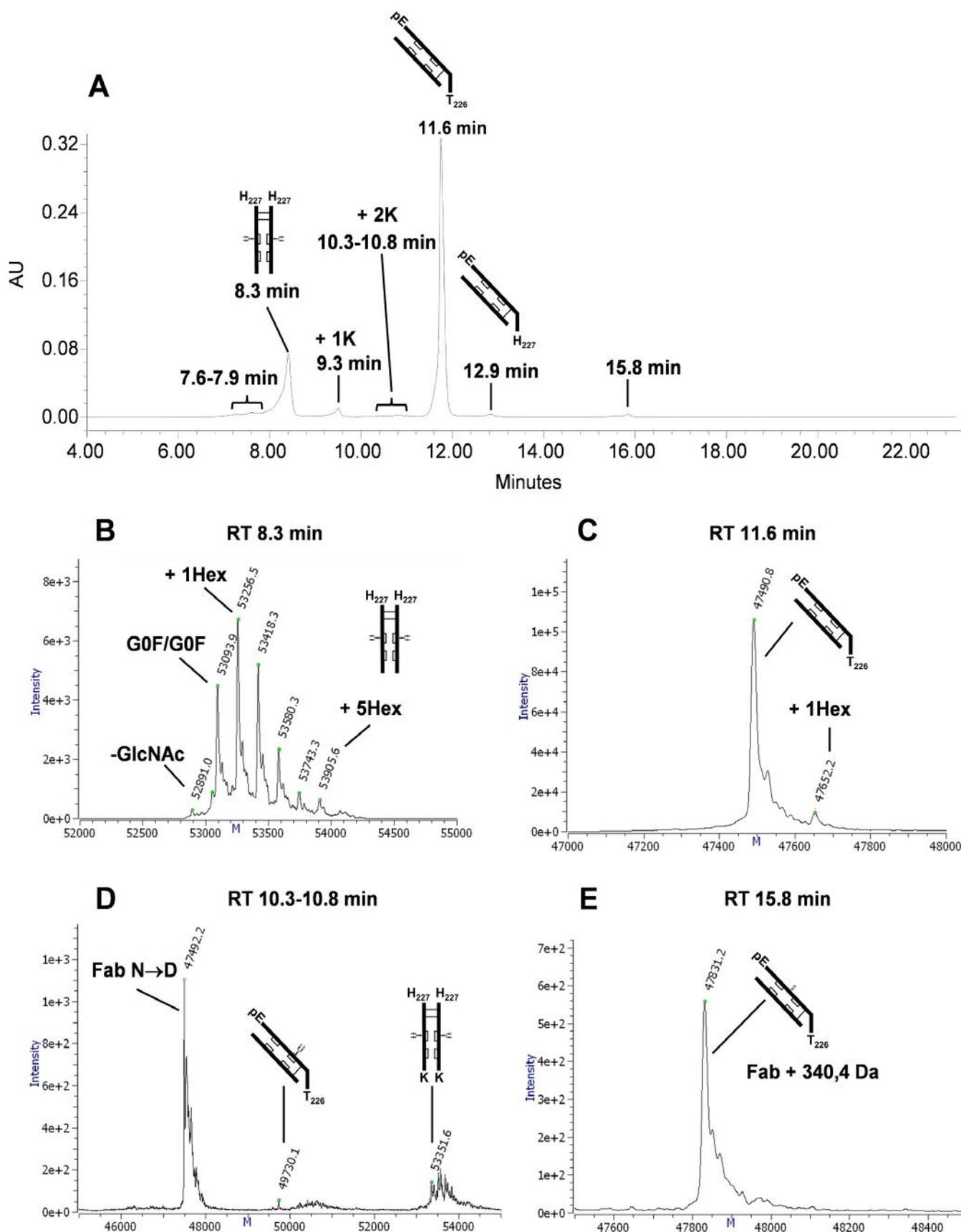


Fig. 3. Panel A represents the ion exchange chromatogram of the IgG1-digested NISTAb RM 8671 with UV detection at 280 nm. Panels B and C represent deconvoluted mass spectra of Fc and Fab subunits, respectively. Panels D and E represent deconvoluted mass spectra of deamidated and glycosylated Fab variants and Fab isoform with a + 340.3 Da mass shift, respectively.

3.3. IEX-MS analysis of IgDE-digested NISTmAb

The IgDE enzyme is also a bacterial cysteine protease that specifically cleaves immunoglobulin G molecules at their upper hinge to release Fc and Fab subunits [58]. This enzyme can be used alternatively or in combination with IdeS for analytical purposes [59]. Fig. 3 panel A highlights the chromatographic separation obtained for IgDE digested NISTmAb. The two major peaks eluting at 8.3 min and 11.6 min correspond to Fc and Fab subunits, respectively. As a general rule, it is of importance to note that Fab and Fc subunits generated by IgDE digestion can present lower selectivity separations because of their close molecular weights. This behavior may not be predictable, however, so it would be reasonable to treat future molecules and investigations in a case-by-case manner. Ultimately, this enzyme presents an interesting means to obtaining orthogonal information and achieving better mass accuracies on Fab-related variants. Panel B shows the deconvoluted mass spectrum of the Fc subunit, which was found to elute at RT 8.3 min and to show similar information as already reported in the IdeS experiment. In the acidic region between RT 7.6 and 7.9 min, deamidated forms of the Fc subunit were detected alongside iron adducted artifacts that may have compromised the detection of other minor acidic charge variants. After IgDE digestion, the Fc subunit comprises two N-terminal histidines that may explain its ability to chelate metal ions either from the column or the chromatographic system. This property could explain the peak asymmetry and broadness of the Fc subunit that was also observed with IEX columns from other manufacturers. Addition of EDTA in the sample preparation could be an improvement to overcome these artefacts. Fc subunit species that could be attributed to C-terminal lysine clipped variants were detected at 9.3 min and in the 10.3–10.8 min region along with some overlapping acidic Fab related variants. Panel C shows the deconvoluted mass spectrum of the Fab subunit with an experimental mass of 47490.8 Da that is in good agreement with the theoretical one of 47490.3 Da. The abundance of the glycosylated peak was estimated here at 8% with a relatively high confidence considering the improved resolution at this mass range (CV of 9% for calculations based on different charge states as well as the deconvoluted mass spectrum). Panel D shows three masses of interest as deconvoluted from RT 10.3–10.8 min. The first mass (47492.0 Da) would be in keeping with a deamidated Fab subunit. In addition to this species, a number of incompletely deconvoluted mass adducts were observed. It is possible for this ion signal to correspond to salt adducts or to other PTMs like oxidation. Conversely, in the middle of the spectrum, a mass of 49730.1 Da was perfectly deconvoluted and it is in good agreement with the predicted mass of the glycosylated Fab variant. Its abundance is estimated here at about 0.05%. Finally, the third mass detected amongst the acidic Fab variants corresponds to the basic Fc variant containing two terminal lysines. On the basic side of the Fab main peak (see panel A), His₂₂₇ clip was again observed (12.9 min) along with the unknown adduct that has already been described (RT 15.8 min). Measured here (see panel E), it is observed to have a mass that is +340.4 Da *versus* the experimental mass of the Fab subunit from the main peak. This mass difference would still be in accordance with the hypothesis of a glucosylgalactosyl hydroxylysine modification although this PTM was not detected after careful investigation by peptide mapping.

3.4. Application to other high pI mAbs

The presented methodology was next applied to the analysis of three other mAbs with pI values ranging from 8.7 to 9.4. These highly basic mAbs would theoretically be the most difficult to elute and were used here to test the capability of the method. Fig. 4 shows the chromatograms resulting from the analysis of these samples. As observed, each species eluted with a retention order predicted by their pI values

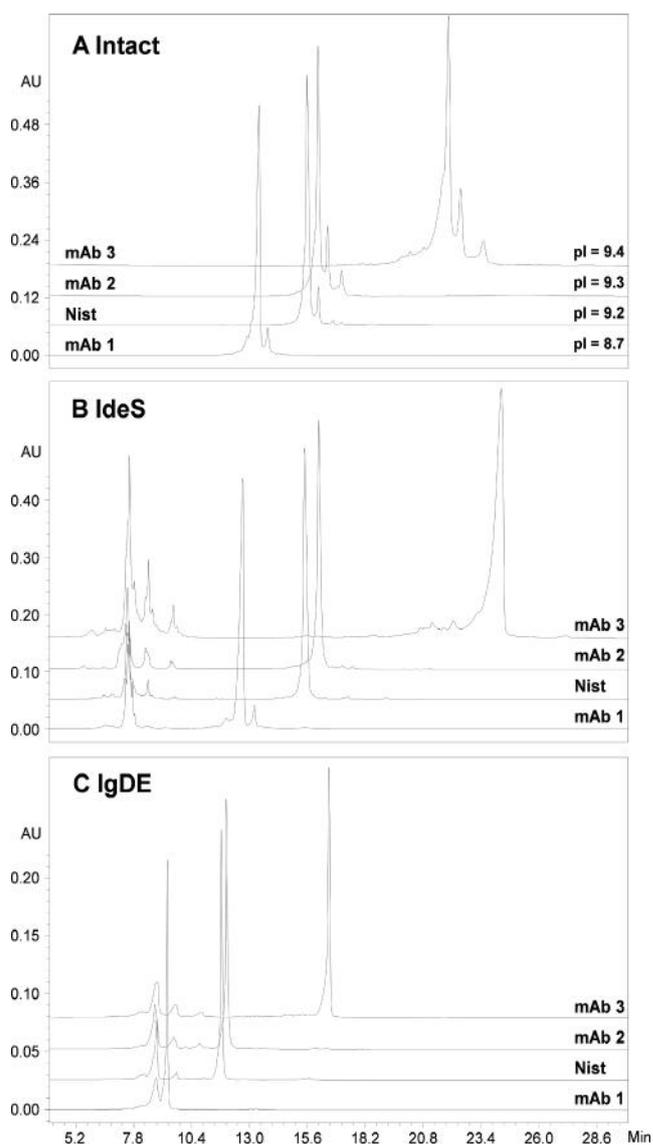


Fig. 4. Ion exchange chromatograms of three in-house therapeutic mAbs and the NISTmAb RM 8671 at the intact level (Panel A), after IdeS (Panel B) and IgDE proteolysis (Panel C) with detection at 280 nm.

especially for their intact forms and Fab/F(ab')₂ subunits. The constant region containing Fc or (Fc/2)₂ subunits eluted as expected at the same RT. In the case of mAb 3, the F(ab')₂ subunit was the most difficult to elute from the column, while in general IgDE-derived subunits were eluted more easily. Yan et al. reported the IEX analysis of mAbs with pI ranging from 6.3 to 9.2, the latter being represented by NISTmAb [43]. In their study, ammonium acetate was used at a concentration of 140 mM in buffer B in contrast to the 200 mM concentration used in this study with the Bioresolve SCX mAb column. The salt concentration in elution buffer can thus be slightly modulated according to the pI of the tested antibody. That is, a slight decrease of salt can be used for more acidic samples while more salt can be used for more basic samples. This fine tuning could be most advantageous in the analysis of subunits, given that IdeS tends to release basic F(ab')₂ species and that IgDE tends to release less strongly retained Fc and Fab subunits with a propensity for overlapping elution. In the end, these results show that a wide range of mAbs can be efficiently separated and analyzed with the presented technique using a simple ammonium acetate mobile phase system that does not cause problems with clogging, excess pressure or MS sensitivity.

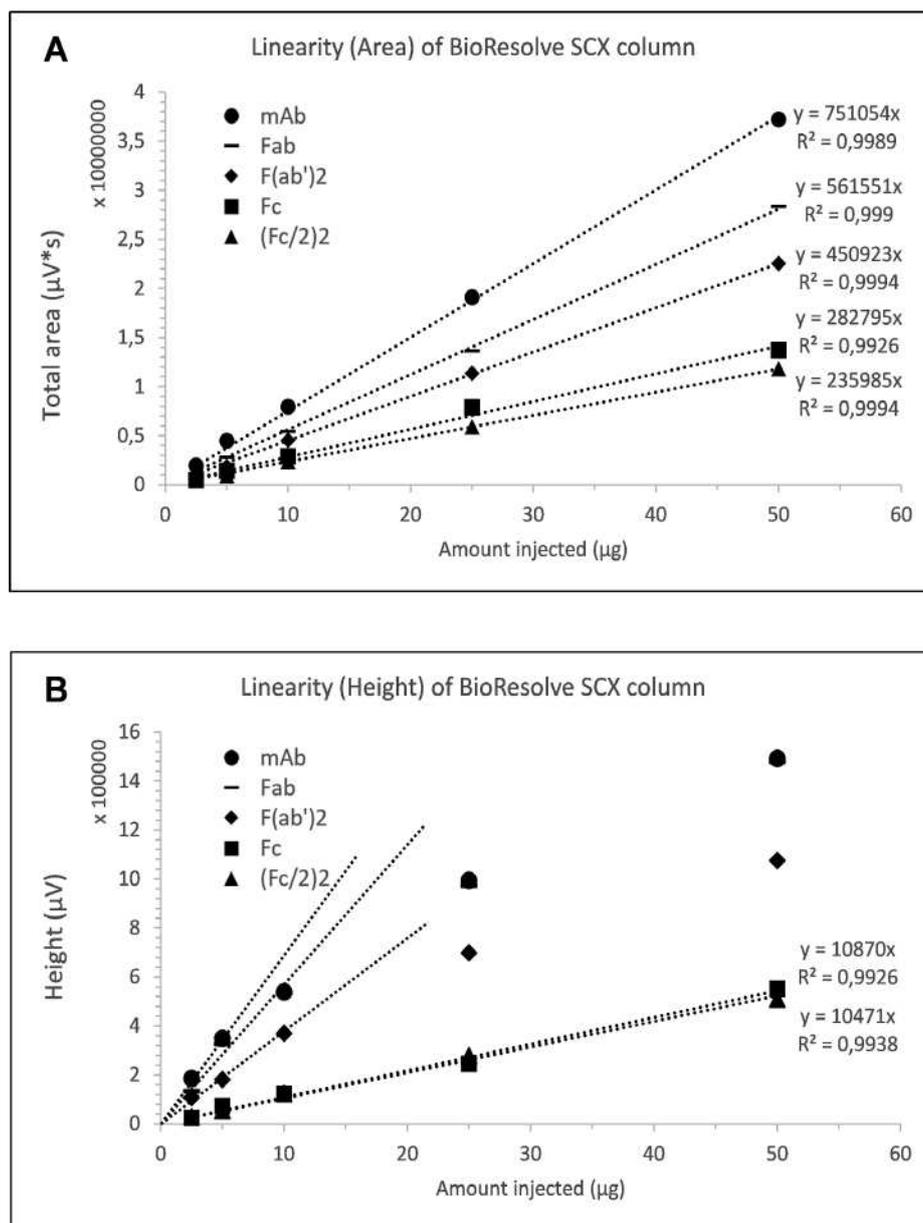


Fig. 5. Panels A and B represent the linear regression obtained with area and peak height, respectively, according to protein mass loads ranging from 2.5 to 50 μg for intact NISTmAb and related subunits.

3.5. Qualification and robustness

3.5.1. Linearity

Linearity was evaluated by the successive injection of increasing mass loads of NISTmAb ranging from 2.5 to 50 μg . UV signal, total peak area and peak height values were recorded for both intact and subunit digested samples and plotted *versus* protein load to test for linearity.

Fig. 5 panel A shows a graphical summary of linearity results for total UV peak area. Good linearity was obtained across the whole tested range at any one of the molecular levels (*i.e.* intact *versus* subunits). Fig. 5 panel B shows results of peak height monitoring, wherein it can be seen that a linear regression can be fitted to the signal for the Fc and (Fc/2)₂ subunits. In comparison, peak heights for intact, Fab and F(ab')₂ related species can be seen to exhibit sizable decreases beyond 10 μg . Together these results indicate that quantitative data can be obtained across the 2.5–50 μg range but loss of resolution can be expected at increased protein load, particularly with any Fab-containing species. The routine injection of 5 μg is thus advised to optimize chromatographic resolution while a 10 μg load can be employed when more MS signal is required.

Table 2

Result summary of the Bioresolve SCX mAb run-to-run repeatability for recovery, retention time (RT) and USP resolution (Rs).

Run-to-run Repeatability	Recovery		RT		Rs (K0/K1) USP	
	Mean (%)	CV (%)	Mean (min)	CV (%)	Mean	CV (%)
Intact	94.4	0.5	15.61	< 0.1	2.3	< 0.1
(Fc/2) ₂	106.9	0.4	7.52	< 0.1	4.8	0.7
F(ab') ₂	102.9	0.7	15.53	< 0.1		
Fc	95.1	2.5	8.83	< 0.1	2.4	4.8
Fab	98.5	0.3	11.74	< 0.1		

3.5.2. Run-to-run repeatability

Run-to-run repeatability was evaluated by the successive injection of one preparation of intact and IdeS/IgE digested NISTmAb. On average, considering 6 independent measurements, the starting pressure after column equilibration was measured to be 3513 PSI with a CV of 0.1% while the pressure measured during the reconditioning step at the end of the gradient showed adequate return toward initial pressure

Table 3

Result summary of the Bioresolve SCX mAb column-to-column repeatability for recovery, retention time (RT) and USP resolution (Rs).

Column to column Repeatability	Recovery		Rt		Rs (K0/K1) USP	
	Mean (%)	CV (%)	Mean (min)	CV (%)	Mean	CV (%)
Intact	87.0	7.6	15.88	1.4	2.3	3.6
(Fc/2) ₂	93.6	2.6	7.48	1.5	4.9	5.0
F(ab') ₂	90.1	1.3	15.72	1.9		
Fc	85.4	4.4	8.82	1.5	2.9	16.9
Fab	87.7	1.4	11.82	1.9		

with a value of 3511 PSI and similar CV. The pressure was also relatively stable throughout the experiment with pressure decreasing to a maximum of about –400 PSI across the salt gradient. The method is thus potentially compatible with a wide range of chromatographic systems. Table 2 summarizes means and CV values observed for recovery, retention time (RT) and USP resolution (Rs) from six consecutive injections. Estimated recoveries were > 90% at both intact and subunit levels with CVs < 1% except for the Fc subunit that presented the least reproducible results and lowest recoveries, probably due to its peak asymmetry that makes it more difficult to integrate. RT repeatability was excellent with CVs < 0.1% for all the species. The equilibration time of 17 min used here for pH gradient chromatography was set arbitrarily and further testing to decrease this time without impacting repeatability would be required to improve the method. Resolution between lysine variants was also very reproducible (CVs < 1%) except for the Fc subunit like was observed for recoveries. The best resolution between basic variants differing by C-terminal lysine heterogeneity was obtained on (Fc/2)₂ subunits. In sum, these results demonstrate the excellent repeatability of the proposed method.

3.5.3. Column-to-column repeatability

Column-to-column repeatability was evaluated by the injection of one preparation of intact and IdeS/Igde digested NISTmAb on six previously unused columns from 3 different production batches. Pressures measured after column equilibration and before first injections were relatively consistent from column-to-column (C1, 3513 PSI; C2 3556 PSI; C3, 3434 PSI; C4, 3254 PSI; C5, 3243 PSI; C6, 3407 PSI). As observed in Table 3, recoveries were in the range of 85.4–93.6% with acceptable CVs between 1.3 and 7.6%. The lowest recovery was still observed for the Fc subunit, possibly due to its broad and asymmetric peak shape. Slightly lower recoveries were systematically found in comparison with the run-to-run data set. One explanation for this could be that there are some absorptive losses occurring in the first couple of injections on new chromatographic devices until appropriate conditioning is reached [60]. RT column-to-column repeatability results were impressive with CVs < 2% for all the species which should confer a high robustness for any method developed with this technique. This result should be put into perspective with the very close range of starting pressures measured for the different columns that is a sign of reproducible and homogeneous packing of the column. Finally, Rs measured for the lysine variants was also very consistent with observed CVs being < 5% except again that for the Fc that showed a much lower repeatability (CV of 16.9%).

4. Conclusions

In conclusion, a new polymeric cation exchanger was evaluated for the charge variant analysis of mAbs in direct coupling with native MS. The 2 mm ID format was chosen for its simplicity of coupling with the standard ESI source of a mass spectrometer. The implemented technique proved itself to be robust and there was no need to give specialized care to experiments during the entirety of the study despite using

an ammonium acetate salt concentration of 200 mM in the elution buffer. A generic gradient was used to analyze intact and IdeS/Igde digested NISTmAb to deliver comprehensive characterization data via high quality MS spectra. Charge variants with very low abundances (< 0.1%) were readily detected which indicates that high sensitivity can be obtained with relatively commonplace instrumentation. Interestingly, low levels of oxidation and deamidation were detected and there were no apparent artefactual Asp-Pro cleavages strongly suggesting that the near native chromatographic conditions of IEX are more appropriate for investigating true levels of PTMs. Several highly basic mAbs could also be successfully eluted with this approach which leads us to believe that the method should be widely applicable to many different mAbs. It was also demonstrated that linear performance is achieved from 2.5 to 50 µg of protein load and that 5 µg makes for an optimal load when considering chromatographic resolution. Finally, protein recoveries, Rs and RT repeatability were excellent, save for somewhat inferior results for the Igde-generated Fc subunit. Together, these results provide a clear demonstration that tools and methodologies are now available to expedite the formerly difficult task of mAb charge variant characterization.

Acknowledgements

The authors kindly acknowledge from Protein Metrics for providing the software for native MS interpretation and for fruitful discussions.

Funding sources

This study was fully supported by LFB Biotechnologies.

Declaration of Competing Interest

Matthew Lauber and Qi Wang are employees of Waters Corporation, which has now realized the BioResolve SCX mAb column for commercial sale.

References

- [1] H. Liu, G. Gaza-Bulsecu, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426–2447.
- [2] P.E. Rao, D.J. Kroon, Orthoclone OKT3. Chemical mechanisms and functional effects of degradation of a therapeutic monoclonal antibody, *Pharm. Biotechnol.* 5 (1993) 135–158.
- [3] R.J. Harris, B. Kabakoff, F.D. Macchi, F.J. Shen, M. Kwong, J.D. Andya, S.J. Shire, N. Bjork, K. Totpal, A.B. Chen, Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752 (2001) 233–245.
- [4] J. Vlasak, R. Ionescu, Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9 (2008) 468–481.
- [5] L.C. Santora, I.S. Krull, K. Grant, Characterization of recombinant human monoclonal tissue necrosis factor- α antibody using cation-exchange HPLC and capillary isoelectric focusing, *Anal. Biochem.* 275 (1999) 98–108.
- [6] W. Zhang, M.J. Czupryn, Analysis of isoaspartate in a recombinant monoclonal antibody and its charge isoforms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1479–1490.
- [7] A. Beck, M.C. Bussat, N. Zorn, V. Robillard, C. Klinguer-Hamour, S. Chenu, L. Goetsch, N. Corvaia, A. Van Dorsselaer, J.F. Haeuw, Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NS0 cells, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 819 (2005) 203–218.
- [8] L. Huang, J. Lu, V.J. Wroblewski, J.M. Beals, R.M. Riggin, In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1432–1439.
- [9] H. Liu, G. Gaza-Bulsecu, J. Sun, Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 837 (2006) 35–43.
- [10] Y. Lyubarskaya, D. Houde, J. Woodard, D. Murphy, R. Mhatre, Analysis of recombinant monoclonal antibody isoforms by electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for streamlining characterization of recombinant monoclonal antibody charge heterogeneity, *Anal. Biochem.* 348 (2006) 24–39.
- [11] L.C. Santora, K. Stanley, I.S. Krull, K. Grant, Characterization of maleuric acid derivatives on transgenic human monoclonal antibody due to post-secretional modifications in goat milk, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 843–856.
- [12] J.Y. Zheng, L.J. Janis, Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298, *Int. J.*

- Pharm. 308 (2006) 46–51.
- [13] G.C. Chu, D. Chelius, G. Xiao, H.K. Khor, S. Coulibaly, P.V. Bondarenko, Accumulation of succinimide in a recombinant monoclonal antibody in mildly acidic buffers under elevated temperatures, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1145–1156.
- [14] C. Chumsae, G. Gaza-Bulsec, J. Sun, H. Liu, Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 850 (2007) 285–294.
- [15] K.A. Johnson, K. Paisley-Flango, B.S. Tangarone, T.J. Porter, J.C. Rouse, Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain, *Anal. Biochem.* 360 (2007) 75–83.
- [16] D.D. Banks, H.S. Gadgil, G.D. Pipes, P.V. Bondarenko, V. Hobbs, J.L. Scavezze, J. Kim, X.R. Jiang, V. Mukku, T.M. Dillon, Removal of cysteinylolation from an unpaired sulfhydryl in the variable region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody improves homogeneity, stability, and biological activity, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 775–790.
- [17] A. Rozhkova, Quantitative analysis of monoclonal antibodies by cation-exchange chromatofocusing, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5989–5994.
- [18] S. Sinha, L. Zhang, S. Duan, T.D. Williams, J. Vlasak, R. Ionescu, E.M. Topp, Effect of protein structure on deamidation rate in the Fc fragment of an IgG1 monoclonal antibody, *Protein Sci.* 18 (2009) 1573–1584.
- [19] B. Yan, S. Steen, D. Hambly, J. Valliere-Douglass, T. Vanden Bos, S. Smallwood, Z. Yates, T. Arroll, Y. Han, H. Gadgil, R.F. Latypov, A. Wallace, A. Lim, G.R. Kleemann, W. Wang, A. Balland, Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 3509–3521.
- [20] L.A. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson, Z.W. Kwong, J. Yang, X. Wang, Z. Yao, A. Sreedhara, T. Cano, D. Tesar, I. Nijem, D.E. Allison, P.Y. Wong, Y.H. Kao, C. Quan, A. Joshi, R.J. Harris, P. Motchnik, Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats, *MABs* 2 (2010) 613–624.
- [21] J. Kim, L. Jones, L. Taylor, G. Kannan, F. Jackson, H. Lau, R.F. Latypov, B. Bailey, Characterization of a unique IgG1 mAb CEX profile by limited Lys-C proteolysis/CEX separation coupled with mass spectrometry and structural analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 1973–1981.
- [22] K. Diepold, K. Bomans, M. Wiedmann, B. Zimmermann, A. Petzold, T. Schlothauer, R. Mueller, B. Moritz, J.O. Stracke, M. Molhoj, D. Reusch, P. Bulau, Simultaneous assessment of Asp isomerization and Asn deamidation in recombinant antibodies by LC-MS following incubation at elevated temperatures, *PLoS ONE* 7 (2012) e30295.
- [23] Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, K. May, H. Liu, Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies, *MABs* 4 (2012) 578–585.
- [24] S. Gandhi, D. Ren, G. Xiao, P. Bondarenko, C. Sloey, M.S. Ricci, S. Krishnan, Elucidation of degradants in acidic peak of cation exchange chromatography in an IgG1 monoclonal antibody formed on long-term storage in a liquid formulation, *Pharm. Res.* 29 (2012) 209–224.
- [25] X. Kang, J.P. Kutzko, M.L. Hayes, D.D. Frey, Monoclonal antibody heterogeneity analysis and deamidation monitoring with high-performance cation-exchange chromatofocusing using simple, two component buffer systems, *J. Chromatogr. A* (2013).
- [26] D. Ouellette, C. Chumsae, A. Clabbers, C. Radziejewski, I. Correia, Comparison of the in vitro and in vivo stability of a succinimide intermediate observed on a therapeutic IgG1 molecule, *MABs* 5 (2013) 432–444.
- [27] J. Guo, G. Carta, Unfolding and aggregation of a glycosylated monoclonal antibody on a cation exchange column. Part II. Protein structure effects by hydrogen deuterium exchange mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 129–137.
- [28] J. Guo, S. Zhang, G. Carta, Unfolding and aggregation of a glycosylated monoclonal antibody on a cation exchange column. Part I. Chromatographic elution and batch adsorption behavior, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 117–128.
- [29] Y.T. Zhang, J. Hu, A.L. Pace, R. Wong, Y.J. Wang, Y.H. Kao, Characterization of asparagine 330 deamidation in an Fc-fragment of IgG1 using cation exchange chromatography and peptide mapping, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 965 (2014) 65–71.
- [30] S. Fekete, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillaume, Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 43–55.
- [31] A. Neill, C. Nowak, R. Patel, G. Ponniah, N. Gonzalez, D. Miano, H. Liu, Characterization of recombinant monoclonal antibody charge variants using OFFGEL fractionation, weak anion exchange chromatography, and mass spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6204–6211.
- [32] G. Ponniah, A. Kita, C. Nowak, A. Neill, Y. Kori, S. Rajendran, H. Liu, Characterization of the acidic species of a monoclonal antibody using weak cation exchange chromatography and LC-MS, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9084–9092.
- [33] B. Hintersteiner, N. Lingg, P. Zhang, S. Woen, K.M. Hoi, S. Stranner, S. Wiederkum, O. Mutschlechner, M. Schuster, H. Loibner, A. Jungbauer, Charge heterogeneity: basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors, *MABs* 8 (2016) 1548–1560.
- [34] F. Griaud, B. Denefeld, M. Lang, H. Hensinger, P. Haberl, M. Berg, Unbiased in-depth characterization of CEX fractions from a stressed monoclonal antibody by mass spectrometry, *MABs* 9 (2017) 820–830.
- [35] G. Ponniah, C. Nowak, A. Neill, H. Liu, Characterization of charge variants of a monoclonal antibody using weak anion exchange chromatography at subunit levels, *Anal. Biochem.* 520 (2017) 49–57.
- [36] Y. Xu, D. Wang, B. Mason, T. Rossomando, N. Li, D. Liu, J.K. Cheung, W. Xu, S. Raghava, A. Katiyar, C. Nowak, T. Xiang, D.D. Dong, J. Sun, A. Beck, H. Liu, Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies, *MABs* 11 (2019) 239–264.
- [37] H. Qiu, R. Wei, J. Jaworski, E. Boudanova, H. Hughes, S. VanPatten, A. Lund, J. Day, Y. Zhou, T. McSherry, C.Q. Pan, R. Sendak, Engineering an anti-CD52 antibody for enhanced deamidation stability, *MABs* 11 (2019) 1266–1275.
- [38] D.R. Goulet, W.M. Atkins, Considerations for the design of antibody-based therapeutics, *J. Pharm. Sci.* (2019).
- [39] D.R. Stoll, D.C. Harnes, J. Danforth, E. Wagner, D. Guillaume, S. Fekete, A. Beck, Direct identification of rituximab main isoforms and subunit analysis by online selective comprehensive two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 8307–8315.
- [40] D. Stoll, J. Danforth, K. Zhang, A. Beck, Characterization of therapeutic antibodies and related products by two-dimensional liquid chromatography coupled with UV absorbance and mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1032 (2016) 51–60.
- [41] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 degrees C, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1048 (2017) 130–139.
- [42] F. Fussl, K. Cook, K. Scheffler, A. Farrell, S. Mittermayr, J. Bones, Charge variant analysis of monoclonal antibodies using direct coupled pH gradient cation exchange chromatography to high-resolution native mass spectrometry, *Anal. Chem.* 90 (2018) 4669–4676.
- [43] Y. Yan, A.P. Liu, S. Wang, T.J. Daly, N. Li, Ultrasensitive characterization of charge heterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies using strong cation exchange chromatography coupled to native mass spectrometry, *Anal. Chem.* 90 (2018) 13013–13020.
- [44] F. Fussl, A. Trappe, K. Cook, K. Scheffler, O. Fitzgerald, J. Bones, Comprehensive characterisation of the heterogeneity of adalimumab via charge variant analysis hyphenated on-line to native high resolution Orbitrap mass spectrometry, *MABs* 11 (2019) 116–128.
- [45] A.O. Bailey, G. Han, W. Phung, P. Gazis, J. Sutton, J.L. Josephs, W. Sandoval, Charge variant native mass spectrometry benefits mass precision and dynamic range of monoclonal antibody intact mass analysis, *MABs* 10 (2018) 1214–1225.
- [46] M. Bern, T. Caval, Y.J. Kil, W. Tang, C. Becker, E. Carlson, D. Kletter, K.I. Sen, N. Galy, D. Hagemans, V. Franc, A.J.R. Heck, Parsimonious charge deconvolution for native mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 17 (2018) 1216–1226.
- [47] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784–3788.
- [48] D.M. Creasy, J.S. Cottrell, Unimod: Protein modifications for mass spectrometry, *Proteomics* 4 (2004) 1534–1536.
- [49] J.E. Schiel, A. Turner, T. Mouchahoir, K. Yandroski, S. Telikepalli, J. King, P. DeRose, D. Ripple, K. Phinney, The NISTmAb reference material 8671 value assignment, homogeneity, and stability, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2127–2139.
- [50] B. Ganem, Y. Li, J.D. Henion, Observation of noncovalent enzyme-substrate and enzyme-product complexes by ion-spray mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 7818–7819.
- [51] K. Muneeruddin, M. Nazzaro, I.A. Kaltashov, Characterization of intact protein conjugates and biopharmaceuticals using ion-exchange chromatography with on-line detection by native electrospray ionization mass spectrometry and top-down tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 10138–10145.
- [52] E. Farsang, A. Murisier, K. Horvath, A. Beck, R. Kormany, D. Guillaume, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 1: Alternative mobile phases and fine tuning of the separation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 168 (2019) 138–147.
- [53] J.E. Schiel, D.L. Davis, O.V. Borisov, State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study, ACS Symposium Series 1201, Washington DC, (2015).
- [54] A. Murisier, E. Farsang, K. Horvath, M. Lauber, A. Beck, D. Guillaume, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 2: Evaluation of recent stationary phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172 (2019) 320–328.
- [55] G. Chevreux, N. Tilly, N. Bihoreau, Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 212–214.
- [56] A.F. Labrijn, T. Rispens, J. Meesters, R.J. Rose, T.H. den Bleker, S. Loverix, E.T. van den Bremer, J. Neijssen, T. Vink, I. Lasters, R.C. Aalberse, A.J. Heck, J.G. van de Winkel, J. Schuurman, P.W. Parren, Species-specific determinants in the IgG CH3 domain enable Fab-arm exchange by affecting the noncovalent CH3-CH3 interaction strength, *J. Immunol.* 187 (2011) 3238–3246.
- [57] Q. Xie, B. Moore, R.L. Beardsley, Discovery and characterization of hydroxylysine in recombinant monoclonal antibodies, *MABs* 8 (2016) 371–378.
- [58] C. Spoerry, J. Seele, P. Valentin-Weigand, C.G. Baums, U. von Pawel-Rammingen, Identification and characterization of IgDE, a novel IgG-degrading protease of streptococcus suis with unique specificity for porcine IgG, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 7915–7925.
- [59] V. Faid, Y. Leblanc, N. Bihoreau, G. Chevreux, Middle-up analysis of monoclonal antibodies after combined IgDE and IdeS hinge proteolysis: Investigation of free sulfhydryls, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149 (2017) 541–546.
- [60] HPLC in the Pharmaceutical Industry, Taylor & Francis Inc., 1991.

4. Caractérisation de l'albumine par chromatographie d'échange d'ions couplée à la spectrométrie de masse

I. Résumé de l'article

L'albumine est la protéine la plus abondante du plasma et représente plus de 50% des protéines circulant dans le sang. Cette protéine est constituée de trois domaines homologues (I,II et III) et de 35 résidus cystéine dont 34 sont impliqués dans des ponts disulfures stabilisant sa structure. Une des spécificités de l'albumine est la cystéine libre en position 34 qui constitue la principale réserve de thiols libres du plasma, et qui est particulièrement sensible à des modifications chimiques telles que l'oxydation, la nitrosylation ou la formation de ponts disulfures avec des thiols libres circulants. Si la principale propriété physiologique de l'albumine est le maintien de la pression oncotique du plasma, elle présente également une large gamme de fonctions non-oncotiques. Ainsi, l'albumine a la capacité de fixer réversiblement de nombreux composés endogènes ou exogènes (hormones, lipides, médicaments...), pour améliorer leur solubilité et participer à leur distribution dans les tissus et organes. Mais sa principale propriété non-oncotique est le pouvoir anti-oxydant conférée par la fonction sulfhydryle du résidu Cys₃₄, permettant la captation de radicaux libres, et par la partie N-terminale de la protéine qui permet la chélation d'ions métalliques. Tout comme les IgG, l'albumine a une demi-vie prolongée dans le plasma (16 à 20 jours) grâce à son interaction avec le récepteur néonatal Fc qui la protège du catabolisme endothélial. Cette demi-vie prolongée accroît néanmoins la sensibilité de la protéine à des modifications telles que l'oxydation, la glycation ou les clivages d'acides aminés N/C-Terminaux. La caractérisation de ces modifications présente alors un intérêt pour le diagnostic de pathologies ou pour évaluer l'intégrité structurale d'albumines thérapeutiques. La méthode de choix pour l'étude des modifications de l'albumine est la chromatographie d'échange d'ions (IEX), notamment pour la caractérisation d'oxydation(s). Des travaux récents ont démontré la compatibilité de l'IEX avec la spectrométrie de masse (MS) par l'utilisation de sels volatiles dans la phase mobile chromatographique. Le but de cette étude est le développement d'une méthode IEX avec une résolution chromatographique élevée couplée directement à la MS native pour une caractérisation approfondie des isoformes d'une albumine thérapeutique.

Caractérisation par IEX-MS des protéoformes majeures de l'albumine

Cette méthode IEX-MS permet de séparer jusqu'à 9 isoformes de l'albumine qui peuvent être directement identifiées grâce au couplage à la spectrométrie de masse. Les deux principales isoformes observées sur le chromatogramme correspondent à la forme native de l'albumine ($M_{\text{Théo}}=66438$ Da), présentant un groupement sulfhydryle libre sur le résidu Cys₃₄, et à la forme cystéinylée (+119 Da) dont le résidu Cys₃₄ est lié à une cystéine libre par un pont disulfure. Les albumines natives et cystéinylées représentent respectivement 51% et 34% de l'aire totale du chromatogramme, en cohérence avec les proportions connues de ces deux formes dans le plasma. Les autres isoformes du chromatogramme sont présentes en plus faible quantité (<10%), parmi lesquelles des formes glyquées d'albumines natives et cystéinylées présentant des spectres MS avec une variation de masse de +162 Da. Deux formes mineures de clivages N/C-terminaux ont été détectées et correspondent au clivage de la Leucine en position C-terminale, dû à l'activité de la carboxypeptidase A plasmatique et au clivage des deux acides aminés N-terminaux (Asp₁-Ala₂), correspondant à une dégradation chimique de l'albumine en solution. Enfin, les trois isoformes les plus acides présentent des masses expérimentales compatibles avec des modifications de type oxydation et déamidation, mais la faible intensité de signal MS de ces isoformes peu abondantes (<5%) a nécessité des investigations plus approfondies pour les identifier.

Identification des protéoformes mineures de l'albumine : oxydation et déamidation

Une de ces isoformes présente une masse légèrement supérieure à celle de la forme native et est éluée à un temps de rétention plus acide suggérant une forme déamidée. La déamidation est une réaction non-enzymatique modifiant une asparagine en acide aspartique avec pour conséquence une variation de masse de +1 Da. Il s'agit d'une modification chimique intervenant lors de la conservation prolongée des protéines en solution. Pour permettre l'identification de cette modification sur le chromatogramme, un échantillon d'albumine conservé 5 ans à +5°C a été analysé par IEX-MS. Les résultats obtenus montrent une très forte augmentation de l'isoforme avec clivage des acides aminés N-terminaux, mais également de la forme correspondant potentiellement à une déamidation. Une meilleure qualité de signal du spectre de cette isoforme a permis de confirmer la variation de masse de +1 Da correspondant à cette modification. La seconde de ces isoformes présente une masse expérimentale avec une variation de +177 Da par rapport à l'albumine native et n'a jamais été identifiée dans la

littérature. Cependant, le second thiol libre de bas poids moléculaire le plus abondant en circulation dans le plasma est un produit de dégradation du glutathion : la cystéinyglycine (Cys-Gly) dont la masse moléculaire est 178,2 Da. La formation d'un pont disulfure entre ce composé et le résidu Cys₃₄ de l'albumine native conduit à une variation de masse de +176.2 Da. Pour confirmer cette hypothèse, un échantillon d'albumine a été incubé avec de la cystéinyglycine libre avant analyse par IEX-MS. Les résultats ont montré une très forte augmentation de l'isoforme présentant une variation de +176.2 Da confirmant la formation d'un pont disulfure entre la Cys-Gly et le résidu Cys₃₄ de l'albumine native. Le dernier pic du chromatogramme est observé en très faible abondance (1%) et présente un spectre de masse avec une faible intensité de signal. Une variation de masse de +30,8 Da est observée sur ce spectre et le comportement chromatographique de cette protéoforme (élution tardive) semblent indiquer que cette modification correspond à l'oxydation du groupement sulfhydryle de Cys₃₄ en acide sulfinique dont la variation de masse théorique est +32 Da. Pour une identification sans ambiguïté de cette isoforme, un échantillon d'albumine a été incubé avec du peroxyde d'hydrogène. Les résultats de l'analyse IEX-MS de l'échantillon oxydé montre une très forte augmentation de la dernière isoforme élue dont le spectre présente une masse de 66469 Da correspondant à l'albumine avec un résidu d'acide cystéine-sulfinique en position 34 ($M_{\text{Théo}}=66470$ Da).

Analyse par IEX-MS de l'albumine en présence de Cu(II)

Les quatre acides aminés N-terminaux de l'albumine ont la capacité de fixer les ions Cu(II) avec une haute affinité, conférant à la protéine une partie de ses propriétés antioxydantes. La capacité de la méthode IEX-MS à détecter les isoformes ayant fixé des ions Cu(II) a été évaluée en analysant un échantillon d'albumine incubé avec de l'acétate de cuivre. Le chromatogramme obtenu montre un décalage complet du profil vers des temps de rétention plus acides, ainsi que des spectres présentant des additions de masse de +62 Da correspondant à la fixation d'un ion Cu(II). Seuls les deux pics identifiés comme des isoformes avec une partie N-terminale tronquée présentent des temps de rétention et des spectres de masse inchangés en présence de Cu(II), confirmant l'importance des deux acides aminés N-terminaux de l'albumine pour la fixation du cuivre. L'analyse du complexe albumine-Cu(II) est possible par IEX-MS en raison de la haute affinité du cuivre pour cette protéine, mais des investigations par IEX-MS avec d'autres

ligands de faible affinité pour l'albumine comme le naproxène, la warfarine ou l'ion Zn(II) n'ont pas permis d'observer de complexes.

Identification des modifications post-traductionnelles de l'albumine par LC-MS/MS

Une analyse *bottom-up* en conditions réductrice et non-réductrice des échantillons d'albumine a été réalisée pour localiser les modifications post-traductionnelles détectée par IEX-MS. En condition non-réductrices, deux modifications principales ont été observées sur Cys₃₄ correspondant à l'oxydation en acide sulfinique et à la cystéinylation du groupement sulfhydryle. En conditions réductrices, deux sites de glycation ont été observés sur Lys₂₃₃ et Lys₅₂₅. Ces sites de glycation ont déjà été rapportés dans la littérature et sont la conséquence de la réaction en l'albumine et le glucose en circulation dans le sang. Deux sites de déamidation ont été détectés sur les résidus Asn₉₉ et Asn₁₃₀ pour l'échantillon stocké 5 ans à +5°C.

Evaluation des performances chromatographiques de la méthode IEX

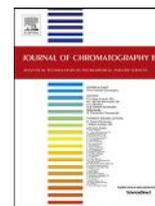
L'évaluation des performances chromatographiques de la méthode a été réalisée en termes de linéarité d'aires et de hauteurs de pics, de résolution et de temps de rétention. Cette évaluation préliminaire montre des performances analytiques compatibles avec l'analyse en routine d'albumines purifiées.

L'albumine constitue la principale protéine du plasma et est sensible à de nombreuses modifications dont la caractérisation est primordiale pour le suivi d'albumines thérapeutiques lors des étapes de purification et de stockage ou pour l'étude de biomarqueurs liés à certaines pathologies. Dans cette étude, une méthode IEX couplée à la spectrométrie de masse a été développée pour permettre la séparation et l'identification de plus de neuf isoformes de cette protéine. Ainsi, les caractéristiques structurales qui constituent les propriétés antioxydantes de la protéine ont pu être évaluées, c'est-à-dire le statut d'oxydation de la fonction sulfhydryle du résidu Cys₃₄ et l'intégrité de la partie N-terminale permettant la chélation d'ions métalliques. De même, les principales modifications subies par l'albumine dans le plasma ou après purification telles que la glycation, la déamidation ou les clivages d'acides aminés terminaux peuvent être caractérisées avec cette méthode. Les performances chromatographiques de la méthode ont été évaluées et sont compatibles avec des analyses de routine d'albumines thérapeutiques.

II. Publication

Cette étude a été publiée dans *Journal of Chromatography B* :

Y. Leblanc, N. Bihoreau, G. Chevreux, Characterization of Human Serum Albumin isoforms by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 1095 (2018) 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.014>.



Characterization of Human Serum Albumin isoforms by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry

Y. Leblanc, N. Bihoreau, G. Chevreux*

LFB, 3 avenue des Tropiques, 91958 Courtabœuf (Les Ulis), France



ARTICLE INFO

Keywords:

Mass spectrometry
Ion exchange chromatography
Oxidation
Charge variants
Human Serum Albumin

ABSTRACT

Human Serum Albumin is the most abundant protein of the plasma and displays a wide range of non-oncotic properties such as antioxidant activity, distribution in tissues and organs of binding molecules and clearance of toxic compounds. Albumin is susceptible to numerous post-translational modifications and particularly related to its free thiol group at Cys₃₄ which is the main circulating scavenger of reactive oxygen species. The characterization of these modifications is of high interest for the diagnosis and treatment of patients with liver diseases and for the structural integrity assessment of albumin as a therapeutic protein.

In this study, an ion exchange chromatographic method coupled on-line to native mass spectrometry was developed in order to bridge an effective charge variants separation method with a powerful identification technique for a detailed characterization of albumin isoforms. The chromatographic performance of the method allows the separation of 9 different isoforms that were on-line characterized by MS as oxidized, glycated, deamidated and N/C-terminal truncated forms. The method is also able to detect Cu(II) ions binding to the N-terminal site of the protein which is an important antioxidant feature of albumin. Finally, the method showed preliminary good performance parameters in term of linearity, precision and sensitivity for characterization of purified albumin as well as albumin from raw plasma for clinical and pharmaceutical purposes.

1. Introduction

Human Serum Albumin (HSA) is the most abundant protein of the plasma representing > 50% of the circulating proteins in humans [1]. This non-glycosylated protein is synthesized in the liver and has a prolonged half-life of about 16–20 days in healthy adults [2]. Composed of a linear polypeptide of 585 amino acids [3], the native form of HSA presents a heart shaped conformation in solution and is composed of three homologous domains (I, II and III) [4]. Beside the 34 cysteine residues involved in disulphide bonds and contributing to the stability of the protein, HSA displays the structural particularity of a free cysteine residue at position 34 that represents the largest plasma reservoir of free thiols (80%). This residue is susceptible to several modifications such as oxidation, nitrosylation or formation of disulphide bonds with circulating low-molecular-weight free thiols [5].

Physiologically, HSA contributes to about 70–80% of the plasma oncotic pressure [6] but displays also a wide range of non-oncotic functions [7]. HSA is able to reversibly bind several endogenous or exogenous compounds like for instance fatty acids, hormones, metal ions or drugs, increasing their solubility and their distribution in tissues

and organs [8,9]. HSA can also bind uremic toxins or breakdown products of haem like the bilirubin to promote their clearance [10]. However, the main non-oncotic property of HSA is its antioxidant activity conferred by the free sulfhydryl group of Cys₃₄ which is the main circulating scavenger of reactive oxygen species (ROS) and by the metal chelating properties of the N-terminal site of the protein. The four N-terminal amino acids of HSA Asp-Ala-His-Lys prevent the formation of hydroxyl radicals by their ability to chelate redox-active transition metal ions such as Cu(II) and Fe(II) [11].

The prolonged half-life of HSA is mainly due to its interaction with the neonatal Fc receptor (FcRn), which protects HSA from degradation via a pH dependent recycling mechanism [12]. However, this prolonged half-life in plasma promotes several degradations like glycation and N-/C-terminal truncations [13–16]. Oxidation is also an important issue because of the high reactivity of Cys₃₄ free sulfhydryl that leads to the formation of numerous reversible or irreversible oxidized forms. The characterization of all of these isoforms is of great interest for diagnosis and treatment of patients with diseases of the liver like for instance cirrhosis [17–19] or for the characterization of the HSA structural integrity as a therapeutic protein [20].

Abbreviations: HSA, Human Serum Albumin; RT, retention time; MS, mass spectrometry; IEX, ion exchange chromatography; FcRn, neonatal Fc receptor

* Corresponding author.

E-mail address: chevreuxg@lfb.fr (G. Chevreux).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.014>

Received 2 June 2018; Received in revised form 11 July 2018; Accepted 13 July 2018

Available online 18 July 2018

1570-0232/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

To date, the main chromatographic methods employed for the structural characterization of HSA are ion exchange chromatography (IEX) [5, 21, 22] and reverse phase chromatography (RP/LC) [23–25] with balanced pros and cons. IEX is the method of choice for the characterization of protein charge variants and especially for the analysis of HSA isoforms. Several studies reported the ability of IEX to separate and quantify the mercaptoalbumin (HMA), corresponding to the reduced form of HSA with a free thiol group at Cys₃₄, from the non-mercaptoalbumin (HNA) corresponding to the reversible (HNA1) and irreversible oxidized forms (HNA2) of HSA, allowing the evaluation of the oxidative stress for clinical purposes [22, 26–28]. In 2014, Turell et al. described a LC method based on an external pH gradient allowing the separation of the different HSA oxidized forms but also the N-terminal truncated isoforms [29]. However, despite a high power of separation, IEX necessitates MS incompatible salts making direct MS identification impossible. Conversely, RP/LC based methodologies are not able to separate HSA isoforms due to the small differences of hydrophobicity resulting from PTMs but present the advantage to use MS compatible mobile phases for a direct identification of isoforms. Finally, LC-MS/MS analyses are used to localize modification sites on the protein via the analysis of enzymatic digests (bottom-up approach). Recently, the development of non-denaturing chromatographic methods coupled to native MS emerged for the analysis of proteins such as monoclonal antibodies, lysozyme or interferon- β [30, 31]. By using volatile, MS compatible salts, several chromatographic methods like size exclusion chromatography (SEC) or IEX can be coupled on-line to MS for a direct detection and characterization of protein isoforms. The purpose of the present study is to develop an IEX method with a high chromatographic resolution coupled on-line to native MS for simultaneous characterization and quantification of HSA isoforms. This method should be useful to analyse thoroughly HSA variants for clinical diagnosis purposes or for the characterization and control of product in the case of a therapeutic use of HSA.

2. Material and methods

2.1. Material

HSA samples were internally produced from pooled normal human plasma using the *Cohn* method [32] that separates plasma proteins by sequential precipitations using increasing concentrations of cold ethanol and decreasing pH values. HSA was recovered in Fraction IV and further processed for higher purity and viral security by filtration and pasteurization. A standard and an aged sample stored at 5 °C during 6 months and 5 years respectively at pH 7.1 were used for this study. MS grade bovine trypsin was obtained from Roche (Mannheim, Germany). Acetonitrile (MeCN) was HPLC reagent grade and purchased from JT Baker (Philipsburg, NJ, USA). Ammonium acetate for mass spectrometry, Dithiothreitol (DTT), Copper(II) acetate, cysteinylglycine, hydrogen peroxide and Iodoacetamide (IAA) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Trypsin Gold mass spectrometry grade was purchased from Promega (Madison, USA), all the aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (18.2 M Ω -cm resistivity at 25 °C, total organic carbon (TOC) < 5 ppb).

2.2. Oxidation of HSA with H₂O₂

Chemical oxidation of HSA was carried out by adding 11.3 μ L of a 3% solution of H₂O₂ to 10 mL of a solution of standard albumin 20%. The preparation was incubated at 40 °C for 2 h. The reaction was stopped by freezing the solution at –80 °C.

2.3. Reaction of HSA with cysteinylglycine

The chemical reaction of cysteinylglycine with HSA was carried out by adding 5 μ L of a solution of cysteinylglycine 100 mM in 495 μ L of a

standard solution of HSA 5%. The preparation was incubated at 50 °C for 30 min. The reaction was stopped by freezing the solution at –80 °C.

2.4. Ion exchange chromatography (IEX)

Separation of HSA charge variants was performed with an Acquity system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to an UV detector and an electrospray mass spectrometer (Synapt G2S, Waters, Milford, MA, USA). The MS compatible mobile phases used for ion exchange chromatography were 50 mM ammonium acetate at pH 7.4 (Buffer A) and 500 mM ammonium acetate pH 7.4 (Buffer B). Around 10 μ g of sample were injected on a Proteomix SAX-NP5 2.1 mm \times 150 mm column (Sepax Technologies, Newark, MA, USA) equilibrated at 30 °C and operated at a flow rate of 0.2 mL/min. After an isocratic elution at 5% of B for 5 min, a linear gradient was applied from 5% to 33% of B in 55 min. The column was then washed for 5 min at 85% of B and further equilibrated during 15 min at 5% of B. The mass spectrometer was operated in the positive resolution mode and data were recorded from m/z 500 to 6500. Calibration was achieved on the acquisition range using cluster ions generated by a NaI solution diluted at 2 g/L in a mixture of water/isopropanol 50/50 (V/V) according to manufacturer's procedure. Source parameters were optimized to get the best transmission and desolvation of ions. Source and desolvation temperature were set at 80 °C and 200 °C respectively. The cone voltage was at 130 V and the source offset at 65 V. The nebulizer gas flow was set at 6 bars and the source pressure of 5 mbar was not modified and corresponds to the standard operating pressure of the stepwave based interface of the mass spectrometer. Mass spectra were deconvoluted manually using the MassLynx software and taking into account the three to five most intense charge states (5% intensity cutoff) depending on mass spectra.

2.5. Peptide mapping

The protein (200 μ g) was vacuum-dried and dissolved in 25 μ L of 8 M urea, 0.2 M ammonium acetate solution pH 7.2. Reduction was accomplished by adding 10 μ L of a 85 mM DTT solution in water and incubating the resulting mixture for 15 min at 50 °C. After cooling at room temperature, 10 μ L of a 170 mM IAM solution in water were added and the solution was incubated at RT for 15 min in the dark. In the case of the experiment in non-reducing condition, the process is similar but DTT and IAM solutions were replaced by water.

After a four-fold dilution with water, digestion with trypsin (1:10, w/w) was performed overnight at 37 °C (final pH of 6.9 after dilution). Peptides obtained after digestion (40 μ g) were injected on a CSH C18 column (2.1 \times 150 mm, 1.7 μ m) using an ACQUITY UPLC system interfaced with a SYNAPT G2-S HDMS mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). The column was equilibrated at 60 °C and operated at a flow rate of 300 μ L/min. An aqueous solution containing 0.1% FA and MeCN containing 0.1% FA were respectively used as buffer A and buffer B, proteins were eluted by using a gradient of buffer B. The mass spectrometer was operated in the positive mode, at a 20,000 FWHM resolution, using a capillary voltage of 3 kV, a source block temperature of 80 °C and a desolvation temperature of 150 °C. Calibration was carried out according to manufacturer's procedure using NaI cluster ions. MS data were recorded from m/z 200 to m/z 2000 and MS/MS data were acquired with the instrument operating in the data-dependent mode. Data were analyzed with the Peaks Studio 8.5 software with a parent mass error tolerance of 25 ppm, a fragment mass error tolerance of 0.1 Da and a FDR of 5%. The Peaks PTM module was used after DeNovo sequencing and database search to find the position of MPTs. All putative MPTs were considered as variable modifications while carbamidomethylation was the only one to be fixed.

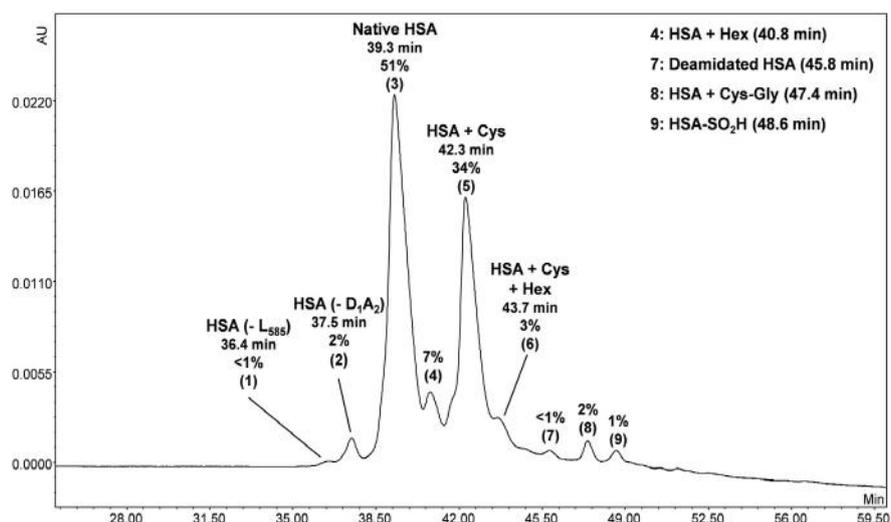


Fig. 1. Ion exchange chromatogram of a typical plasma-derived HSA with UV detection at 280 nm.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of major HSA isoforms: native, cysteinylated, truncated and glycosylated

The IEX method presented in this study is based on a salt gradient differential elution of HSA variants using ammonium acetate at pH 7.4. A typical chromatographic profile of HSA purified from plasma is

displayed in Fig. 1. Nine isoforms were separated between 35 and 49 min and mass spectra of the first six eluted species are shown in Fig. 2. The first two peaks of the chromatogram correspond to truncated isoforms of HSA. Peak 1 eluted at 37.5 min displays a deconvoluted mass spectrum (see Fig. 2) of 66,324.4 Da corresponding to HSA without C-terminal leucine while peak 2 displays an experimental mass of 66,251.9 Da consistent with the loss of the two N-terminal residues (Asp₁-Ala₂). These C- and N-terminal truncated HSA isoforms

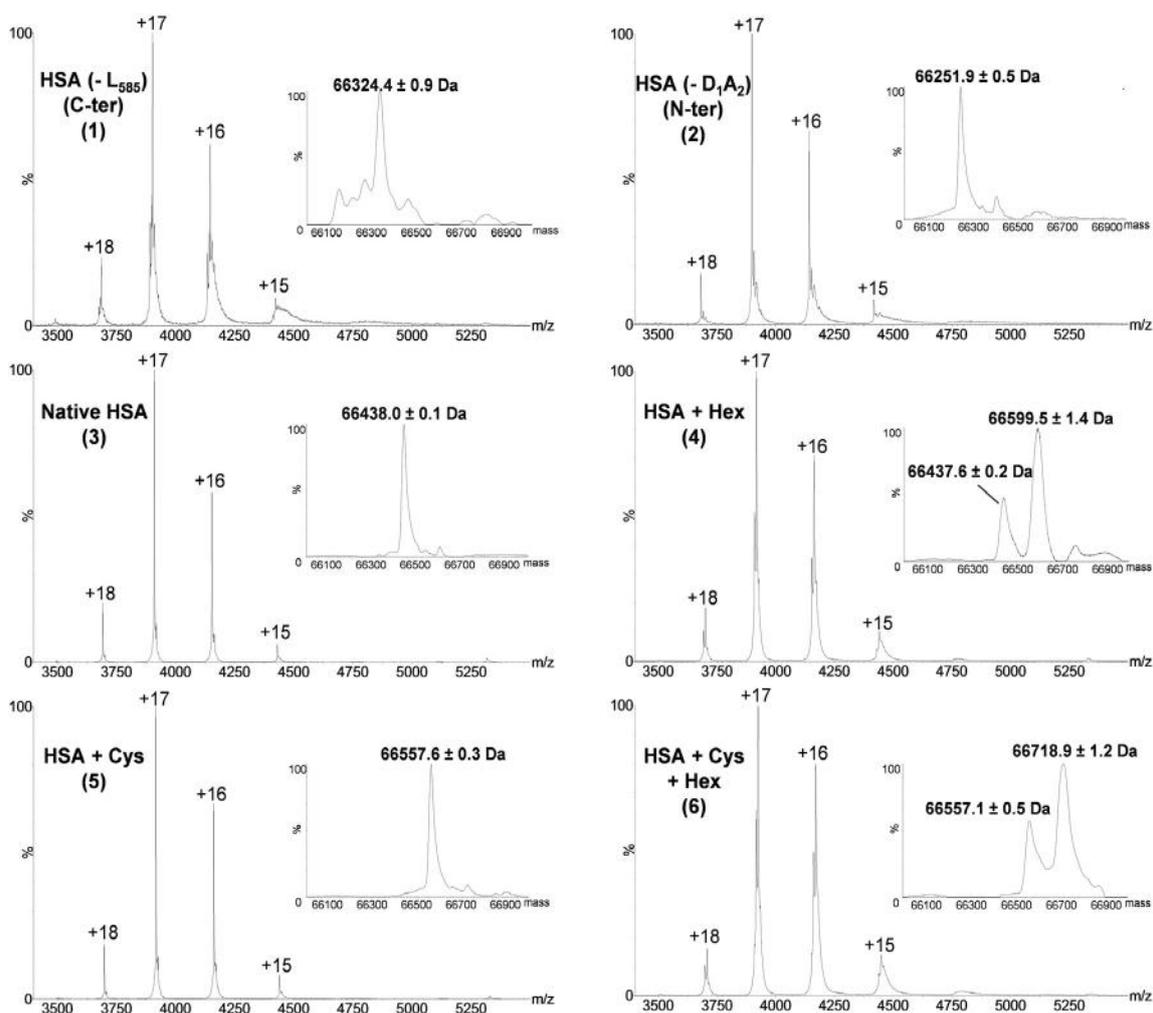


Fig. 2. Native ESI-MS spectra of (1 and 2) truncated, (3) native, (4) glycosylated, (5) cysteinylated and (6) both glycosylated and cysteinylated HSA isoforms, referring to labelled peaks of Fig. 1. Inserts represent deconvoluted mass spectra.

represent < 1% and 2% respectively of the total UV area of the chromatogram. The C-terminal truncation is usually due to carboxypeptidase A activity in plasma [14] while the loss of the two N-terminal amino acids is related to a chemical degradation pathway of HSA in solution [15]. The most abundant isoform representing 51% of the profile and eluted at 39.3 min corresponds to native HSA with an experimental mass of 66,438.0 Da in close accordance with the theoretical mass of HSA with a free thiol group at Cys₃₄ ($M_{th} = 66,437.9$ Da). Peak 4 eluted at 40.8 min and representing 7% of the profile presents an experimental mass with a +161.5 Da mass shift compared to peak 3 (mass of 66,599.5 Da). This peak, not base-line separated from peak 3, corresponds to a glycosylated form generated by the addition of a circulating glucose on the protein and promoted by the prolonged half-life of HSA in plasma [33]. The second most abundant isoform eluted at 42.3 min (peak 5), representing 34% of the total UV area of the chromatogram, displays a deconvoluted mass spectrum with a mass of 66,557.6 Da consistent with the theoretical mass of HSA having a disulphide bridge between Cys₃₄ and a circulating free cysteine ($M_{th} = 66,557.1$ Da). A shoulder of this peak, observed at 43.7 min (peak 6), presents an experimental mass of 66,718.9 Da consistent with its related glycosylated isoform ($M_{th} = 66,719.2$ Da). To note, the reaction of the aldehyde group of a reducing sugar with the primary or secondary amine of an amino acid results in the loss of a positive charge of the protein and leads to the elution of glycosylated HSA toward more acidic retention times with this method.

Three minor isoforms, observed between 45 and 49 min (peaks 7 to 9), represent < 5% of the profile. The experimental masses observed for these peaks were 66,439.3 Da, 66,614.1 Da and 66,468.8 Da for peaks 7, 8 and 9 respectively (data not shown). These masses could be consistent with deamidation for peak 7 and putative oxidation of Cys₃₄ for the two other peaks. Peak 9 could be a sulfinic form of Cys₃₄ residue with an observed mass difference of +30.8 Da versus the reduced Cys₃₄ form eluted in peak 3. Because of the low MS signal due to the low abundance of these isoforms, further investigations are required for a reliable identification.

3.2. Investigation of minor deamidated and oxidized HSA isoforms

Peak 7 eluted at 45.8 min of the chromatogram (see Fig. 1) displays an experimental mass slightly higher than the one of the native HSA and is suspected to be a deamidated isoform due to its elution toward more acidic retention times. Deamidation reaction modifies non-enzymatically asparagine residues to aspartic acid and/or isoaspartic resulting in a mass addition of +1 Da of the protein. Due to the slight mass shift (+1 Da) and the low MS signal of peak 7, the accuracy of the mass observed is not high enough to clearly attribute an identity to this peak. However, this reaction is well-known to be a degradation pathway of proteins during long-term storage at low temperature [30]. An aged HSA stored for 5 years at 5 °C was analyzed by IEX-MS to confirm deamidation. The chromatogram of aged HSA (Fig. 3A) highlights a dramatic increase of both peak 2 (N-terminal truncated HSA) and peak 9 as well as a significant increase of peak 7. The mass spectrum of peak 7 (panel B) shows a major mass of 66,284.2 Da consistent with the oxidized form of the N-terminal truncated HSA and a second mass of 66,439.3 Da corresponding to more abundant deamidated forms in this sample. The analysis of this aged HSA sample points out N-terminal truncation and Cys₃₄ oxidation as the main degradation pathways of the protein during long term storage at low temperature.

The minor isoform eluted at 47.4 min (peak 8) presents a mass of 66,614.1 Da corresponding to a mass shift of +176 Da compared to the theoretical mass of the native HSA. Such isoform has never been reported in the literature with the exception of Boisvert et al. [34] who detected an isoform with a mass shift of +177 Da but without being able to identify it. Considering that the second most abundant low-molecular free thiol in plasma is a degradation end-product of glutathione known as cysteinylglycine with a mass of 178.2 Da [35, 36];

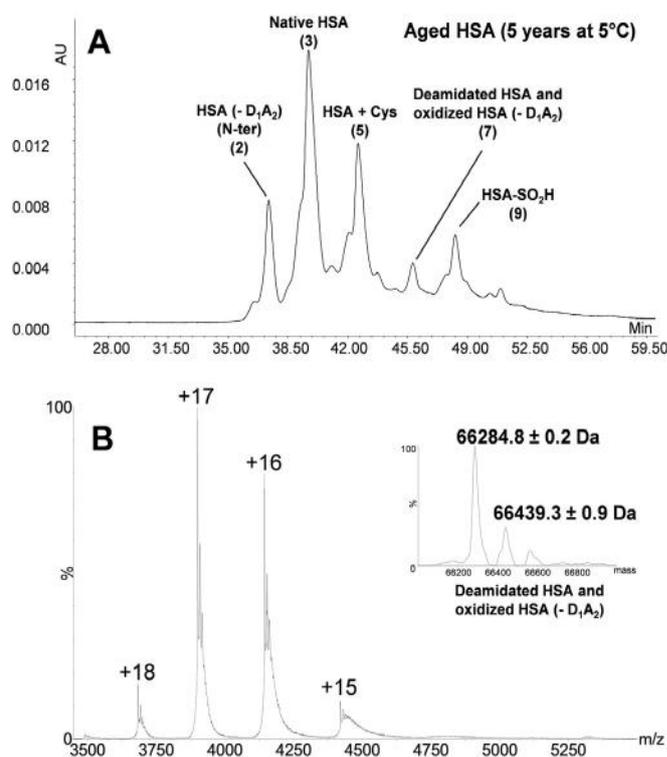


Fig. 3. Panel A represents an ion exchange chromatogram of an aged HSA with UV detection at 280 nm. Panel B represents the ESI-MS spectrum of oxidized HSA-DA and deamidated HSA. Insert represents deconvoluted mass spectrum.

the formation of a disulfide bond between cysteine at position 34 of HSA and a circulating cysteinylglycine would be a consistent hypothesis to explain the mass of 66,614.1 Da observed for peak 8. Moreover, Yasuhara et al. [37] reported previously the presence of cysteinylglycine bound to HSA based on an experiment involving reduction of the protein with DTT and LC analysis with an on-line post column derivatization of the liberated sulfhydryl compounds. To confirm this assumption, HSA was incubated for 30 min at 50 °C with 1 mM of free cysteinylglycine and analyzed by IEX-MS (Fig. 4A). As suspected, a dramatic increase of peak 8 is observed and the associated mass spectrum displayed in panel B shows a mass of 66,614.1 Da consistent with the addition of a cysteinylglycine molecule to the free Cys₃₄ of HSA.

The last peak of the chromatogram (see Fig. 1, peak 9) presents a mass of 66,468.8 Da that could correspond to the oxidation of the free sulfhydryl of Cys₃₄ to a sulfinic acid. This modification induces a mass addition of +32 Da which is close to the mass shift potentially induced by nitrosylation (+30 Da) already reported as a potential modification of HSA [1]. For an unambiguous identification of peak 9 as oxidation, HSA was incubated for 2 h with 1 mM H₂O₂. The chromatogram of the forced oxidized HSA (Fig. 4C) shows a significant increase of peak 9, the corresponding mass spectrum displayed in Fig. 4D shows a mass of 66,468.8 Da confirming the identity of this peak as oxidized HSA.

3.3. Analysis of HSA in presence of Cu(II)

The ability of the HSA N-terminal amino acids to bind Cu(II) with high affinity is widely reported in the literature and about 2% of the HSA N-terminal site in blood serum is populated by Cu(II). The characterization of metal ions binding to HSA was usually performed by spectroscopic methods [11] but Alahmad et al. [38] tried to assess HSA-Cu(II) complexes by Capillary Zone Electrophoresis (CZE). They observed differences in the electrophoretic profiles of HSA with or without Cu(II) ions but the assignment of each peak of the HSA + Cu(II) electropherogram was virtually impossible without MS detection. The benefit of a direct coupling to MS with the present method was leveraged to evaluate Cu(II) ions binding to HSA. HSA was incubated with

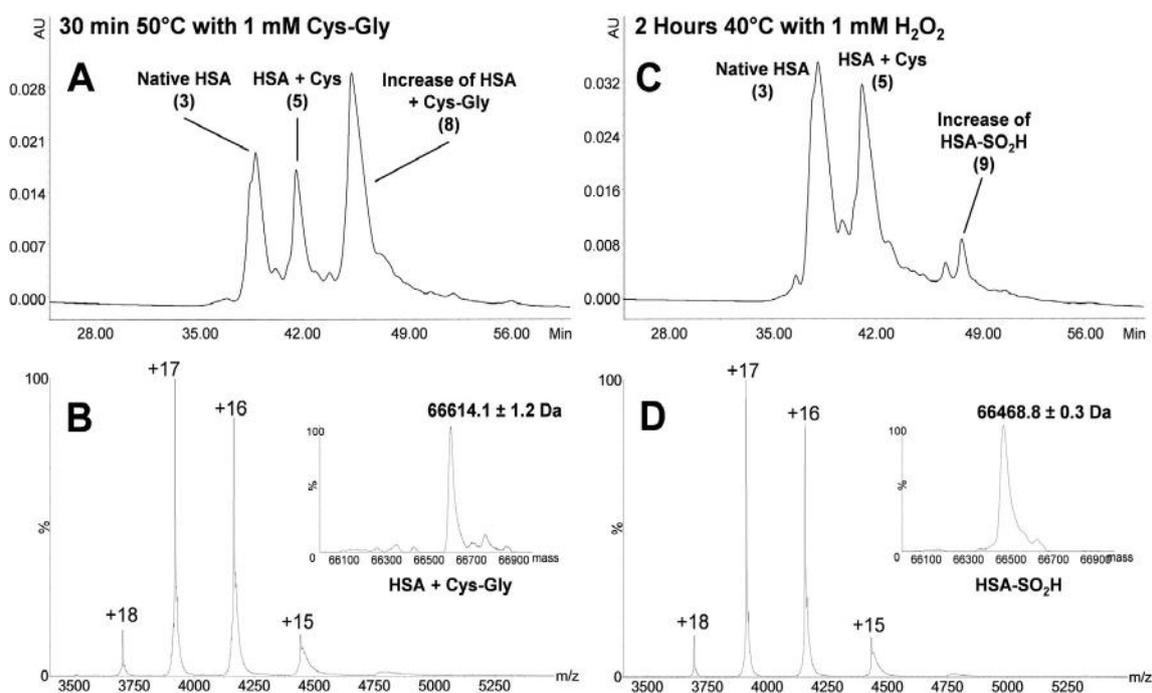


Fig. 4. Ion exchange chromatograms of HSA incubated with cysteinylglycine (Panel A) and H_2O_2 (Panel C) with UV detection at 280 nm. Panels B and D represent ESI-MS spectra of HSA bound with cysteinylglycine and oxidized HSA respectively. Inserts represent deconvoluted mass spectra.

0.5 mM of copper(II) acetate at 37 °C for 2 h and analyzed by IEX-MS. The resulting chromatogram, displayed in Fig. 5 panel A, highlights a dramatic shift of the chromatographic profile toward acidic retention times. The two main peaks eluted at 50.0 and 51.4 min present experimental masses of 66,500.2 Da and 66,619.6 Da (Panel B and C) respectively. These masses are consistent with theoretical masses of native HSA ($M_{\text{th}} = 66,499.4$ Da) and cysteinylated HSA ($M_{\text{th}} = 66,618.6$ Da) binding one Cu(II) ion. This RT shift could be attributed to a significant conformational change upon Cu(II) binding that promotes a better binding of HSA to the stationary phase of the column. Interestingly, the first two peaks of the chromatogram corresponding to N-terminal truncated forms stay unchanged in RT in presence of Cu(II) ions. Mass spectra of these N-terminally truncated forms of native and cysteinylated HSA eluted at 37.5 and 38.9 min show no Cu(II) binding in these conditions. Altogether, MS data and the absence of RT shift confirm the crucial importance of the first two N-terminal amino acids of HSA to bind Cu(II) ions with high affinity *via* a conformational change of the protein. In this case, the high affinity of Cu(II) to HSA ($K[\text{M}^{-1}] = 1.5 \times 10^{11}$) [26] made possible the detection of HSA-Cu(II) complexes by IEX-MS but investigations with ligands of lower affinities ($K[\text{M}^{-1}] < 1 \times 10^6$) [9] such as Zn(II), naproxen or warfarin was unsuccessful (data not shown), probably because of displacement of the binding equilibrium during the chromatographic separation of HSA isoforms. As a summary, 11 isoforms were finally separated and identified by IEX-MS; their experimental and theoretical masses are summarized in Table 1.

3.4. Identification of the PTMs sites of HSA by LC-MS/MS

Bottom-up LC-MS/MS analyses of standard and aged HSA were performed in reducing and non-reducing conditions to localize the PTM hotspots of the protein. The different modified residues and the type of modification observed are reported in Table 2. MS/MS spectra used for the identification of these modifications are presented as Supplementary data (Figs. S1–S4). Analysis of the standard HSA under non-reducing conditions shows two main modifications at Cys₃₄ corresponding to the cysteinylated and the oxidation into a sulfinic acid of the free sulfhydryl group of Cys₃₄ residue (see Supplementary Fig. S1). Under reducing conditions, two glycation sites were clearly observed at Lys₂₃₃

and Lys₅₂₅ as previously reported in the literature [16] (see Supplementary Fig. S2). Glycation of HSA in blood results from the reaction of circulating reducing glucose with a free amine group of the protein to form a reversible Schiff base followed by an Amadori rearrangement to form a stable ketoamine. Our data are in close accordance with prior work of Shaklai et al. [39] who detected approximately 10% of glycated HSA in normal serum with preferential glycation at Lys₅₂₅ site. Of importance, this level of glycation is often debated in literature because of heterogeneous results obtained with different methods [40]. Because IEX chromatography gives a direct detection of the glycated forms we believe that 10% should be an accurate value of the basal glycation level of HSA in normal plasma. Finally, two deamidation sites at Asn₉₉ and Asn₁₃₀ were detected in the aged sample (see Supplementary Fig. S3).

3.5. Performance evaluation of the method for HSA isoforms quantification

In order to provide minimal performance parameters of the present IEX method, increasing amounts of HSA were injected in triplicates at 5, 10, 15, 20 and 30 μg . Height (μAU), RT (min), resolution, absolute ($\mu\text{AU}\cdot\text{min}^{-1}$) and relative area (%) of the main peak (native HSA) were extracted from these experiments with UV detection. Because HSA is injected directly without sample preparation, minimal noise is expected from the method when highly purified HSA is analyzed. Height and absolute area *versus* protein load were plotted and fitted against a linear curve model. A correlation coefficient of 0.9998 was found for absolute area, demonstrating linearity and absence of UV detector saturation over 5 to 30 μg . A correlation coefficient of 0.9752 was found for peak height, this lower value is indicative of an early saturation of the column that should be traduced by an increased peak width. Resolutions (USP) measured at each protein load confirmed this result with a linear decrease observed with increasing of protein loads (from 2.8 at 5 μg to 1.2 at 30 μg). An optimal target protein load of 10 μg was preferred for enhanced resolution and MS sensitivity. Precision regarding the measured relative area and retention time of the main peak were evaluated on the 15 recorded chromatograms at CVs of 0.6% and 1.1% respectively. Altogether these preliminary performance parameters suggest that the method is well suited to the routine analysis of HSA charge variants.

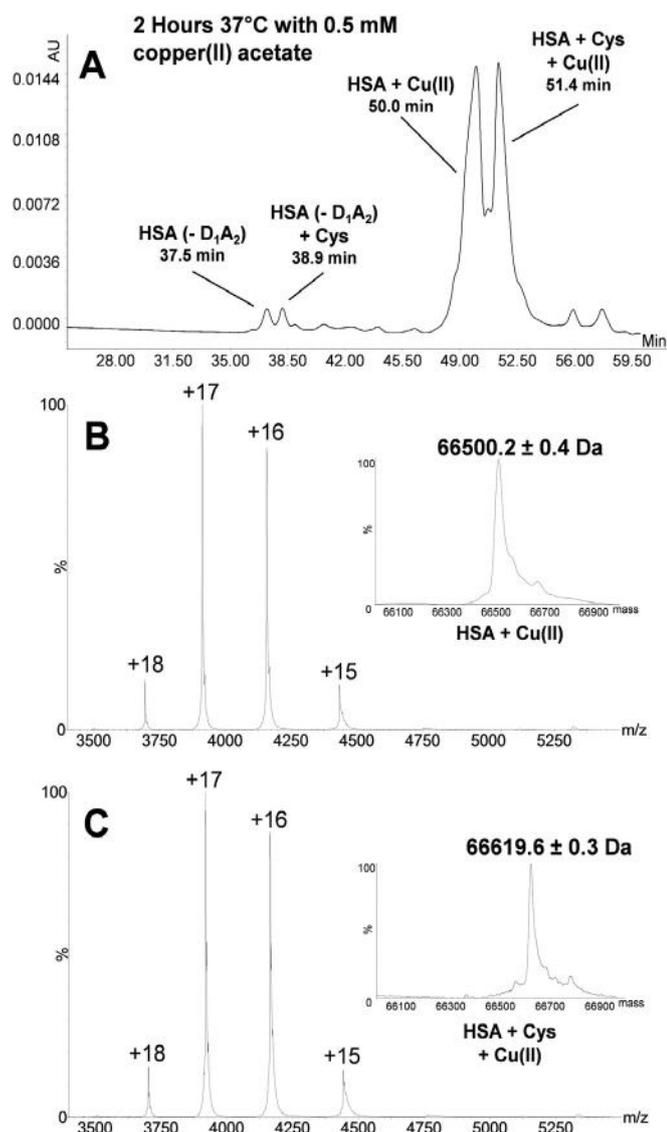


Fig. 5. Panel A represents the ion exchange chromatogram of HSA incubated with copper(II) acetate with UV detection at 280 nm. Alongside, mass spectra of native HSA (Panel B) and cysteinylated HSA (Panel C) binding one Cu(II) ion. Inserts represent deconvoluted mass spectra.

Table 1
Summary of HSA isoform masses observed by IEX-MS.

Peak	Retention time (min)	Residues	Theoretical mass (Da)	Experimental mass (Da)	Error (ppm)
1	36.4	HSA (-L585)	66,324.8	66,324.4 ± 0.9	6
2	37.5	HSA (-D1A2)	66,251.8	66,251.9 ± 0.5	2
3	39.3	HSA	66,437.9	66,438.0 ± 0.1	2
4	40.8	HSA + Hex	66,600.1	66,599.5 ± 1.4	9
5	42.3	HSA + Cys	66,557.1	66,557.6 ± 0.3	8
6	43.7	HSA + Cys + Hex	66,719.2	66,718.9 ± 1.2	4
7	45.8	HSA-DA-SO ₂ H	66,283.8	66,284.8 ± 0.2	17
		HSA deamidated	66,438.9	66,439.3 ± 0.9	6
8	47.4	HSA + Cys-Gly	66,614.1	66,614.1 ± 1.2	0
9	48.6	HSA-SO ₂ H	66,469.9	66,468.8 ± 0.3	17
10	50.0	HSA + Cu(II)	66,499.4	66,500.2 ± 0.4	12
11	51.4	HSA + Cys + Cu(II)	66,618.6	66,619.6 ± 0.3	15

In addition, the method was also used directly on HSA in raw plasma and acceptable chromatograms (as the one shown in Fig. S4) were obtained because of the high predominance of the protein in plasma and presumably exclusion of other proteins in the dead volume of the column. Thus, this method could be an easy and rapid tool for

Table 2

Summary of the identified PTMs deduced from the peptide mapping experiment. (*) Deamidated peptides were identified in the aged sample.

Modification	Residue	Peptide	Experimental mass (Da)	Error (ppm)	MS/MS sequencing
Cysteinylated	Cys34	Ala21-Lys40	2551.264	2.2	Yes
Sulfenic acid	Cys34	Ala21-Lys40	2464.245	1.2	Yes
Deamidation*	Asp99	Asp99-Lys106	1075.476	1.6	Yes
	Asp130	Leu115-Lys137	2778.332	0.3	Yes
Glycation	Lys233	Ala226-Lys240	1811.937	0.0	Yes
	Lys525	Lys525-Lys534	1289.742	0.3	Yes

diagnosis of liver disorders by direct analysis of patient's raw plasma within the framework of studies using individual human samples under pathological conditions *versus* controls.

4. Conclusion

HSA is the most abundant protein from plasma and displays a complex charge variant profile due to the presence of a wide range of possible PTMs. HSA is indeed sensitive to N- and C-terminal cleavages, oxidation of its reduced free Cys₃₄ residue, deamidation and glycation of solvent exposed lysine residues. The monitoring of HSA structural integrity is of high importance in cases of use as a biomarker of pathological conditions or as a therapeutic protein to minimize degradations during the purification process.

For this purpose, we developed in this study an ion exchange chromatographic method coupled to native mass spectrometry in order to bridge an effective charge variants separation method with a powerful identification technique. A total of 9 variants were separated and identified from HSA purified from normal human plasma. First, 3 oxidized forms of Cys₃₄ were well characterized *i.e.* cysteinyl, cysteinylglycyl and sulfenic forms. The monitoring of these oxidized forms is of high interest considering the known antioxidant properties of HSA. Glycation of HSA was also well evidenced and estimated at a level of about 10%, to note, for this particular measurement, the method stand out by its simplicity. At last, several cleaved forms of HSA were detected and experiments conducted in presence of Cu(II) ions demonstrated the ability of the method to assess the binding capacity of HSA for this specific high affinity metal ion. Particularly, N-terminally truncated forms were unable to bind Cu(II) and thus the key role of [Asp₁-Ala₂] in the metal chelating properties of HSA was pointed out. Furthermore, the method showed interesting preliminary performance parameters in term of linearity and precision for routine characterization of purified HSA. Finally, the use of this method for clinical purpose by investigating HSA in raw plasma is also feasible in discovery and routine analysis.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.014>.

Conflict of interest

All authors are employees of LFB BIOTECHNOLOGIES, subsidiary of LFB SA group.

Acknowledgements

We wish to acknowledge LFB BIOTECHNOLOGIES for supporting research and Clémentine Lamarre, Elwrick Guimbaud, Michel Tellier and Paul Boulanger for their support.

References

- [1] M. Naldi, M. Baldassarre, M. Domenicali, M. Bartolini, P. Caraceni, Structural and functional integrity of human serum albumin: analytical approaches and clinical relevance in patients with liver cirrhosis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 144 (2017) 138–153.
- [2] P. Caraceni, M. Domenicali, A. Tovoli, L. Napoli, C.S. Ricci, M. Tufoni, M. Bernardi, Clinical indications for the albumin use: still a controversial issue, *Eur. J. Intern. Med.* 24 (2013) 721–728.
- [3] D.C. Carter, J.X. Ho, Structure of serum albumin, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 153–203.
- [4] M. Dockal, D.C. Carter, F. Ruker, Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3042–3050.
- [5] L. Turell, R. Radi, B. Alvarez, The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes, *Free Radic. Biol. Med.* 65 (2013) 244–253.
- [6] J. Fernandez, J. Monteagudo, X. Bargallo, W. Jimenez, J. Bosch, V. Arroyo, M. Navasa, A randomized unblinded pilot study comparing albumin versus hydroxyethyl starch in spontaneous bacterial peritonitis, *Hepatology* 42 (2005) 627–634.
- [7] U. Kragh-Hansen, Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin-ligand complexes, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 5535–5544.
- [8] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life* 57 (2005) 787–796.
- [9] U. Kragh-Hansen, V.T. Chuang, M. Otagiri, Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 695–704.
- [10] G.J. Quinlan, G.S. Martin, T.W. Evans, Albumin: biochemical properties and therapeutic potential, *Hepatology* 41 (2005) 1211–1219.
- [11] W. Bal, M. Sokolowska, E. Kurowska, P. Faller, Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 5444–5455.
- [12] C. Chaudhury, S. Mehnaz, J.M. Robinson, W.L. Hayton, D.K. Pearl, D.C. Roopenian, C.L. Anderson, The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 315–322.
- [13] J. Anguizola, R. Matsuda, O.S. Barnaby, K.S. Hoy, C. Wa, E. DeBolt, M. Koke, D.S. Hage, Review: glycation of human serum albumin, *Clin. Chim. Acta* 425 (2013) 64–76.
- [14] D. Bar-Or, L.T. Rael, R. Bar-Or, D.S. Slone, M.L. Craun, The formation and rapid clearance of a truncated albumin species in a critically ill patient, *Clin. Chim. Acta* 365 (2006) 346–349.
- [15] B. Chan, N. Dodsworth, J. Woodrow, A. Tucker, R. Harris, Site-specific N-terminal auto-degradation of human serum albumin, *Eur. J. Biochem.* 227 (1995) 524–528.
- [16] P. Rondeau, E. Bourdon, The glycation of albumin: structural and functional impacts, *Biochimie* 93 (2011) 645–658.
- [17] M. Domenicali, M. Baldassarre, F.A. Giannone, M. Naldi, M. Mastroberoberto, M. Biselli, M. Laggetta, D. Patrono, C. Bertucci, M. Bernardi, P. Caraceni, Posttranscriptional changes of serum albumin: clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis, *Hepatology* 60 (2014) 1851–1860.
- [18] K. Nagumo, M. Tanaka, V.T. Chuang, H. Setoyama, H. Watanabe, N. Yamada, K. Kubota, K. Matsushita, A. Yoshida, H. Jinnouchi, M. Anraku, D. Kadowaki, Y. Ishima, Y. Sasaki, M. Otagiri, T. Maruyama, Cys34-cysteinylation of human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases, *PLoS One* 9 (2014) e85216.
- [19] K. Oettl, R.E. Stauber, Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 580–590.
- [20] J.L. Plantier, V. Duret, V. Devos, R. Urbain, S. Jorieux, Comparison of antioxidant properties of different therapeutic albumin preparations, *Biologicals* 44 (2016) 226–233.
- [21] K. Oettl, G. Marsche, Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease, *Methods Enzymol.* 474 (2010) 181–195.
- [22] M. Sogami, S. Era, S. Nagaoka, K. Kuwata, K. Kida, J. Shigemitsu, K. Miura, E. Suzuki, Y. Muto, E. Tomita, et al., High-performance liquid chromatographic studies on non-mercapt in equilibrium with mercapt conversion of human serum albumin. II, *J. Chromatogr.* 332 (1985) 19–27.
- [23] A. Kawakami, K. Kubota, N. Yamada, U. Tagami, K. Takehana, I. Sonaka, E. Suzuki, K. Hirayama, Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions, *FEBS J.* 273 (2006) 3346–3357.
- [24] M. Kleinova, O. Belgacem, K. Pock, A. Rizzi, A. Buchacher, G. Allmaier, Characterization of cysteinylated of pharmaceutical-grade human serum albumin by electrospray ionization mass spectrometry and low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2965–2973.
- [25] M. Naldi, M. Baldassarre, M. Domenicali, F.A. Giannone, M. Bossi, J. Montomoli, T.D. Sandahl, E. Glavind, H. Vilstrup, P. Caraceni, C. Bertucci, Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 122 (2016) 141–147.
- [26] K. Oettl, R. Birner-Gruenberger, W. Spindelboeck, H.P. Stueger, L. Dorn, V. Stadlbauer, C. Putz-Bankuti, P. Krisper, I. Graziadei, W. Vogel, C. Lackner, R.E. Stauber, Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival, *J. Hepatol.* 59 (2013) 978–983.
- [27] M. Sogami, S. Nagoka, S. Era, M. Honda, K. Noguchi, Resolution of human mercapt and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Pept. Protein Res.* 24 (1984) 96–103.
- [28] J. Ueyama, Y. Ishikawa, T. Kondo, M. Motoyama, H. Matsumoto, T. Matsushita, A revised method for determination of serum mercaptalbumin and non-mercaptalbumin by high-performance liquid chromatography coupled with postcolumn bromocresol green reaction, *Ann. Clin. Biochem.* 52 (2015) 144–150.
- [29] L. Turell, H. Botti, L. Bonilla, M.J. Torres, F. Schopfer, B.A. Freeman, L. Armas, A. Ricciardi, B. Alvarez, R. Radi, HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 944 (2014) 144–151.
- [30] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: case study after a long-term storage at +5 degrees C, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1048 (2017) 130–139.
- [31] K. Muneeruddin, M. Nazzaro, I.A. Kaltashov, Characterization of intact protein conjugates and biopharmaceuticals using ion-exchange chromatography with on-line detection by native electrospray ionization mass spectrometry and top-down tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 10138–10145.
- [32] E.J. Cohn, L.E. Strong, et al., Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids, *J. Am. Chem. Soc.* 68 (1946) 459–475.
- [33] C. Wa, R.L. Cerny, W.A. Clarke, D.S. Hage, Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 385 (2007) 48–60.
- [34] M.R. Boisvert, K.G. Koski, C.D. Skinner, Increased oxidative modifications of amniotic fluid albumin in pregnancies associated with gestational diabetes mellitus, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1133–1137.
- [35] G.L. Hortin, N. Seam, G.T. Hoehn, Bound homocysteine, cysteine, and cysteinylglycine distribution between albumin and globulins, *Clin. Chem.* 52 (2006) 2258–2264.
- [36] W.A. Kleinman, J.P. Richie Jr., Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 19–29.
- [37] T. Yasuhara, K. Nokihara, Quantitative determination of biological sulfhydryl groups by postcolumn derivatization and elucidation of microheterogeneity of serum albumins, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3505–3509.
- [38] Y. Alahmad, N.T. Tran, I. Le Potier, E. Forest, S. Jorieux, M. Taverna, A new CZE method for profiling human serum albumin and its related forms to assess the quality of biopharmaceuticals, *Electrophoresis* 32 (2011) 292–299.
- [39] N. Shaklai, R.L. Garlick, H.F. Bunn, Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 3812–3817.
- [40] H.V. Roohk, A.R. Zaidi, A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes, *J. Diabet. Sci. Technol.* 2 (2008) 1114–1121.

5. Conclusion

La chromatographie d'échange d'ions (IEX) est une technique chromatographique incontournable pour la caractérisation des protéines et fait partie des méthodes analytiques de référence exigées par les agences réglementaires pour la mise sur le marché de produits biopharmaceutiques. Cette technique est particulièrement adaptée à la caractérisation de modifications induisant des variations de charges des protéines telles que la déamidation, la glycation ou la perte d'acides aminés terminaux chargés. Cependant, les sels non-volatils traditionnellement utilisés en IEX sont incompatibles avec une analyse par spectrométrie de masse. Cela a pour conséquence une identification longue et complexe des isoformes séparées en IEX, nécessitant la collecte de fractions et l'utilisation de techniques analytiques orthogonales compatibles avec la MS. Trois méthodes IEX développées avec des sels volatils permettant un couplage direct avec la MS pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux et d'une albumine thérapeutique sont présentées dans ce chapitre. Les résultats obtenus montrent les capacités de ces méthodes IEX-MS pour l'identification de modifications post-traductionnelles induisant des modifications de la charge des protéines, notamment des isoformes présentes en faible abondance (Ex : anticorps glycosylé sur la partie Fab) ou jamais identifiées auparavant (Ex : albumine avec une cystéinyglycine fixée sur le résidu Cys₃₄). Grâce au couplage IEX-MS, la laborieuse collecte des fractions IEX suivie d'analyses *bottom-up* n'est plus indispensable pour une première identification des isoformes. Mais au-delà du temps d'analyse gagné pour l'identification des espèces séparées, l'IEX-MS permet une caractérisation par spectrométrie de masse native pouvant apporter des informations structurales complémentaires. En effet, les conditions natives fournies par l'IEX-MS permettent la caractérisation de complexes non-covalents tels que le dimère (Fc/2)₂ dans le cas de l'analyse d'anticorps par une approche *middle-up* ou l'évaluation des propriétés de chélation des ions Cu(II) par la partie N-terminale de l'albumine. Enfin, ces méthodes employant des sels volatils non-conventionnels pour l'IEX fournissent des performances chromatographiques très satisfaisantes en termes de résolution chromatographique, de taux de recouvrement et de répétabilité. Elles peuvent donc être utilisées en routine pour les suivis de protéines thérapeutiques avec une détection par spectrométrie de masse pour l'identification ou

seulement par couplage avec un détecteur UV si l'identification des espèces a déjà été effectuée.

Chapitre V : Etude de la relation Structure / Fonction de protéines thérapeutiques

1. Introduction

Les protéines thérapeutiques sont susceptibles de subir un certain nombre de modifications lors des différentes étapes de fabrication, de transport ou de stockage. Il est alors primordial d'identifier et d'évaluer l'impact de ces potentielles modifications sur l'activité biologique des produits biopharmaceutiques. Pour cela, des études sur la relation structure-fonction des protéines thérapeutiques doivent être menées en faisant intervenir des méthodes de caractérisation structurale et des tests d'activité biologique. Dans la pratique, évaluer l'impact biologique d'une modification nécessite souvent des étapes de purification, notamment par chromatographie liquide, pour isoler les protéoformes d'intérêt. Des réactions chimiques ou enzymatiques forcées (peroxyde d'hydrogène, carboxypeptidases...) peuvent également être utiles pour enrichir l'échantillon avec une protéoforme présentant une modification qui doit être étudiée. *In fine*, si une modification induit une diminution de l'activité biologique de la protéine thérapeutique d'intérêt, elle sera considérée comme un attribut critique de qualité (CQA) et devra faire l'objet d'un suivi rigoureux avec des outils analytiques adaptés.

Dans ce chapitre, l'impact biologique des modifications de deux protéines thérapeutiques, albumine et un anticorps thérapeutique, a été étudié en utilisant des techniques de chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse pour la caractérisation structurale et en utilisant des techniques de chromatographie d'affinité et de résonance plasmonique de surface pour les tests d'activité biologique *in vitro*. Dans la première étude, l'interaction entre une albumine thérapeutique et le récepteur néonatal Fc (FcRn) a été évaluée en relation avec plusieurs modifications que peut subir cette dernière, telles que l'oxydation, la glycation ou le clivage d'acides aminés N/C-terminaux. Ces modifications peuvent intervenir à différentes étapes de la production d'une albumine thérapeutique. Elles peuvent aussi être la conséquence de certaines pathologies. Il est important d'évaluer leur impact sur l'affinité de l'albumine au récepteur FcRn puisque ce dernier intervient directement dans le mécanisme de recyclage de la protéine dans le plasma et donc potentiellement sur sa demi-vie. Les anticorps monoclonaux recombinant sont synthétisés avec une lysine C-terminale sur chaque chaîne

lourde, celles-ci peuvent être clivées par des protéases présentes dans le milieu de culture cellulaire. Ces clivages induisent une hétérogénéité de la protéine dont nous avons évalué l'impact sur l'activité pharmacocinétique (affinité au récepteur FcRn), et sur les fonctions effectrices d'immunité lors de sa fixation au récepteur FcγRIIIa, dans la dernière étude présentée dans ce chapitre.

2. Investigation de l'impact des modifications post-traductionnelles de l'albumine sur son interaction avec le récepteur néonatal Fc

1. Résumé de l'article

Comme précédemment énoncé la sérum albumine humaine (HSA) représente plus de 50% des protéines plasmatiques et a pour principale fonction le maintien de la pression oncotique du plasma. Cette protéine a également la capacité de fixer réversiblement des composés endogènes ou exogènes tels que des acides gras, des hormones ou des médicaments, pour augmenter leur solubilité et participer à leur diffusion dans l'organisme. Enfin, les propriétés chélatrices d'ions métalliques de la partie N-terminale et le groupement sulfhydryle du résidu Cys₃₄ de la HSA en font le principal agent antioxydant en circulation dans plasma. Tout comme les IgG, l'albumine a une demi-vie particulièrement longue dans le plasma en raison de son interaction avec le récepteur néonatal Fc (FcRn) qui permet de protéger cette dernière de la dégradation lysosomale. L'interaction HSA-FcRn est basée sur un mécanisme de recyclage avec fixation de la protéine sur le récepteur à pH 6,0-6,5 et relargage à pH 7,0-7,4. Ce mécanisme implique les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins qui internalisent en continu par endocytose l'albumine et les IgG qui peuvent alors entrer en contact avec les récepteurs FcRn. Le pH faible des endosomes permet l'interaction FcRn-ligand, ce complexe peut ensuite être exporté vers la surface de la cellule où le pH physiologique permet la libération des IgG et de l'albumine dans la circulation sanguine. Les protéines non protégées par l'interaction au récepteur FcRn sont quant à elles conduites vers les lysosomes pour subir une digestion protéolytique. L'interaction IgG-FcRn est connue depuis la fin des années 1960 et l'impact des modifications post-traductionnelles ou des mutations de la partie Fc sur l'interaction au récepteur FcRn ont déjà fait l'objet d'études, montrant notamment une diminution de l'affinité des Fc oxydés. En ce qui concerne l'albumine, l'interaction HSA-FcRn n'a été mise en évidence qu'en 2003, raison pour laquelle peu de données sont disponibles sur la relation

structure/fonction de cette protéine. Certaines études suggèrent un lien entre les modifications de l'albumine, consécutives à certaines pathologies, et la diminution de sa demi-vie, mais la corrélation entre ces pathologies et l'hypoalbuminémie doit encore être explorée. Dans cette étude, nous avons développé une méthode de chromatographie d'affinité FcRn basée sur une élution par gradient de pH, similaire au mécanisme physiologique, pour évaluer l'impact des modifications post-traductionnelles de l'albumine sur son affinité au FcRn. Les espèces séparées par cette méthode ont été collectées puis caractérisées par IEX-MS. Plusieurs modifications diminuant l'affinité de l'albumine au récepteur FcRn ont pu être identifiées, puis confirmées par des traitements de stress chimiques ou enzymatiques et par une méthode analytique orthogonale, la résonance plasmonique de surface (SPR).

Caractérisation du profil de chromatographie d'affinité FcRn de l'albumine

L'analyse d'une albumine thérapeutique standard par chromatographie d'affinité FcRn montre un profil avec deux pics représentant 44% de l'aire totale du chromatogramme pour le pic précoce et 56% pour le pic tardif. Ces pics correspondent à deux sous-populations d'albumine présentant une affinité différente envers le récepteur FcRn. En effet, les protéoformes d'albumines éluées rapidement dans le pic précoce sont susceptibles de porter des modifications réduisant l'affinité de la protéine pour le récepteur FcRn. Pour identifier les différences structurales entre ces deux sous-populations, les deux pics séparés par chromatographie d'affinité ont été collectés et analysés par IEX-MS. La principale isoforme d'albumine identifiée par l'analyse IEX-MS du pic précoce est la forme cysteinylée au niveau du résidu Cys₃₄, les autres isoformes observées correspondent à des espèces tronquées au niveau de la partie C-terminale, des formes glyquées et des formes ayant également subies des modifications de la Cys₃₄ (oxydation et cystéinyl-glycylation). Le chromatogramme IEX-MS de la fraction tardive de chromatographie d'affinité présente quant à lui une isoforme majoritaire correspondant à la forme native de l'albumine, *ie* avec un groupement sulfhydryle libre (Cys₃₄). Une isoforme secondaire correspondant au clivage des deux acides aminés N-terminaux [A₁D₂] de l'albumine est également détectée. Les informations structurales apportées par l'analyse IEX-MS du pic précoce, correspondant à la fraction de faible affinité au FcRn, et du pic tardif, correspondant à la fraction de haute affinité au FcRn suggèrent que la modification de la Cys₃₄, le clivage C-terminal de Leu₅₈₅ et la glycation diminuent l'affinité de

l'albumine pour le récepteur FcRn. En revanche, le clivage des acides aminés N-terminaux [A₁D₂] de l'albumine ne semble pas perturber l'interaction entre cette dernière et son récepteur.

Impact de la glycation de l'albumine

La glycation de la HSA est une conséquence grave liée à l'hyperglycémie de patients diabétiques. Dans le but d'évaluer l'impact de cette modification sur l'interaction HSA-FcRn, la glycation d'une albumine standard a été réalisée *in vitro* puis analysée par chromatographie d'affinité FcRn. Le chromatogramme obtenu montre deux pics représentant chacun 50% de l'aire totale du chromatogramme. L'analyse IEX-MS des fractions correspondant à ces deux pics montre des profils similaires à ceux observés pour l'albumine standard à l'exception d'une importante augmentation des formes glyquées dans le pic précoce et la détection de formes glyquées mineures dans le pic tardif. Ces résultats suggèrent que l'impact de la glycation sur l'interaction HSA-FcRn dépend de la localisation du site de glycation sur la protéine. Une analyse bottom-up (LC-MS/MS) des formes glyquées des fractions précoce et tardive a été entreprise pour déterminer les sites de glycation de l'albumine qui impactent son interaction avec le récepteur FcRn. Trois sites de glycation ont été identifiés : Lys₁₉₅, Lys₂₃₃ et Lys₅₂₅, et le niveau de modification de ces sites a été estimé sur la base du signal MS. Des taux de glycation similaires pour Lys₁₉₅ et Lys₂₃₃ ont été observés pour les trois échantillons indiquant l'absence d'impact de la glycation de ces sites sur l'interaction HSA-FcRn. A contrario, un très faible taux de glycation de Lys₅₂₅ a été observé dans la fraction tardive (1%) par rapport à la fraction précoce (45%) démontrant clairement l'impact de la glycation de cette lysine sur l'interaction HSA-FcRn. Cette observation est d'autant plus importante que le résidu Lys₅₂₅ est considéré comme un site préférentiel de glycation de l'albumine *in vivo*.

Impact du clivage de la partie C-terminal de l'albumine

L'albumine standard contient des formes mineures de clivage du résidu C-terminal Leu₅₈₅ généré par l'activité protéolytique de la carboxypeptidase A (CPA) et les résultats précédemment obtenus suggèrent un impact de cette modification sur l'interaction HSA-FcRn. Pour confirmer ce résultat, un échantillon standard d'albumine a été traité avec de la CPA pour cliver de manière spécifique et homogène le résidu C-terminal Leu₅₈₅. L'analyse de cet échantillon par chromatographie d'affinité FcRn montre un profil identique à un échantillon

standard mais avec un déplacement complet du profil vers des temps de rétention plus faibles. Ce résultat démontre l'importance de la partie C-terminale de l'albumine dans l'interaction avec le récepteur FcRn.

Impact de la fixation de Cu(II) sur l'albumine

Les quatre acides aminés N-terminaux de la HSA ayant des propriétés de chélation d'ions métalliques, nous avons cherché à déterminer l'impact de la fixation d'un ion métallique par l'albumine sur son interaction au FcRn. Un échantillon de HSA standard a été incubé avec de l'acétate de cuivre entraînant la formation du complexe HSA-Cu(II). Ce dernier a été analysé par chromatographie d'affinité vis-à-vis du récepteur FcRn. Le chromatogramme obtenu est identique à celui de l'albumine standard démontrant l'absence d'impact de la fixation du cuivre par les quatre acides aminés N-terminaux de l'albumine sur son interaction avec le récepteur FcRn. Ceci est cohérent avec les précédents résultats montrant une interaction HSA-FcRn inchangée malgré le clivage des acides aminés N-terminaux [A₁D₂] de l'albumine.

Détermination de l'affinité au récepteur FcRn par résonance plasmonique de surface

Pour confirmer les résultats obtenus par chromatographie d'affinité, les différents échantillons ont été analysés par résonance plasmonique de surface (SPR). Cette technique orthogonale permet de déterminer les constantes d'affinité (K_d) ainsi que les profils d'association/dissociation à pH 6,0 pour évaluer l'interaction HSA-FcRn. Quatre échantillons ont été analysés : l'albumine standard, l'albumine traitée à la CPA, et les fractions précoce et tardive de l'albumine standard collectée par chromatographie d'affinité FcRn. L'albumine standard présente un K_d de 20 μ M alors que l'albumine traitée à la CPA présente une constante de dissociation trois fois plus élevée ($K_d=58 \mu$ M). Ce résultat confirme l'importance du résidu C-terminal Leu₅₈₅ de l'albumine dans l'interaction avec le récepteur FcRn. Par ailleurs les fractions précoce et tardive présentent respectivement des K_d de 33 μ M et de 19 μ M. Ces différences significatives s'expliquent par la présence majoritaire de la forme cystéinylée dans la fraction précoce et de la forme native (non-cystéinylée) dans la fraction tardive, démontrant l'impact de la modification de Cys₃₄ sur l'interaction HSA-FcRn. Les résultats d'analyses effectuées avec cette méthode orthogonale reproduisant le mécanisme physiologique d'interaction HSA-FcRn à pH 6,0 confirment ceux obtenus par chromatographie d'affinité.

Dans cette étude, la chromatographie d'affinité FcRn et l'IEX-MS ont été associés pour déterminer l'impact de modifications post-traductionnelles de l'albumine sur son affinité au récepteur FcRn. Les résultats obtenus ont clairement démontré un impact négatif de la modification de Cys₃₄, de la glycation de Lys₅₂₅ et du clivage de Leu₅₈₅ sur l'interaction HSA-FcRn, alors que le clivage de la partie C-terminale de l'albumine ou la glycation d'autres sites (Lys₁₉₅ et Lys₂₃₃) n'ont pas d'impact sur l'affinité de la HSA envers le récepteur. De plus, l'étude du complexe cristallographique FcRn, bêta-2-microglobuline et HSA montre distinctement que la modification des résidus Cys₃₄, Lys₅₂₅ et Leu₅₈₅ a un impact sur l'affinité de liaison de la HSA au récepteur FcRn. En effet ces derniers sont localisés à proximité du site d'interaction avec le récepteur FcRn. Ce qui n'est pas le cas des résidus Lys₁₉₅, Lys₂₃₃ et His₃ dont la modification n'impacte pas la formation du complexe. La localisation de ces différents résidus sur la structure de l'albumine et leur proximité ou non avec le site d'interaction du récepteur confirme les résultats obtenus par chromatographie d'affinité et par SPR. Certaines des modifications post-traductionnelles décrites précédemment impactant l'albumine sont la conséquence de pathologies. C'est le cas par exemple de la glycation pour les patients diabétiques, de l'oxydation du résidu Cys₃₄ dans le cas de cirrhoses ou encore le clivage du résidu Leu₅₈₅ pour les pathologies pancréatiques. Nos résultats soulignent l'importance de ces modifications vis-à-vis de la fonction de la protéine et ouvrent la voie vers une nouvelle compréhension de la relation structure/fonction de l'albumine qui pourrait éclaircir l'origine de l'hypoalbuminémie observée dans certaines pathologies.

II. Publication

Cette étude a été publiée dans *Protein science* :

Y. Leblanc, M. Berger, A. Seifert, N. Bihoreau, G. Chevreux, Human serum albumin presents isoform variants with altered neonatal Fc receptor interactions, Protein Science. 28 (2019) 1982–1992. <https://doi.org/10.1002/pro.3733>.

ARTICLE

Human serum albumin presents isoform variants with altered neonatal Fc receptor interactions

Yann Leblanc | Marie Berger | Alexander Seifert | Nicolas Bihoreau |
Guillaume Chevreux 

Analytical Department of LFB
Biotechnologies, Courtabœuf, France

Correspondence

Guillaume Chevreux, Analytical Department
of LFB Biotechnologies, 3 avenue des
Tropiques, 91958 Courtabœuf, France.
Email: guillaume.chevreux@gmail.com

Abstract

Human serum albumin (HSA) is the most abundant protein in plasma and presents the particularity, with IgG, to have an extraordinary long serum half-life conferred by its interaction with the neonatal Fc receptor (FcRn). If the impact of IgG post-translational modifications (PTMs) on FcRn binding is well documented, it is far less reported for HSA despite numerous PTMs occurring on the protein in plasma. HSA is susceptible to numerous degradation reactions in plasma, because of aging, oxidative stress or liver and pancreas related pathologies. In the present study, we combined FcRn affinity chromatography and mass spectrometry to investigate the impact of HSA PTMs upon FcRn binding. This methodology presents the advantage to distinguish the effect of a single modification from a plasma HSA preparation made of a mixture of different isoforms. Cys₃₄ oxidation, Lys₅₂₅ glycation, and Leu₅₈₅ C-terminal truncation, which are modifications related to several pathological conditions, were demonstrated to act negatively on HSA-FcRn interaction. The HSA-FcRn binding alteration generated by these modifications is consistent with their vicinity with the interaction interface of the two proteins. Results were discussed regarding altered half-life of HSA observed in several disease states and pave the way toward new understandings of the hypoalbuminemia pathogenesis.

Significance statement

In this study, we investigated the impact of several post-translational modifications of HSA toward its ability to bind to the neonatal Fc receptor using in vitro affinity chromatography, mass spectrometry, and surface plasmon resonance. Cys₃₄ oxidation, Lys₅₂₅ glycation, and Leu₅₈₅ C-terminal truncation were demonstrated to decrease HSA-FcRn binding. These modifications occurring in circulating HSA were discussed in relation to several pathologies as well as for the use of HSA as a therapeutic protein.

KEYWORDS

albumin, half-life, hypoalbuminemia, neonatal Fc receptor, post-translational modifications

Abbreviations: FcRn, neonatal Fc receptor; HSA, human serum albumin; IEX, ion exchange chromatography; MS, mass spectrometry; PTMs, post-translational modifications; RT, retention time; SPR, surface plasmon resonance.

1 | INTRODUCTION

Human serum albumin (HSA) is the most abundant circulating protein in the bloodstream and represents more than 50%

of plasma proteins.¹ This protein is synthesized in the liver and contributes to about 70–80% of the plasma oncotic pressure.² Beside its role of plasma-expander, HSA presents the ability to reversibly bind endogenous or exogenous compounds like fatty acids, hormones, metal ions or drugs, increasing their solubility and distribution in tissues and organs.^{3–5} Furthermore, HSA is the main circulating scavenger of reactive oxygen species (ROS) due to the antioxidant activity conferred by its free sulfhydryl group at Cys₃₄ position and by the metal chelating properties of the N-terminal site of the protein.^{6,7} Like IgG, HSA displays an extraordinary long serum half-life, which in humans amounts to 19–21 days.⁸ This prolonged half-life is due to interaction with the neonatal Fc receptor (FcRn) protecting HSA from degradation via a pH-dependent recycling mechanism with ligand binding at pH 6.0–6.5 and release at pH 7.0–7.4. The mechanism involves endothelial cells lining blood vessels in which FcRn, mainly localized in early/recycling endosomal compartments, encounters proteins continuously internalized by fluid phase endocytosis. The low pH in the endosomes allows FcRn-ligand binding. Then, the FcRn-ligand complex is exported to the cell surface where the higher physiological pH leads to the release of IgG and HSA in the bloodstream while unbound proteins are carried downstream to lysosomes for proteolytic degradation.^{9,10}

However, the knowledge of these two ligands binding to FcRn was delayed in time. Indeed, in 1969, Brambell et al. assumed the presence of a specific Fc receptor to explain the long serum half-life of IgG and their ability to cross the materno-fetal barrier.¹¹ This receptor was finally characterized in 1989 and denominated as FcRn for neonatal Fc receptor.¹² Following this discovery, crystal structures of IgG-FcRn interaction were available in 1994 at low resolution¹³ and later in 2001 at a higher resolution.¹⁴ After that, the impact of Fc post-translational modifications (PTMs) and mutations on FcRn binding was investigated based on rational structure-related assumptions. For instance, oxidation of solvent-exposed methionines of the Fc was shown to decrease FcRn interaction with the consequence of altered pharmacokinetics.^{15,16} In the case of HSA, the first evidence of the albumin-FcRn binding was reported later in 2003 by Chaudhury et al.¹⁷ Crystallographic data were published quite recently, that is, in 2014 for wild type HSA^{9,18} which explains the lack of structure/function relationship data available for this protein. On the other hand, hypoalbuminemia is commonly observed in disease states^{19–21} and is associated with inflammation as the combined result of several factors affecting HSA, that is, the increase in capillary permeability leading to an increase of its distribution volume, diminished liver synthesis rate and altered pharmacokinetics decreasing its half-life.²² Several reports indicate also the change of the PTMs profile of HSA in various

pathologies^{23–27} but the correlation between observed PTMs and HSA half-life is still under intense investigation to better understand disease states leading to hypoalbuminemia.

Recently, several studies successfully developed analytical FcRn affinity chromatography using a pH gradient with conditions closely resembling the pH-dependent recycling mechanism of FcRn.^{28–30} This method was successfully used to distinguish differential FcRn pseudo-affinity of IgG with different Fab domains, oxidized versus native IgG forms or wild type versus mutated forms of the Fc. Schoch et al.¹⁶ demonstrated a linear correlation between FcRn column retention times and *in vivo* half-lives in the case of antibody variants. As well, Schlothauer et al.²⁸ compared wild type and engineered IgGs *in vitro* by FcRn affinity chromatography and *in vivo* by PK studies in huFcRn transgenic mice. Changes in the FcRn chromatographic behavior of mutant IgGs relative to wild type correlated to changes in the PK profile. When combined to mass spectrometric (MS) detection methods, FcRn affinity chromatography is able to observe the impact of individual isoforms over FcRn binding which is very complementary to surface plasmon resonance (SPR) that provides FcRn average affinity of a sample at pH 6.0. In the present study, we took advantage of this methodology to investigate the influence of PTMs from a purified HSA from normal plasma over FcRn interaction. A fraction with a reduced retention time was obtained by FcRn affinity chromatography and characterized by a recently published method based on ion exchange chromatography coupled to native mass spectrometry (MS).³¹ Several modifications decreasing FcRn binding were identified and further confirmed by specific chemical or enzymatic stress treatments and subsequent analyses including FcRn affinity chromatography, MS and SPR. Together these results show the negative impact of pathology-related modifications such as Cys₃₄ oxidation, Lys₅₂₅ glycation and Leu₅₈₅ C-terminal cleavage on FcRn binding and are discussed regarding diseases associated with hypoalbuminemia reported in the literature.

2 | RESULTS

2.1 | FcRn affinity chromatographic profile of HSA

A standard HSA preparation purified from normal plasma was analyzed by FcRn affinity chromatography. A typical chromatographic profile obtained for this HSA preparation is displayed in Figure 1a. The profile presents two peaks eluted at $T_r = 32.2$ min (early peak) and at $T_r = 35.4$ min (late peak) representing 44 and 56% of the total UV area respectively. These two peaks correspond to two subpopulations of the preparation that exhibit a differential

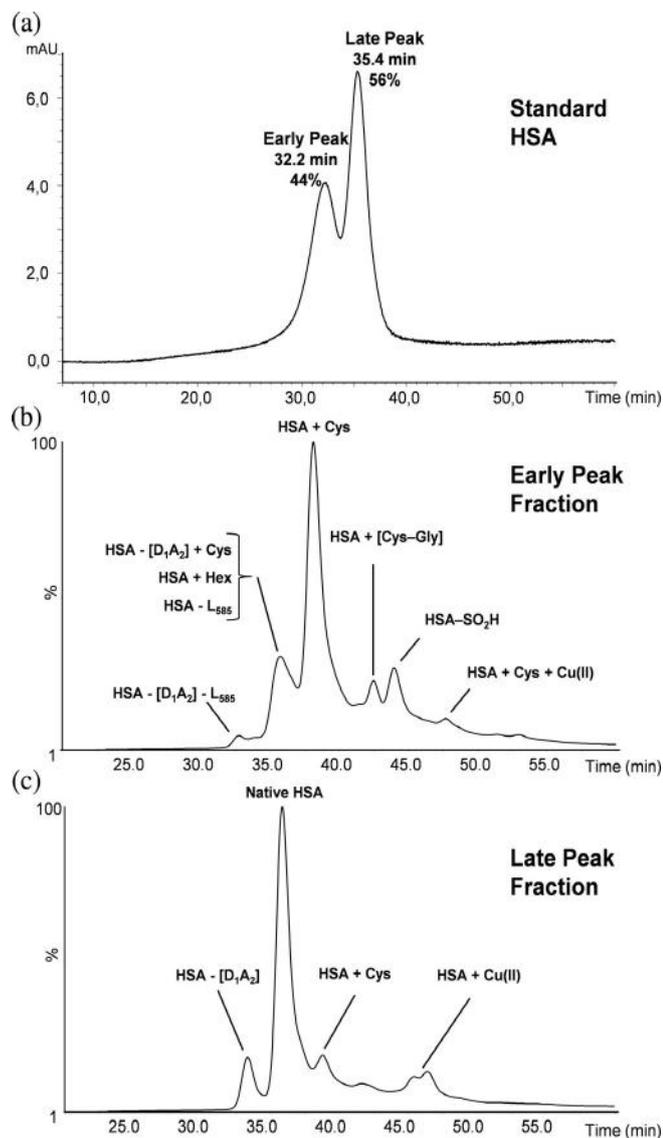


FIGURE 1 FcRn affinity chromatogram of a typical plasma-derived HSA with UV detection at 280 nm (a). IEX-MS extracted chromatograms of early (b) and late peak (c) fractions collected from FcRn chromatography (ion extracted chromatograms from m/z 3,500 to 4,500)

binding behavior toward FcRn. In order to identify the different isoform variants discriminated by FcRn affinity chromatography, these peaks were collected and analyzed by IEX-MS. This methodology was recently reported³¹ and combines advantages of a high separation level with chromatography and on-line identification of the eluted charge variants with the resolutive power of MS.

Figure 1b shows the IEX-MS chromatogram of the early peak fraction (low FcRn binding). The main peak observed corresponds to HSA having a disulfide bridge between Cys₃₄ and a circulating free cysteine (cysteinylated). This variant is an abundant form and usually represents about 25% of total HSA isoforms in normal plasma.³² Two pre-peaks correspond to both N- and C-terminally truncated HSA (after Ala₂ and Gly₅₈₄ positions) for the first eluted one and for the second one to glycosylated HSA, co-eluted with both

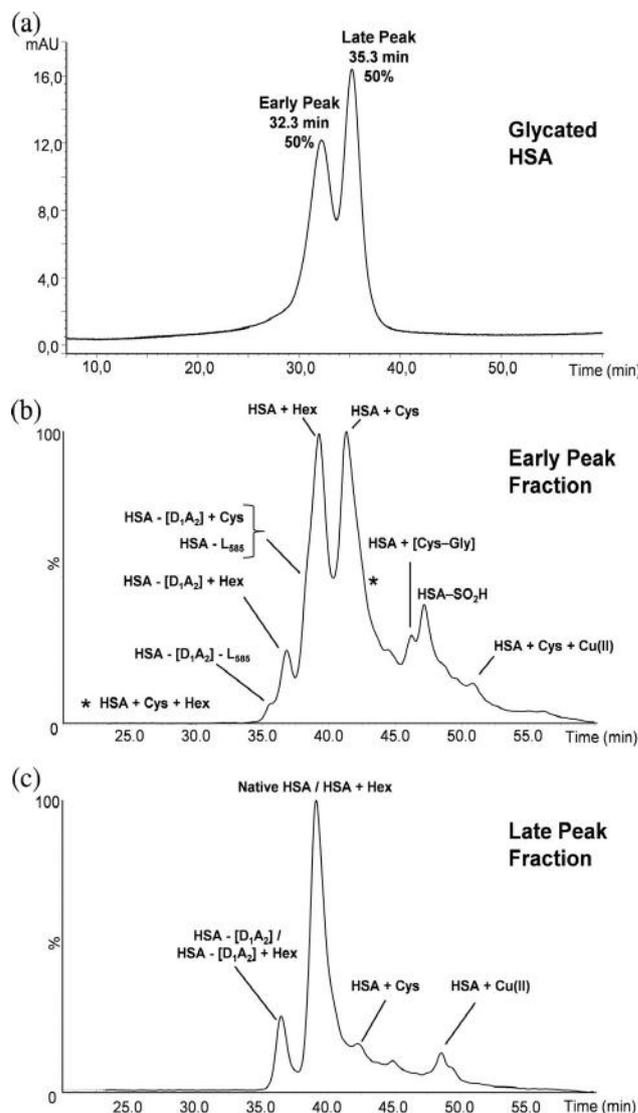


FIGURE 2 FcRn affinity chromatogram of a glycated HSA sample with UV detection at 280 nm (a). IEX-MS extracted chromatograms of early (b) and late peak (c) fractions collected from FcRn chromatography (ion extracted chromatograms from m/z 3,500 to 4,500)

C-terminally cleaved HSA and N-terminally cleaved plus cysteinylated HSA. The two postpeaks correspond to cysteinyl-glycosylated (Cys-Gly) and oxidized (HSA-SO₂H) forms of HSA also involving modifications at Cys₃₄ position

Figure 1c shows the chromatogram of the late peak fraction (high FcRn binding). The main peak was identified as native HSA with a free thiol group at Cys₃₄ which usually represents the most abundant HSA variant in normal plasma. Two other minor peaks are observed, one at the left of the main peak corresponding to N-terminally clipped HSA at Ala₂ position and another at the right of the main peak corresponding to a minor cysteinylated form of HSA. This latter form may be due to contamination of the late peak fraction during the collection of the two peaks from FcRn affinity chromatography. To note, in both panel B and C chromatograms, a late and minor eluted form binding one Cu(II) ion is detected by this method as already reported.³¹

Major information is provided by the IEX-MS analysis of the two collected fractions. First, most of the forms eluted in the low FcRn binding fraction are oxidized at Cys₃₄ position, either reversibly with Cys and Cys-Gly disulfide linked forms or irreversibly as a sulfinic acid. Only two forms with a reduced Cys₃₄ thiol are detected in this fraction, one being glycosylated and the other cleaved C-terminally with the loss of Leu₅₈₅. All these modifications are thought to decrease directly the binding of HSA to FcRn. In full agreement with these results, the high FcRn binding fraction contains mostly HSA forms with a free thiol and no detectable glycosylation nor C-terminally clipped forms. Interestingly, N-terminally clipped forms at Ala₂ position were detected in the high FcRn binding fraction and do not seem per se to reduce the interaction between the two proteins. To note, in addition to isoform mass identification, the charge state distribution of native ESI mass spectra can provide important information related to the protein folding state. In this study, the charge state distribution of all of the observed native mass spectra was similar as already reported by Leblanc et al.³¹ As a consequence, the observed modifications of HSA do not induce significant protein unfolding. All these analyses were reiterated and results confirmed with an aged HSA sample presenting a much higher level of N-terminal truncation as well as Cys₃₄ irreversible oxidation (see Figure S1).

2.2 | Analyses of specific HSA preparations: Impact of glycation, C-terminal truncation, and Cu(II) binding

HSA glycation is a major concern in diabetic patients with hyperglycemia. To evaluate more thoroughly the impact of albumin glycation on FcRn binding, a standard HSA sample submitted in vitro to glycation reactions was produced and analyzed by FcRn affinity chromatography. The resulting chromatogram is displayed in Figure 2a. Early and late peaks were again observed at same retention times as standard HSA but with a slight change of abundances with here 50% of the total UV area for both peaks. The increased abundance of the early peak is attributed to glycation reactions and fractions were collected and analyzed by IEX-MS as described previously. Figure 2b,c displayed resulting chromatograms of early and late peak fractions, respectively. Chromatograms show overall consistent results with the standard preparation except for an increased amount in glycosylated forms in the early fraction and also the detection of minor glycosylated forms in the late fraction, suggesting that glycation impacts FcRn interaction depending on the glycation site. The starting material and the two collected fractions were then analyzed by bottom-up LC-MS/MS using both Glu C and trypsin enzymes to determine the glycation sites of HSA affecting or not the binding to FcRn. Three glycation sites were identified at Lys₁₉₅,

TABLE 1 Relative quantification of glycation sites identified from peptide mapping experiments based on XIC areas of glycosylated versus non glycosylated peptides

Glycation site	Peptide	Glycosylated albumin (%)	Late peak fraction (%)	Early peak fraction (%)
Lys ₁₉₅	[G ₁₈₉ -E ₂₀₈] ³⁺	8	8	6
	[G ₁₈₉ -E ₂₀₈] ⁴⁺	8	8	6
	[L ₁₈₅ -E ₂₀₈] ²⁺	8	18	14
	[L ₁₈₅ -E ₂₀₈] ³⁺	9	19	13
	[L ₁₈₅ -E ₂₀₈] ⁴⁺	8	18	12
	Average glycation rate	8	13	10
Lys ₂₃₃	[V ₂₃₁ -E ₂₄₄] ²⁺	5	3	6
	[V ₂₃₁ -E ₂₄₄] ³⁺	9	5	13
	[V ₂₃₁ -D ₂₃₇] ¹⁺	2	1	4
	[V ₂₃₁ -D ₂₃₇] ²⁺	5	4	9
	Average glycation rate	6	5	8
Lys ₅₂₅	[R ₅₂₁ -E ₅₃₁] ²⁺	31	2	29
	[R ₅₂₁ -E ₅₃₁] ³⁺	33	3	38
	[K ₅₂₅ -K ₅₃₄] ²⁺	40	0	36
	[K ₅₂₅ -K ₅₃₄] ³⁺	31	0	77
	[K ₅₂₅ -K ₅₃₄] ⁴⁺	23	3	49
Average glycation rate	34	1	45	

Note: Data from the different detected peptides and charge states were compiled to give a consistent averaged value.

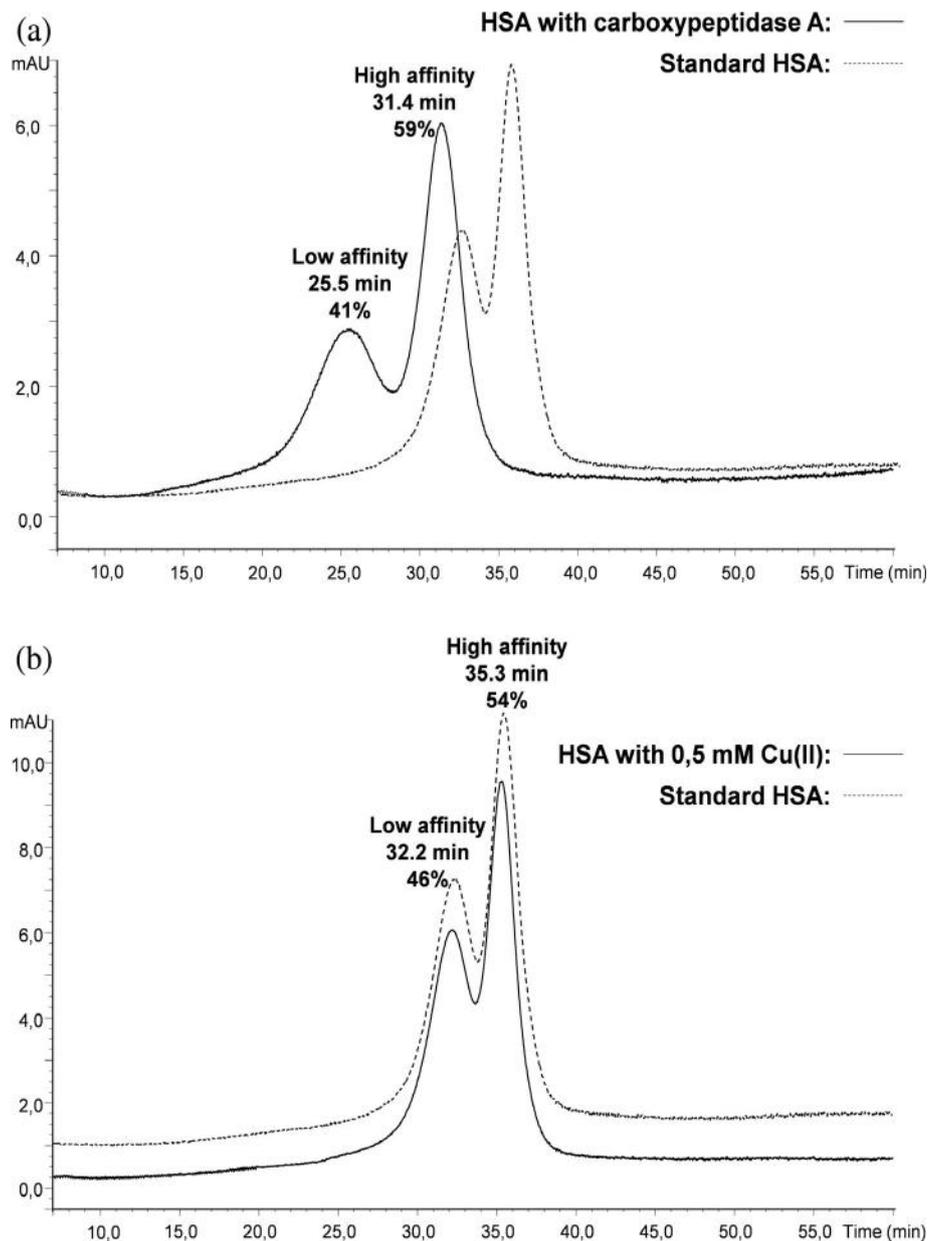


FIGURE 3 FcRn affinity chromatogram of CPA-treated HSA (a), HSA incubated with copper(II) acetate (b) and with UV detection at 280 nm. The dotted traces represent the FcRn affinity chromatogram of a typical plasma-derived albumin

Lys₂₃₃ and Lys₅₂₅ position, Lys₅₂₅ being reported as the principal glycation site of HSA *in vivo*.³³ For each sample, the glycation levels of the three sites were estimated based on MS signals of modified versus nonmodified peptides and are reported in Table 1. Interestingly, results show similar levels of glycation for Lys₁₉₅ and Lys₂₃₃ in the three samples, that is, the starting material and the early and late fractions, suggesting no impact of glycation at these positions on FcRn binding. On the contrary, the glycation level Lys₅₂₅ was very low in the late fraction (1%) while a large amount of glycation was observed in the early one (45%). This result demonstrates the clear impact of glycation at Lys₅₂₅ position on HSA binding properties toward FcRn. This finding is of high importance considering the prevalence of this glycation site *in vivo* as stated above.

The standard HSA preparation contained a minor amount of C-terminally cleaved forms suggested to be due to the proteolytic activity of carboxypeptidase A (CPA).³⁴ These

isoforms were eluted in the early fraction, indicating a lower binding toward FcRn compared to the native intact form. To confirm this result, CPA was used to cleave specifically the last hydrophobic Leu amino acid of HSA and the homogeneity of this new C-terminally cleaved HSA preparation was controlled by IEX-MS (data not shown). The sample was next analyzed by FcRn affinity chromatography and the resulting chromatogram is displayed in Figure 3a with the superposition of the nontreated sample (dotted trace). Interestingly, the CPA-treated HSA sample presents again two peaks but significantly shifted by about 4 min toward lower retention times compared with the chromatographic profile of the nontreated sample. In terms of retention time, the impact of the C-terminal Leu₅₈₅ cleavage was even more important than the oxidized form of Cys₃₄ that were the prevalent forms found in the early peak of the standard HSA preparation. This result strongly demonstrates the first importance of HSA C-terminal truncation on FcRn binding.

Minor peaks of N-terminally cleaved forms, that is, having lost their high affinity Cu(II) ion binding site,⁶ as well as forms binding Cu(II) ions, were previously observed in both early and late fractions of FcRn chromatography affinity of the standard HSA preparation. To complete these results, a sample of standard HSA incubated with copper(II) acetate under conditions known to fully generate HSA-Cu(II) complex³¹ was analyzed by FcRn affinity chromatography. The resulting chromatogram is presented in Figure 3b and shows no differences with the one obtained for the Cu(II) ion-free HSA (dotted trace), indicating no impact of HSA N-terminal chelation of Cu(II) on FcRn binding. This result is also consistent with the observation that N-terminal truncation of HSA does not impact FcRn binding.

2.3 | Determination of FcRn affinity by SPR

Finally, we took advantage of the different sample preparation generated in this study to get additional data with an orthogonal and well-established technique such as SPR. SPR presents the versatility to run association and dissociation experiments especially at the pH of 6.0 that is relevant to mimic the FcRn-HSA high interaction of the recycling mechanism. Also, the method provides both affinity constants in term of K_D (measured in M) and association/dissociation profiles on sensorgrams. Four samples including standard HSA, CPA-treated HSA and early and late fractions produced by FcRn chromatography of the standard preparation were analyzed

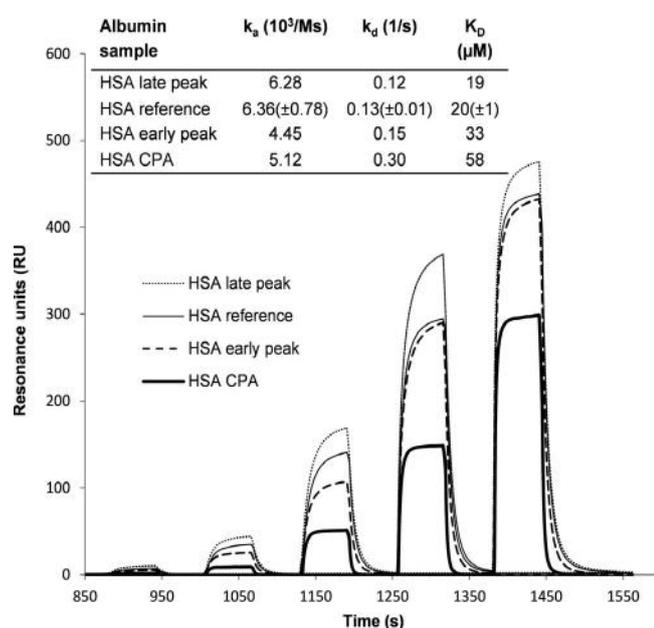


FIGURE 4 SPR sensorgrams showing SCK affinity measurements of HSA digested by CPA (thick line), HSA from FcRn chromatography early (dotted line) and late peak (dashed line), compared to HSA standard (thin line). For each sample, rate association (k_a), rate dissociation (k_d) and dissociation constant ($K_D = k_d/k_a$) are described in the insert table

under the same conditions (see Figure 4). In our repeatability study, the standard HSA sample gave a mean K_D of 20 μ M (SD = 1.0 μ M). The CPA-treated HSA showed a roughly threefold higher K_D of 58 μ M confirming the high importance of the C-terminal Leu₅₈₅ amino acid for the HSA-FcRn interaction. The difference is especially visible in the dissociation phase, that is, the dissociation rate (k_d) is twofold higher for the CPA-treated HSA compared to the untreated sample. Analyses of HSA early and late fractions purified from FcRn affinity chromatography showed also significant differences in affinities with K_D s of 33 μ M and 19 μ M, respectively. As a reminder, the predominant difference between these two fractions was the oxidation status of Cys₃₄ with the free thiol containing fraction giving the highest affinity. To conclude, all these results obtained with a methodology resembling closely the physiological mechanism of association to FcRn at pH 6.0 are in perfect agreement with results obtained by affinity chromatography.

3 | DISCUSSION

FcRn affinity chromatography and MS were used in this study to investigate the impact of individual PTMs of HSA over its FcRn binding in order to provide increased knowledge of expected structural modification and half-life relationships. FcRn affinity chromatography combined to SPR analysis clearly highlighted the negative impact of oxidation/cysteinylation of Cys₃₄, glycation of Lys₅₂₅ and C-terminal cleavage of Leu₅₈₅ on HSA-FcRn binding while N-terminal truncation or other glycation sites did not disturb the interaction.

The different modification sites detected in this study were mapped onto the crystal structure of the complex of human FcRn (green), beta-2-microglobulin (orange), and HSA (red) and displayed in Figure 5. Table 2 summarizes modifications occurring for each modified site, their impact on HSA-FcRn interaction and distances to the closest FcRn amino acid involved in the interaction interface between the two proteins. Among all the PTMs observed in this study, Cys₃₄, Lys₅₂₅, and Leu₅₈₅ modifications sites are within 15 Å (C α -C α) from the closest FcRn amino acid involved in the interaction interface while the other PTMs are more distant. The localization of these residues on the HSA structure, that is, their proximity to the interaction site, supports results obtained by FcRn affinity chromatography and SPR concerning their negative impact on HSA-FcRn binding when modified.

Cys₃₄ oxidation of HSA has been reported in various diseases or pathophysiological conditions involving oxidative stress.³⁵ For instance, cysteinylation of Cys₃₄ was widely reported in cirrhosis liver disease and used as an efficient prognostic indicator of disease severity.^{24,26,36} Furthermore, oxidative stress was often described in cases of hypoalbuminemia.^{21,37} In

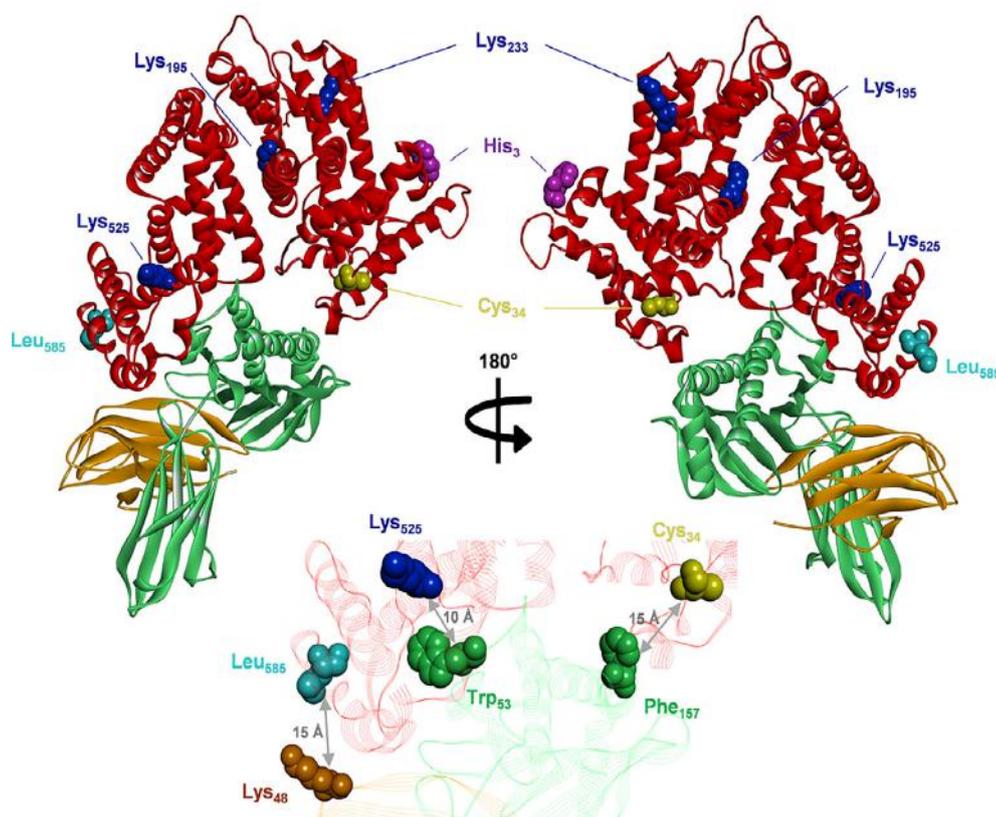


FIGURE 5 Crystal structure of the complex of human FcRn (green), beta-2-microglobulin (orange) and albumin (red) (PDB entry 4N0F) visualized using BIOVIA Discovery Studio (1). The N-terminus indicated by His₃ is depicted in magenta, the C-terminal Leu₅₈₅ in cyan, Cys₃₄ in yellow, and Lys 525, 195, and 233 from bottom-up are depicted in blue. The zoom to the interaction interface shows the FcRn/beta-2-microglobulin residues closest to C-terminal Leu₅₈₅, Cys₃₄, and Lys 525

TABLE 2 Summary of modifications occurring for each residue, their impact on HSA-FcRn interaction and distances to FcRn*/beta-2-microglobulin** interaction area

HSA residues	C α -C α distances to receptor residues	Modifications	Impact on HSA-FcRn interaction
His ₃	40 Å (*Lys ₁₄₆)	Truncation Cu(II) adduct	No No
Cys ₃₄	15 Å (*Phe ₁₅₇)	Oxidation Cysteinylation Cysteinyglycinylation	Yes Yes Yes
Lys ₁₉₅	21 Å (*Ser ₅₈)	Glycation	No
Lys ₂₃₃	40 Å (*Trp ₅₉)	Glycation	No
Lys ₅₂₅	10 Å (*Trp ₅₃)	Glycation	Yes
Leu ₅₈₅	15 Å (**Lys ₄₈)	Truncation	Yes

a review, Soeters et al.²² associated hypoalbuminemia with inflammation, that increases capillary permeability and HSA distribution in the extracellular fluid compartment thereby contributing as a factor to the decrease of plasma circulating HSA. Other factors explaining hypoalbuminemia were evaluated and because the synthesis rate of HSA was not decreased and no sign of inflammation observed in most of the disease states in which it has been measured, the possibility of a shorter half-life of HSA in stressed conditions was assumed. Supporting this assumption, results obtained

with an oxidized HSA preparation using chloramine-T demonstrated a rapid clearance in mice compared to normal HAS.³⁸ In another study, Petersen et al.³⁹ conjugated a range of polyethylene glycol polymers with defined molecular weight to the thiol of Cys₃₄ of recombinant albumin; they found an altered binding to FcRn for each conjugated polymer. But considering the size of these conjugated molecules ranging from 5 to 30 kDa, strong steric hindrance impairing FcRn binding is not necessarily surprising. Our results demonstrate that the specific oxidation of Cys₃₄,

either reversibly with Cys and Cys-Gly disulfide linkage or irreversibly as a sulfinic acid, altered the FcRn binding with consequences of an impaired FcRn recycling mechanism and a probably reduced HSA half-life.⁴⁰

C-terminal truncated forms of HSA were reported in 2000 in the plasma of a patient having chronic pancreatic pseudocyst.⁴¹ The major truncated detected form had lost only the C-terminal Leu₅₈₅ amino acid and the truncation was suggested to be the result of exposure of HSA to “leaking” pancreatic endo and exoproteases. Later, Bar-Or et al.⁴² reported the case of a young patient critically injured in a vehicle accident. The patient presented hypoalbuminemia and MS analysis of plasma HSA during days following admission showed the significant presence of C-terminal Leu₅₈₅ deletion concomitant with measured CPA plasma activities. The C-terminally truncated form of HSA displayed all the more a reduced half-life estimated at <80 hr. They suggested that the increased CPA activity was the contributing factor explaining the hypoalbuminemia state via an unknown mechanism involving the C-terminal Leu₅₈₅ cleavage. The reduced half-life of C-terminally altered chain-length alloalbumins was then confirmed in mice⁴³ and a C-terminal truncated Des-Leu peptide of HSA was finally proposed as a promising biomarker for chronic pancreatitis.³⁴ Unlike mutagenesis experiments or FcRn-HSA crystallographic data,^{9,10,18} our results highlight the probable relationship between hypoalbuminemia observed in chronic pancreatitis or critical states involving uncommon plasma proteolytic activities and C-terminally truncated HSA isoforms with lower FcRn binding affinities.

Glycation reactions are well known to occur in diabetes mellitus diseases because of elevated blood sugar levels. As the most abundant protein of the plasma, HSA is first in line to undergo glycation reaction and may be used as a glycemic control indicator.⁴⁴ Modifications of basic residues via the formation of Amadori products is strongly suggested to affect the tertiary structure conformation of the protein as probed by tryptophan fluorescence.⁴⁵ *in vitro* modified rat and human albumin incubated at 37°C for 21 days in an excess presence of glucose and methylglyoxal showed a reduced binding toward FcRn attributed to significant structural changes using small angle X-ray scattering.²⁷ Lys₅₂₅ has constantly been found to be a major glycation site of HSA both *in vivo* and *in vitro*.^{33,46} This position is very close to highly conserved His₅₁₀ and His₅₃₅ amino acids strongly involved in HSA-FcRn binding at low pH⁹; thus it is conceivable that glycation at Lys₅₂₅ alters locally the conformation of HSA in a way that impairs its FcRn interaction. A similar assumption was made with the detection of a double Thr₅₄₀ and Ala₅₄₆ mutant of HSA in a patient having an unusually low level of circulating HAS.⁴⁷ The evidence of reduced FcRn binding of Lys₅₂₅-glycated HSA isoform as shown by FcRn affinity chromatography and MS confirms

these assumptions and might shed light on cases of diabetes conditions concomitant with hypoalbuminemia.

Finally, this study presented an analytical methodology based on FcRn affinity chromatography and MS that was successfully used to resolve the relationship between important PTMs of HSA and its FcRn interaction that mediates ultimately its expected half-life. Our *in vitro* results highlighted the importance of several PTMs often related to pathophysiological conditions and paves the way toward new understandings of HSA structure/function relationships. *in vivo* studies should be needed in the future to gauge and compare to which extent HSA half-life is decreased according to a given decrease of FcRn affinity for a better comprehension of the HSA-FcRn mediated recycling mechanism and the physiological relevance of some PTMs. This approach could also be advantageously used to resolve other reported cases of hypoalbuminemia involving mutations for instance^{48,49} and all of these results should be considered carefully for the establishment of critical quality attributes of commercial HSA preparations.

4 | MATERIALS AND METHODS

4.1 | Materials

HSA samples were internally produced from normal pooled human plasma using the *Cohn* method⁵⁰ that separates plasma proteins by sequential precipitations using increasing concentrations of cold ethanol and decreasing pH values. HSA was recovered in Fraction IV and further processed for higher purity and viral security by filtration and pasteurization. A standard and an aged HSA sample stored at 5°C during 5 years at pH 7.1 were used for this study. Glu C endoprotease was obtained from Roche (Mannheim, Germany). Acetonitrile (MeCN) was HPLC reagent grade and purchased from JT Baker (Philipsburg, NJ). NSB reducer was obtained from GE Healthcare (Chicago, IL). Ammonium acetate for MS, glucose, copper(II) acetate, carboxypeptidase A (CPA) from bovine pancreas, Tween 20, dithiothreitol (DTT), formic acid (FA), iodoacetamide (IAM), sodium phosphate, and sodium chloride were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Trypsin Gold MS grade was purchased from Promega (Madison). Biotinylated human FcRn was purchased from AcroBiosystem (Newark, DE). All the aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (18.2 MΩ cm resistivity at 25°C, total organic carbon [TOC] < 5 ppb).

4.2 | Reaction of HSA with glucose

The chemical reaction of glucose with HSA was carried out by adding 25 μl of a solution of HSA 20% in 475 μl of a solution of glucose 10%. The preparation was incubated at

37°C overnight. The reaction was stopped by freezing the solution at -80°C.

4.3 | Digestion of HSA with carboxypeptidase A

The enzymatic cleavage of the C-terminal amino acid of HSA with carboxypeptidase A was performed by incubating 500 µg of HSA diluted at 20 g/l in 20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (pH 7) with 1% of bovine pancreas carboxypeptidase A (w/w) for 2 hr at 37°C. The reaction was stopped by freezing the solution at -80°C.

4.4 | FcRn affinity chromatography

The analysis of HSA by FcRn affinity chromatography was carried out using an Ultimate 3,000 HPLC system (ThermoFischer, Manchester, UK) with a FcRn affinity column (4.6 × 50 mm) from Roche Custom Biotech (Mannheim, Germany; cat. no. 08128057001). Biotinylated recombinant human FcRn are immobilized to a Streptavidin Sepharose matrix and packed into an FPLC column. The column was operated at a flow rate of 0.5 ml/min and the mobile phases consisted of 20 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 140 mM NaCl buffer at pH 5.3 (buffer A) and 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane pH 8.8, 140 mM NaCl (buffer B). Fifty micrograms of protein was loaded onto the column, after an isocratic elution at 5% B for 5 min, a linear gradient was applied from 5 to 100% of B in 60 min. The column was then washed for 5 min at 100% of B and further equilibrated for 14 min at 5%. Elution was monitored by UV absorbance at 280 nm.

4.5 | Ion exchange chromatography

Separation of HSA charge variants was performed with an Acquity System (Waters, Milford, MA) coupled to an UV detector and an electrospray mass spectrometer (Synapt G2S, Waters, Milford, MA). The MS compatible mobile phases used for IEX were 50 mM ammonium acetate at pH 7.4 (buffer A) and 500 mM ammonium acetate pH 7.4 (buffer B). Around 10 µg of sample were injected on a Proteomix SAX-NP5 2.1 mm × 150 mm column (Sepax Technologies, Newark, MA) equilibrated at 30°C and operated at a flow rate of 0.2 ml/min. After an isocratic elution at 5% of B for 5 min, a linear gradient was applied from 5 to 33% of B in 55 min. The column was then washed for 5 min at 85% of B and further equilibrated during 15 min at 5% of B. The mass spectrometer was operated in the positive resolution mode and data were recorded from *m/z* 500 to 6,500. Source parameters were optimized to get the best transmission and desolvation of ions. Source and desolvation

temperature were set at 80 and 200°C, respectively. The cone voltage was at 130 V. Mass spectra were deconvoluted manually using the MassLynx software and taking into account the three to five most intense charge states (5% intensity cutoff) depending on mass spectra.

4.6 | Peptide mapping

The protein (200 µg) was vacuum-dried and dissolved in 25 µl of 8 M urea, 0.2 M ammonium acetate solution pH 7.2. The reduction was accomplished by adding 10 µl of 85 mM DTT solution in water and incubating the resulting mixture for 15 min at 50°C. After cooling at room temperature, 10 µl of a 170 mM IAM solution in water were added and the solution was incubated at RT for 15 min in the dark. In the case of the experiment in nonreducing condition, the process is similar but DTT and IAM solutions were replaced by water.

After a fourfold dilution with water, digestion with trypsin or Glu C (1:10, w/w) was performed overnight at 37°C (final pH of 6.9 after dilution). Peptides obtained after digestion (40 µg) were injected on a CSH C18 column (2.1 × 150 mm, 1.7 µm) using an ACQUITY UPLC system interfaced with a SYNAPT G2-S HDMS mass spectrometer (Waters, Milford, MA). The column was equilibrated at 60°C and operated at a flow rate of 300 µl/min. An aqueous solution containing 0.1% FA and MeCN containing 0.1% FA were respectively used as buffer A and buffer B, proteins were eluted by using a gradient of buffer B. The mass spectrometer was operated in the positive mode, at a 20,000 FWHM resolution, using a capillary voltage of 3 kV, a source block temperature of 80°C and a desolvation temperature of 150°C. MS data were recorded from *m/z* 200 to 2,000 and MS/MS data were acquired with the instrument operating in the data-dependent mode. Data were analyzed with the Peaks Studio 8.5 software with a parent mass error tolerance of 25 ppm, a fragment mass error tolerance of 0.1 Da and a FDR of 5%. All putative MPTs were considered as variable modifications while carbamidomethylation was the only one to be fixed.

4.7 | SPR analysis

A Biacore T200 (GE Healthcare, Chicago, IL) was used with a CAP chip. Biotin CAPture kit was applied as described by the manufacturer. Biotinylated hFcRn was reversibly captured (~500 resonance units (RU)) on CAP reagent by injecting 1 µg/ml in phosphate buffer pH 7.4 (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) with 0.5% BSA at 10 µl/min. Phosphate buffer at pH 6.0 and with 10% NSB reducer (GE Healthcare, Chicago, IL) were used as run and dilution buffer, respectively. Kinetics measurements were performed by injecting serial dilutions of HSA (0.3–80 µM) in single cycle kinetic mode (SCK) at 25°C

with a flow rate of 25 $\mu\text{l}/\text{min}$. To correct for nonspecific binding and bulk effects, responses obtained from the reference flowcell and blank injections were subtracted from each interaction curve. Kinetic parameters and affinities were calculated using the Langmuir 1:1 ligand model provided by the Biacore T200 evaluation software 3.0. The uniqueness value (u -value) of the kinetic rate constant was lower or equivalent to 3 in all kinetic measurements. Because of the limited amount of FcRn affinity chromatography collected samples, the variability of the method was estimated using standard HSA repeatability assessed in five independent assays.

CONFLICT OF INTEREST

All authors are employees of LFB Biotechnologies, subsidiary of LFB SA group commercializing the human albumin product Vialebex.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y.L. and G.C. conceived and designed the study. Y.L. and M.B. performed the experiments and data analysis. Y.L., M.B., A.S., and G.C. wrote the manuscript. N.B. discussed the results and commented to the draft. All authors reviewed the manuscript.

ORCID

Guillaume Chevreux  <https://orcid.org/0000-0003-3452-2125>

REFERENCES

- Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, Bartolini M, Caraceni P. Structural and functional integrity of human serum albumin: Analytical approaches and clinical relevance in patients with liver cirrhosis. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;144:138–153.
- Fernandez J, Montegudo J, Bargallo X, et al. A randomized unblinded pilot study comparing albumin versus hydroxyethyl starch in spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*. 2005;42:627–634.
- Fasano M, Curry S, Terreno E, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 2005;57:787–796.
- Kragh-Hansen U. Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin-ligand complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:5535–5544.
- Kragh-Hansen U, Chuang VT, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:695–704.
- Bal W, Sokolowska M, Kurowska E, Faller P. Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:5444–5455.
- Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:244–253.
- Sand KM, Bern M, Nilsen J, Noordzij HT, Sandlie I, Andersen JT. Unraveling the interaction between FcRn and albumin: Opportunities for design of albumin-based therapeutics. *Front Immunol*. 2014;5:682.
- Andersen JT, Dalhus B, Cameron J, et al. Structure-based mutagenesis reveals the albumin-binding site of the neonatal Fc receptor. *Nat Commun*. 2012;3:610.
- Andersen JT, Dee Qian J, Sandlie I. The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptor heavy chain is critical for the pH-dependent binding to albumin. *Eur J Immunol*. 2006;36:3044–3051.
- Brambell FW, Hemmings WA, Morris IG. A theoretical model of gamma-globulin catabolism. *Nature*. 1964;203:1352–1354.
- Simister NE, Mostov KE. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*. 1989;337:184–187.
- Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature*. 1994;372:379–383.
- Martin WL, West AP Jr, Gan L, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: Mechanism of pH-dependent binding. *Mol Cell*. 2001;7:867–877.
- Pan H, Chen K, Chu L, Kinderman F, Apostol I, Huang G. Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn. *Protein Sci*. 2009;18:424–433.
- Schoch A, Kettenberger H, Mundigl O, et al. Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:5997–6002.
- Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, et al. The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med*. 2003;197:315–322.
- Oganesyan V, Damschroder MM, Cook KE, et al. Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J Biol Chem*. 2014;289:7812–7824.
- Fearon KC, Falconer JS, Slater C, McMillan DC, Ross JA, Preston T. Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response. *Ann Surg*. 1998;227:249–254.
- Li S, Zhang Y, Li M, Xie C, Wu H. Serum albumin, a good indicator of persistent organ failure in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol*. 2017;17:86.
- Magzal F, Sela S, Szuchman-Sapir A, Tamir S, Michelis R, Kristal B. In-vivo oxidized albumin—a pro-inflammatory agent in hypoalbuminemia. *PLoS One*. 2017;12:e0177799.
- Soeters PB, Wolfe RR, Shenkin A. Hypoalbuminemia: Pathogenesis and clinical significance. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2019;43:181–193.
- Naldi M, Baldassarre M, Domenicali M, et al. Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;122:141–147.
- Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, et al. Cys34-cysteinylation of human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. 2014;9:e85216.
- Arroyo V, Garcia-Martinez R, Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J Hepatol*. 2014;61:396–407.

26. Oetli K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol.* 2013;59:978–983.
27. Wagner MC, Myslinski J, Pratap S, et al. Mechanism of increased clearance of glycated albumin by proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;310:F1089–F1102.
28. Schlothauer T, Rueger P, Stracke JO, et al. Analytical FcRn affinity chromatography for functional characterization of monoclonal antibodies. *MAbs.* 2013;5:576–586.
29. Stracke J, Emrich T, Rueger P, et al. A novel approach to investigate the effect of methionine oxidation on pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies. *MAbs.* 2014;6:1229–1242.
30. Gahoual R, Heidenreich AK, Somsen GW, et al. Detailed characterization of monoclonal antibody receptor interaction using affinity liquid chromatography hyphenated to native mass spectrometry. *Anal Chem.* 2017;89:5404–5412.
31. Leblanc Y, Bihoreau N, Chevreaux G. Characterization of human serum albumin isoforms by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018;1095:87–93.
32. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Gardner DK, Slone DS, Craun ML. Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use. *Crit Care Med.* 2005;33:1638–1641.
33. Garlick RL, Mazer JS. The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. *J Biol Chem.* 1983;258:6142–6146.
34. Ireland RD, Brennan SO, Gerrard JA, Walmsley TA, George PM, King RI. A mass-spectroscopic method for measuring des-Leu albumin—A novel marker for chronic pancreatitis. *Clin Biochem.* 2012;45:1664–1668.
35. Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Redox albuminomics: Oxidized albumin in human diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17:1515–1527.
36. Domenicali M, Baldassarre M, Giannone FA, et al. Posttranscriptional changes of serum albumin: Clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. *Hepatology.* 2014;60:1851–1860.
37. Hassan K, Kristal B, Hassan F, Abo Saleh S, Michelis R. The impact of oxidized serum albumin on the oncotic pressure and hydration status of peritoneal dialysis patients. *Ther Clin Risk Manag.* 2016;12:463–469.
38. Iwao Y, Anraku M, Hiraike M, et al. The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP). *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21:140–146.
39. Petersen SS, Klaning E, Ebbesen MF, et al. Neonatal Fc receptor binding tolerance toward the covalent conjugation of payloads to cysteine 34 of human albumin variants. *Mol Pharm.* 2016;13:677–682.
40. Schmidt EGW, Hvam ML, Antunes F, et al. Direct demonstration of a neonatal Fc receptor (FcRn)-driven endosomal sorting pathway for cellular recycling of albumin. *J Biol Chem.* 2017;292:13312–13322.
41. Brennan SO, George PM. Three truncated forms of serum albumin associated with pancreatic pseudocyst. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1481:337–343.
42. Bar-Or D, Rael LT, Bar-Or R, Slone DS, Craun ML. The formation and rapid clearance of a truncated albumin species in a critically ill patient. *Clin Chim Acta.* 2006;365:346–349.
43. Iwao Y, Hiraike M, Kragh-Hansen U, et al. Altered chain-length and glycosylation modify the pharmacokinetics of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794:634–641.
44. Roohk HV, Zaidi AR. A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes. *J Diabetes Sci Technol.* 2008;2:1114–1121.
45. Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie.* 2011;93:645–658.
46. Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, et al. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta.* 2013;425:64–76.
47. Brennan SO, Potter HC, Sheen CR, George PM. Unique albumin with two silent substitutions (540Thr→Ala and 546Ala→Ser): Insights into how albumin is recycled. *Clin Chim Acta.* 2016;457:125–129.
48. Zemlin AE, Burgess LJ, Engelbrecht A. Two cases of severe hypoalbuminemia (<10 g/L). *Nutrition.* 2009;25:1006–1010.
49. Kragh-Hansen U, Minchiotti L, Galliano M, Peters T Jr. Human serum albumin isoforms: Genetic and molecular aspects and functional consequences. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830:5405–5417.
50. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, et al. Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc.* 1946;68:459–475.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Leblanc Y, Berger M, Seifert A, Bihoreau N, Chevreaux G. Human serum albumin presents isoform variants with altered neonatal Fc receptor interactions. *Protein Science.* 2019;28:1982–1992. <https://doi.org/10.1002/pro.3733>

3. Etude de l'impact du clivage des lysines en position C-terminale d'un anticorps monoclonal sur son interaction aux récepteurs FcγRIII et FcRn

I. Résumé de l'article

Les anticorps monoclonaux constituent l'une des principales classes de protéines thérapeutiques et sont utilisés pour le traitement d'une large gamme de pathologies telles que les maladies infectieuses, les cancers ou les maladies auto-immunes. Ces protéines sont composées de deux régions, la partie variable (Fab) participant à la reconnaissance de l'antigène et la partie constante (Fc) étant responsable d'importantes fonctions biologiques parmi lesquelles le recyclage de la protéine par le récepteur néonatal Fc (FcRn) et les fonctions effectrices d'immunité. Les fonctions effectrices sont déclenchées via l'interaction de la partie Fc avec la protéine C1q, pour l'activation du complément (CDC : Complement-dependent cytotoxicity), et/ou via les récepteurs Fc gamma (FcγR) exprimés à la surface des cellules effectrices d'immunité (macrophages et lymphocytes Natural Killer). Les anticorps sont susceptibles de subir un grand nombre de modifications post-traductionnelles dont les plus communes sont l'oxydation, la N-glycosylation ou la déamidation. Parmi celles-ci, l'hétérogénéité de lysine en position C-terminale des chaînes lourdes d'anticorps thérapeutiques est très souvent observée. Les anticorps monoclonaux recombinants sont synthétisés avec une lysine à l'extrémité C-terminale sur chaque chaîne lourde, et le clivage partiel de ces résidus par les carboxypeptidases présentes dans le milieu de culture peut être à l'origine d'une hétérogénéité de la protéine. Si cette hétérogénéité C-terminale reflète la robustesse et l'uniformité de fabrication du produit biopharmaceutique, il y a cependant peu de données scientifiques concernant l'impact pharmacologique de cette modification, et les résultats des études existantes sont parfois contradictoires. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact de l'hétérogénéité de lysine C-terminale sur l'activité biologique d'un anticorps monoclonal (IgG1) impliqué dans la phagocytose (ADCP : Antibody-dependent cellular phagocytosis) en relation avec son interaction avec le récepteur FcγRIIIa. Les protéoformes correspondant à l'anticorps avec deux (K2), une (K1) ou aucune (K0) lysine C-terminale ont été séparées et collectées par chromatographie d'échange d'ions (IEX). Ces fractions ont subi une caractérisation structurale complète par chromatographie liquide et spectrométrie de masse

(particulièrement concernant la N-glycosylation connue pour son impact sur l'interaction au FcγRIIIa), puis leur affinité aux récepteurs FcγRIIIa et FcRn ont été évaluées par chromatographie d'affinité. Enfin, la résonance plasmonique de surface (SPR) a été utilisée comme approche orthogonale pour mieux estimer l'affinité des trois fractions K0, K1 et K2 vis-à-vis du récepteur FcγRIIIa.

Purification par IEX préparative des fractions K0, K1 et K2 et caractérisation par RP-LC/MS

La première étape de cette étude a consisté à purifier par IEX préparative les protéoformes de l'anticorps présentant zéro (K0), une (K1) ou deux (K2) lysines C-terminales puis de s'assurer du niveau de pureté de ces fractions par IEX analytique (>90%). Une caractérisation structurale approfondie des fractions a ensuite été effectuée. L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique des trois fractions montre des taux de monomères supérieurs à 97% et de faibles taux d'oligomères et de fragments. Pour évaluer des modifications telles que l'oxydation ou le taux de lysine C-terminale, une méthode RP-LC/MS associée à une approche middle-up utilisant l'IdeS a été utilisée pour analyser les trois fractions. La digestion à l'IdeS suivi d'une réduction des ponts disulfures permet d'analyser la chaîne légère (LC), et les parties constante (Fc/2) et variable (Fd) de la chaîne lourde de l'anticorps. Les profils chromatographiques obtenus pour les trois fractions sont identiques concernant les fragments LC et Fd où respectivement 5% et 12% d'oxydation ont été observés. Les fractions K0, K1 et K2 ne diffèrent qu'au niveau de la zone d'élution de la partie Fc/2, en raison des différents taux de lysine C-terminale de ces fractions, mais présentent des taux d'oxydation et de clivages comparables. Les analyses RP-LC/MS suggèrent l'existence de caractéristiques structurales similaires entre les trois fractions à l'exception du taux de lysine C-terminale.

Caractérisation des fractions par IEX-MS

Une modification chimique susceptible d'intervenir au cours des étapes de purification et de concentration des fractions est la déamidation. Cette modification se caractérise par une modification de la charge nette de la protéine, c'est la raison pour laquelle les fractions ont été analysées par IEX-MS. Pour une meilleure détection des formes déamidées, la méthode IEX-MS a été associée à une approche middle-up consistant à digérer l'anticorps avec l'IdeS pour

former des fragments $(Fc/2)_2$ et $F(ab')_2$. Comme attendu, les profils IEX-MS des fractions diffèrent essentiellement au niveau du fragment $(Fc/2)_2$ puisque c'est cette partie de l'anticorps qui porte l'hétérogénéité liée à la lysine C-terminale. Ainsi, les pics $(Fc/2)_2$ majoritaires observés pour chaque fraction correspondent aux espèces K0, K1 et K2. Les espèces acides et basiques des fragments $(Fc/2)_2$ de chaque fraction sont comparables, avec notamment 12% de formes acides correspondant principalement à une déamidation et 15% de formes basiques correspondant à une oxydation. Les profils IEX des fragments $F(ab')_2$ des trois fractions sont comparables, avec la présence de formes oxydées dans les formes acides et d'une forme partiellement réduite dans un pic basique de la fraction K2. Les résultats IEX-MS sont cohérents avec ceux obtenus en RP-LC/MS et démontrent une homogénéité structurale des trois fractions (à l'exception du taux de lysine C-terminale).

Caractérisation du profil N-glycannique des fractions par HILIC

Enfin, les profils de N-glycosylation des fractions ont été déterminés par chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC : Hydrophilic interaction liquid chromatography) après déglycosylation des échantillons puis purification et marquage des N-glycanes au 2-aminobenzamide (2-AB). Cette étape de caractérisation de la N-glycosylation est primordiale pour l'évaluation de l'homogénéité structurale des fractions puisque certaines structures N-glycanniques telles que la galactosylation, la sialylation et surtout la fucosylation ont un impact sur l'interaction entre la partie Fc de l'anticorps et le récepteur FcγRIIIa. Les N-glycanes détectés sont essentiellement de type complexe ($\approx 99\%$) et principalement composés de structures bi-antennées, non-fucosylées et agalactosylées. Les taux des différentes structures N-glycanniques ont été déterminés par intégration des pics chromatographiques et les légères variations de structures N-glycanniques observées entre les fractions ne sont pas considérées comme significatives au regard de la reproductibilité de la méthode analytique.

Les trois fractions ont démontré une très forte homogénéité structurale, hormis le taux de lysine C-terminale dont nous cherchons à déterminer l'impact biologique. Cette homogénéité structurale des fractions est indispensable pour fournir des résultats d'activité fonctionnelle fiables au regard de l'interaction des protéoformes K0, K1 et K2 avec les récepteurs FcγRIIIa et FcRn.

Analyse des fractions par SPR et chromatographie d'affinité au récepteur Fc γ RIIIa

L'interaction des protéoformes K0, K1 et K2 avec le récepteur Fc γ RIIIa a d'abord été étudiée par chromatographie d'affinité. L'analyse des fractions K0, K1 et K2 par chromatographie d'affinité au récepteur Fc γ RIIIa montre des profils très similaires pour chacune des fractions avec une très forte comparabilité en termes de temps de rétention. Ces profils sont composés de trois pics qui ont pu être caractérisés par des analyses middle-up RP-LC/MS après collecte. Ces pics correspondent, dans l'ordre d'élution, aux glyco-formes de la partie Fc avec deux, un ou zéro fucose proximal sur les N-glycanes. Ces résultats sont cohérents avec l'effet négatif connu de la fucosylation proximale des N-glycanes de la partie Fc vis-à-vis de l'affinité au récepteur Fc γ RIIIa (ie. une affinité plus faible des glycoformes bifucosylées d'IgG1). Si l'analyse des fractions K0, K1 et K2 par chromatographie d'affinité Fc γ RIIIa a permis de montrer l'impact significatif de la N-glycosylation de la partie Fc sur l'affinité au Fc γ RIIIa, aucun effet du clivage des lysines en position C-terminale des chaînes lourdes n'a pu être démontré.

L'affinité de K0, K1 et K2 pour le récepteur Fc γ RIIIa a également été mesurée par résonance plasmonique de surface (SPR). Les résultats montrent que les trois échantillons présentent des phases d'association et de dissociation similaires, avec les constantes de dissociation (K_d) comparables avec des valeurs de $2,8 \pm 0,2 \times 10^{-9}$ M pour K2 à $3,0 \pm 0,7 \times 10^{-9}$ M pour K0. Les données obtenues par SPR ne montrent donc pas de différences significatives d'affinité vis-à-vis du récepteur Fc γ RIIIa entre les protéoformes K0, K1 et K2.

Analyse des fractions par chromatographie d'affinité au récepteur FcRn

Le récepteur néonatal Fc (FcRn) est un autre important récepteur impactant la pharmacocinétique (PK) des IgG. L'affinité des protéoformes K0, K1 et K2 vis-à-vis de ce récepteur a également été étudiée par chromatographie d'affinité. Les chromatogrammes obtenus pour les trois fractions sont parfaitement superposables et se caractérisent par un pic majoritaire précédé d'un pré-pic mineur représentant respectivement 94% et 6% de l'aire totale du chromatogramme. Le pré-pic (correspondant à l'épaulement avant le pic principal) représentant 5-6% des échantillons correspond à des formes oxydées de la partie Fc, connues pour avoir une affinité plus faible vis-à-vis du récepteur FcRn. Comme pour Fc γ RIIIa, le clivage de lysines C-terminales n'impacte pas significativement l'affinité au récepteur FcRn. Des

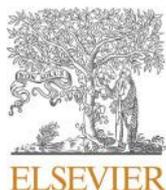
analyses SPR ont été menées pour déterminer des constantes de dissociation des fractions K0, K1 et K2 vis-à-vis du récepteur FcRn. Cependant, les résultats n'ont pu être exploités en raison d'interactions non-spécifiques entre les échantillons et la « sensor chip » sur laquelle est immobilisé le récepteur, empêchant l'interprétation des résultats.

Dans cette étude, nous avons cherché à établir l'impact du clivage des lysines en position C-terminale d'un anticorps sur son activité pharmacologique. Après purification par IEX préparative, les protéoformes d'IgG avec zéro (K0), une (K1) et deux (K2) lysines en position C-terminales des chaînes lourdes ont été analysées par chromatographie d'affinité aux récepteurs FcγRIIIa et FcRn. Ces analyses n'ont révélé aucune différence d'affinité des trois protéoformes vis-à-vis de ces récepteurs. Ces résultats ont été confirmés par résonance plasmonique de surface pour le récepteur FcγRIIIa. La caractérisation structurale approfondie des trois fractions a permis de s'assurer de leur homogénéité (en dehors du taux de lysine C-terminale) et écarter tout biais lors des analyses d'activité biologique. En conséquence, l'hétérogénéité en lysine C-terminale d'un anticorps thérapeutique ne peut être considérée comme un attribut critique de qualité (CQA). Enfin, cette étude souligne l'intérêt des méthodes de chromatographie d'affinité pour l'étude de la relation structure-fonction de protéines thérapeutiques.

II. Publication

Cette étude a été publiée dans *European journal of pharmaceutical sciences* :

V. Faid, Y. Leblanc, M. Berger, A. Seifert, N. Bihoreau, G. Chevreux, C-terminal lysine clipping of IgG1: impact on binding to human Fc γ RIIIa and neonatal Fc receptors, European Journal of Pharmaceutical Sciences. 159 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105730>.



C-terminal lysine clipping of IgG1: impact on binding to human FcγRIIIa and neonatal Fc receptors

Valegh Faïd^{*}, Yann Leblanc, Marie Berger, Alexander Seifert, Nicolas Bihoreau, Guillaume Chevreux

Analytical Department, LFB Biotechnologies, 3 avenue des Tropiques, 91958 Courtaboeuf (Les Ulis), France

ARTICLE INFO

Keywords:

C-terminal lysine clipping
charge variants
FcγRIIIa
FcRn
affinity chromatography
surface plasmon resonance
mass spectrometry
monoclonal antibody

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (mAbs) display numerous structural attributes, some of them may impact their safety and/or efficacy profiles. C-terminal lysine clipping is a common phenomenon occurring during the bioproduction of mAbs and leads to variable amounts of final process-related charge variants. If Fc-glycosylation has been by far the most documented critical quality attribute (CQA), the potential impacts of mAb C-terminal lysine content is far less reported, particularly on the ability of these basic variants to bind human Fc receptors. To address this question, three charge variant species having zero (K0), one (K1) and two (K2) C-terminal lysine(s) were isolated with high purity from an in-house human IgG1 by preparative strong-cation exchange (SCX) chromatography. A comprehensive biophysical characterization of these three fractions was undertaken, demonstrating their high similarity in terms of structural homogeneity, with a particular attention paid on their respective N-glycosylation profiles. The binding affinity of the fractions to human FcγRIIIa-Val¹⁷⁶ was assessed both by affinity chromatography and surface plasmon resonance (SPR), and to human neonatal Fc receptor (FcRn) by affinity chromatography. Results demonstrate that the three charge variants did not show any significant binding difference for the two tested human Fc receptors, translating certainly to comparable biological properties. As a consequence, C-terminal lysine clipping of the present therapeutic IgG1 should not impact both FcRn-dependent pharmacokinetic profiles and FcγRIIIa-driven cytotoxic activities. The methods used in this study can be widely applied to other IgG1 to define criticality of the C-terminal lysine clipping as a CQA.

1. Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are today the most popular protein therapeutics due to their use in the treatment of a wide spectrum of diseases including cancers, inflammation, auto-/allo-immune and infectious diseases (Niwa and Satoh, 2015). These large Y-shape proteins are composed of two structural regions, a variable fragment (Fab) that mediates antigen binding and a constant fragment (Fc) that is responsible for other important biological functions, including the recycling of the protein via a pH-dependent interaction to the neonatal Fc receptor (FcRn) and the mediation of responses termed effector functions. These immune effector functions are triggered via its interaction with C1q, the

recognition molecule initiating complement-dependent cytotoxicity (CDC), and/or via Fc gamma receptors (FcγRs), widely expressed on surfaces of innate effector cells such as macrophages and natural killer (NK) cells. Amongst these receptors, FcγRIIIa was especially demonstrated to be of high importance in glycosylation-dependent mechanisms of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and cellular phagocytosis (ADCP) (Beck and Liu, 2019; Alt et al., 2016; Harris, 1995; Liu et al., 2016; Dick et al., 2008; Burmeister et al., 1994).

MABs are susceptible to a wide range of post-translational modifications (PTMs), resulting from maturation during expression and degradation during the whole process of production from culture to purification and storage. Amongst all the potential PTMs encountered on

Abbreviations: ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCP, antibody-dependent cellular phagocytosis; CDC, complement-dependent cytotoxicity; Fab, monovalent Fragment-antigen binding; F(ab')₂, bivalent Fab; Fc/2, constant fragment of one IgG heavy chain; Fd, variable fragment of IgG heavy chain; FcγRIIIa, Fc receptor for IgG subclass IIIa (CD16a); FcRn, neonatal Fc receptor; LC, light chain; HC, heavy chain; IdeS, cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*; IgDE, cysteine protease from *Streptococcus agalactiae*; IgG, immunoglobulin G; LC/MS, liquid chromatography/mass spectrometry; mAbs, monoclonal antibodies; PTMs, post-translational modifications.

^{*} Corresponding author.

E-mail address: faidv@lfb.fr (V. Faïd).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105730>

Received 5 November 2020; Received in revised form 12 January 2021; Accepted 18 January 2021

Available online 23 January 2021

0928-0987/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

mAbs, the most common ones are N-glycosylation, N-terminal pyroglutamine cyclization, disulfide bond formation, oxidation, deamidation, isomerization and clipping (Beck and Liu, 2019). These PTMs generate heterogeneity with variants differing in molecular weight, charge and/or hydrophobicity. Some of them are considered as critical quality attributes (CQAs) that can potentially impact safety and/or efficacy of biopharmaceuticals (Alt *et al.*, 2016). The rigorous identification of relevant CQAs constitutes the cornerstone of a biopharmaceutical development strategy based on a Quality-by-Design (QbD) approach, as described in the quality guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH) Q8. In practice, a risk assessment is carried out on each identified variant and used to justify the identification of an attribute as critical or noncritical. It requires the use of risk assessment tools that are fed with available knowledge either from literature/comparison with other similar products, or based on specific data obtained from the product.

Variation of the C-terminal lysine content is commonly observed in therapeutic mAbs. Although mAbs are synthesized with two C-terminal lysine residues, heterogeneity occurs after partial clipping by carboxypeptidases in the culture medium (Harris, 1995; Liu *et al.*, 2016). Apart from its impact on safety and efficacy, the degree of C-terminal heterogeneity is usually monitored as it is considered to reflect manufacturing consistency (Dick, Jr. *et al.*, 2008). Evaluation of this structural attribute in terms of pharmacological criticality can be delicate regarding the lack of reliable scientific knowledge available in the literature. Crystal structures of Fc fragments bound to FcγRs and FcRn show that C-terminal lysine residues of IgG1 heavy chain are not involved in any interaction between the Fc and its related receptors (Burmeister *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2001; Sondermann and Oosthuizen, 2002). The distance between the C-terminal ends of the heavy chains and the Fab-antigen binding region does not suggest any involvement of the C-terminal lysine residues in antigen binding as well. Antes *et al.* demonstrated that batches of a humanized Lewis-Y-specific IgG, differing by their C-terminal lysine content, exhibited similar potencies in CDC assays (Antes *et al.*, 2007). On the other hand, van den Bremer *et al.* recently published conflicting data, with the observation that C-terminal lysine truncation was mandatory for optimal CDC activity of two mAbs directed against CD20 and CD38 antigens (van den Bremer *et al.*, 2015). The presence of a positive charge at the C-terminal end of the antibody heavy chain was suggested to somehow destabilize the formation of ordered hexameric structures required for optimal complement activation potency. The pharmacokinetic (PK) significance of C-terminal lysine clipping was also assessed on a human IgG1 mAb by Khawli *et al.* after analysis of C-terminal lysine variants purified by strong-cation exchange (SCX) chromatography, by surface plasmon resonance (SPR) using rat FcRn and an *in vivo* rat model (Khawli *et al.*, 2010). In this study, they reported similar *in vitro/in vivo* PK profiles between C-terminally clipped samples *versus* their untreated counterparts as well as similar potencies based on antiproliferation assays. Furthermore, C-terminal lysines of a therapeutic IgG2 mAb were demonstrated to be quickly processed *in vivo* or *in vitro* after incubation in serum, providing a potential argument to classify C-terminal lysine clipping as a non-critical attribute (Alt *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2011). Finally, Hintersteiner *et al.* found that basic isoforms of a chimeric anti-GD2 antibody purified by SCX chromatography exhibited increased binding to both FcγRIIIa and FcRn, suggesting improved ADCC/ADCP and PK for these variants. However, they also demonstrated that the microheterogeneity of these variants was complex and inconsistent between each other, with combined variations of several quality attributes like C-terminal lysine, glycosylation and oxidation contents (Hintersteiner *et al.*, 2016). These controversial data, explained by the specificity of the protocols, techniques and/or products used during experiments, confirm that there is a need to increase our common knowledge on the impact of C-terminal lysine clipping on IgG1 safety and efficacy profiles.

In this study, we evaluated the impact on biological activity of the C-

terminal lysine content of an in-house human IgG1 mAb, whose mechanism of action (MoA) relies on FcγRIIIa-driven ADCP. The main neutral and the two basic charge variants, termed K0, K1 and K2, obtained from an optimized salt-gradient SCX method, were collected by preparative chromatography. These three fractions were extensively characterized using advanced chromatographic and mass spectrometric methods to demonstrate the structural comparability between them. Particular attention was paid to the assessment of the N-glycan content homogeneity from the purified charge variants, especially core-fucosylation and galactosylation, considering the strong impact of this PTM on the MoA of the tested mAb through binding to FcγRIIIa receptor (Shinkawa *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2010; Beck and Liu, 2019; Alt *et al.*, 2016; Reusch and Tejada, 2015). The three fractions were then evaluated by affinity chromatography towards human FcRn and FcγRIIIa receptors. This technology, described by Schlothauer *et al.* (Schlothauer *et al.*, 2013) and more recently by Freimoser- Grundschober *et al.* (Freimoser-Grundschober *et al.*, 2019), offers the advantage of separating and collecting IgG isoforms based on their relative affinities, reflected by their retention times (RTs), and thus providing an easy way to establish the impact(s) of their structural attribute(s) on the binding affinities to a human Fc receptor of interest. SPR was finally used as an orthogonal approach measure the binding affinity of the three fractions to the human FcγRIIIa receptor.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The cysteine proteases, from *Streptococcus pyogenes* IdeS (Fabricator) and from *Streptococcus agalactiae* IgdE (Fabalactica), and the endoglycosidase S2 (IgGZERO) were obtained from Genovis (Lund, Sweden). Acetic acid, ammonium formate, dithiothreitol (DTT), Guanidine, hydrochloride acid (HCl), Iodoacetamide (IAA), methanol, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), 3-morpholino-1-propanesulfonic acid (MOPS), phosphate buffered saline (PBS), sodium chloride (NaCl), trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Millipore-Sigma (St Louis, MO, USA). Acetonitrile (MeCN) was HPLC reagent grade and purchased from JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA). *Flavobacterium meningosepticum* peptidyl-N-glycosidase (PNGase) F and the 2-aminobenzamide (2-AB)-labeling kits (including dimethylsulfoxide, acetic acid, sodium cyanoborohydride) were purchased from Prozyme (San Leandro, CA, USA). The MS calibrants, [Glu1]-fibrinopeptide B and sodium iodide (NaI), were purchased from Waters (Milford, MA, USA). All the aqueous solutions were prepared using ultra-pure water (18.2 MΩ cm resistivity at 25°C, total organic carbon (TOC) <5 ppb). The human IgG1 used in this study was produced internally in the rat myeloma YB2/0 cell line and concentrated at 0.3 g/L with purity level better than 99.5%.

2.2. Preparative SCX purification of the charge variants

About 200 mL of the IgG1 product was concentrated and desalted against 20 mM sodium phosphate pH 7.0 by ultrafiltration (UF) using 30-kDa molecular-weight cut-off (MWCO) Microcon centrifugal filters (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) to get about 5 mL at about 10 g/L. The preparative SCX-based fractionation was carried out on a 250 × 4.6 mm MabPac SCX-10 (10 μm) column, using an HPLC U3000 System (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). The mobile phase A was 20 mM sodium phosphate pH 7.0 and the mobile phase B was buffer A + 250 mM NaCl. The separation was conducted at 30°C using a linear gradient from 20 to 30% of B in 60 min at 0.7 mL/min, with UV detection at both 214 and 280 nm. 60 injections of 700 μg of mAb were necessary to get the required target amount of ~2 mg of each charge variants for the completion of the full analytical/bioanalytical study plan. Collection of the fractions of interest (K0, K1 and K2) was enabled using an automatic collector (ThermoFisher Scientific). All the collected fractions were frozen at -80°C just after being collected. Once collection

processes were achieved, the three charge variant fractions were thawed at room temperature for 1 hour and then ultrafiltered using a 30-kDa MWCO Microcon centrifugal filters, and diafiltered against PBS (10 mM sodium phosphate containing 138 mM NaCl and 2.7 mM KCl buffered at pH 7.4), to get a target concentration of 10 g/L for immediate analysis.

2.3. Purity assessment by analytical SCX/FLR

The purity of each charge variant fraction was assessed on a 150×4.6 mm MabPac SCX-10 (5 μ m) column, using an Acquity UPLC H-Class Bio system (Waters). The mobile phases, flow rate and temperature were the same as those used for the preparative SCX chromatography. About 1 μ g of sample was injected after a 10-fold dilution in the mobile phase A. After an isocratic elution at 20% of B for 5 min, the analytical separation was done from 20% to 50% of B in 35 min and the elution was monitored by fluorometry (FLR; excitation at 280 nm, emission at 330 nm).

2.4. N-glycan profiling by HILIC/FLR analysis

The N-glycoprofiling of the IgG1 charge variants was done according to the procedure described by Faid et al. (2014), with slight modifications on the LC part. The SPE eluates of fluorescent labels were vacuum-dried, before being recovered in 20 μ L of acetonitrile/water (2:1; v/v) and analyzed by hydrophilic interaction chromatography (HILIC) coupled to a fluorescence detection (FLR; excitation at 330 nm, emission at 420 nm), using (1) 150×2.1 mm BEH Glycan column (Waters); (2) an UPLC H-Class Bio Acquity system (Waters); (3) 250 mM ammonium formate pH 4.4 in water (phase A) and MeCN (phase B) as mobile phases. After an injection of 3 μ L, the separation was done at 50°C and 0.5 mL/min by applying a decreasing linear gradient of B, from 78% to 56% in 38.5 min.

2.5. Size variant profiling by SEC/FLR analysis

Profiling of the size variants was carried out by size-exclusion chromatography (SEC) on an Acquity UPLC H-Class Bio system (Waters) coupled to a fluorescence detection (FLR; excitation at 280 nm, emission at 330 nm), using a 300×4.6 mm BEH 450 column, equilibrated at 22°C using 100% of PBS pH 7.4, as mobile phase, at a flow rate of 0.3 mL/min. Samples were first diluted with the mobile phase A at a final concentration of 0.2 g/L, and 1 μ g was injected onto the column. The elution was isocratic using 100% of mobile phase A at 22°C for 20 minutes after injection.

2.6. Middle-up RP-LC/MS analysis

The fractions were prepared for middle-up reversed-phase liquid chromatography (RP-LC)/MS analyses of IdeS-produced, DTT-reduced fragments, as described by Chevreux et al. (2011), with slight modifications on the LC/MS part. The digested and denatured samples (1 μ g/ μ L of 0.1 M Tris-HCl containing 6 M guanidinium chloride buffered at pH 7.3) were afterward analyzed by RP-LC/MS, using: (1) 150×2 mm RP diphenyl Bioresolve column (Waters); (2) an Acquity UPLC system (Waters); (3) 0.1% (v/v) TFA in water (phase A) and 0.1% (v/v) TFA in MeCN (phase B) as mobile phases. After the injection of 5 μ L, the separation was done at 70°C and 0.2 mL/min using the following conditions: 10% B in 5 min, 10-30% B in 10 min, 30-35% B in 30 min, 35-44% in 10 min, 44-80% B in 2 min, wash at 80% B for 4 min, 80-10% B in 2 min, re-equilibration in 10% B in 7 min. The SCX fractions were also prepared for middle-up RP-LC/MS analyses of IgdE-produced Fc and Fab fragments, as recently described by Faid et al. (2014). The electrospray-quadrupole/time-of-flight mass spectrometer (ESI-Q/TOF MS, Synapt G2S, Waters) was operated in the positive resolution mode and data were recorded from m/z 400 to 4000 with a sampling cone of 100 V. ESI TOF MS spectra were processed by Mass Lynx v4.1 and

deconvoluted using MaxEnt 1 to obtain the deconvoluted masses.

2.7. Middle-up SCX/FLR and SCX/MS analysis

The enzymatic proteolysis of the fractions was carried out by incubation of 100 μ g of sample for 90 min at 37°C with 40 IU of IdeS to generate (Fc/2)₂ and F(ab')₂ fragments. Separation of IgG fragments was performed using an Acquity UPLC H-Class Bio system (Waters) coupled to a fluorescence detection (FLR; excitation at 280 nm, emission at 330 nm). The mobile phases used for analytical SCX/FLR were 20 mM sodium phosphate buffered at pH 3.9 (Buffer A) and 20 mM sodium phosphate buffered at pH 7.4 + 250 mM NaCl (Buffer B). Around 1 μ g of IdeS-digested samples was injected on a 150×4.6 mm (5 μ m) MABPAC SCX-10 column (ThermoFisher Scientific) equilibrated at 30°C and operated at a flow rate of 0.7 mL/min. After an isocratic elution at 10% of B for 5 min, a linear gradient was applied from 10% to 60% of B in 60 min. The column was then washed for 8 min at 80% of B and further equilibrated for 25 min at 10% of B. SCX/MS analyses were conducted separately as described by Leblanc et al. (2017) because fluorescence and mass spectrometry were not compatible in term of sensitivity range for a single analysis with both detections.

2.8. Affinity chromatography on immobilized human Fc γ RIIIa receptor

Fc γ RIIIa affinity LC analyses were carried out on a HPLC U3000 System (ThermoFisher Scientific) using 20 mM Tris, 20 mM MOPS, 20 mM sodium citrate, 100 mM NaCl buffer at pH 8.0 (Buffer A) and pH 3.5 (Buffer B) as mobile phases. After a five-fold dilution in buffer A, around 10 μ g of sample were injected on a 1-mL prepacked column with immobilized human Fc γ RIIIa-Val¹⁷⁶ receptor (Glycap-3A, Zepton Inc, Boston, MA, USA) equilibrated at 22°C and operated at a flow rate of 0.3 mL/min. After an isocratic elution at 5% of B for 5 min and a linear gradient from 5% to 80% of B in 20 min, three acidic pH elution steps were applied: 80% of B for 5 min, 85% of B for 6 min and 100% of B for 15 min. The column was further re-equilibrated for 36 min at 5% of B. Elution was monitored by UV absorbance at 280 nm.

2.9. SPR binding to human Fc γ RIIIa receptor

SPR experiments were performed on a Biacore T200 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA), using CM5 sensor chips (Biacore) with an immobilization using anti-His antibodies via amine-coupling chemistry as described by the manufacturer. For each cycle, His-tagged Fc γ RIIIa-Val¹⁷⁶ (SinoBiological Inc, Beijing, China) was newly captured on the active flow-cell up to ~ 25-50 Resonance Units (RU) by injecting 1 μ g/mL in a running buffer of 15 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.0005% (w/v) Tween-20 pH 7.4, at a flow rate of 10 μ L/min. Kinetic measurements were performed by injecting serial dilutions of charge variants (6.25-100 nM) in Single-Cycle Kinetics (SCK) mode at 25°C with 30 μ L/min. To correct for non-specific binding and bulk effects, responses obtained from the reference flow-cell and blank injections were subtracted from each interaction curve. Kinetic parameters (on-rate/off-rate constants, k_{on}/k_{off}) were calculated after fitting the data using the Langmuir 1:1 isotherm ligand model provided by Biacore T200 Evaluation 3.0 software. The goodness-of-fit of the kinetic data was assessed using the Chi-square values and U-values. Analyses were done under intermediate fidelity using triplicates in three independent assays.

2.10. Affinity chromatography on immobilized human FcRn receptor

The FcRn affinity LC analyses were carried out on a HPLC U3000 System (ThermoFisher Scientific) using 20 mM MES with 140 mM NaCl buffered at pH 5.3 (Buffer A) and 20 mM Tris-HCl with 140 mM NaCl buffered at pH 8.8 (Buffer B) as mobile phases. After a five-fold dilution in buffer A, around 50 μ g of sample were injected on a prepacked column with immobilized human FcRn receptor (Roche diagnostics,

Mannheim, Germany) equilibrated at 30°C and operated at a flow rate of 0.5 mL/min. After an isocratic elution at 20% of B for 5 min, a linear gradient was applied from 20% to 100% of B in 60 min. The column was then washed for 5 min at 100% of B and further equilibrated for 15 min at 20% of B. Elution was monitored by UV absorbance at 280 nm.

3. Results and discussion

3.1. SCX purification and in-depth characterization of fractions K0, K1 and K2

The first challenge to investigate the potential impact of the C-terminal lysine content was to get high-purity fractions (1) comprising IgG1 variants with zero, one and two C-terminal lysine(s) based on a salt-gradient SCX separation, and (2) displaying the most comparable structural quality attributes as possible.

Fig. 1A shows the preparative SCX chromatogram obtained for the in house IgG1 product. The neutral main peak labelled K0 represents 69% while the two basic forms, labelled K1 and K2, account for 16% and 8% of the total UV signal, respectively. Shaded lines delimit the elution time zones used for automatic collection of the fractions. After collection and concentration, purity of the three SCX fractions of interest was assessed

by analytical SCX (see Fig. 1B) and estimated to be of at least 90%. No significant acidic variants were observed in the different fractions compared to the starting material, indicating no degradation upon preparative or post-SCX ultrafiltration steps.

Further structural investigations at intact and subunit levels were done and results were summarized in Table 1. SEC results revealed more than 97% of monomers in the samples, with only slight variations in oligomer/fragment contents between the three SCX fractions. Fig. 2A shows middle-up RP-LC/MS profiles of IdeS-digested and reduced Fc/2, LC and Fd fragments of the three SCX fractions. This method is useful to investigate sequence modifications and PTM like oxidation, lysine content and clipping with the support of on-line mass spectrometry. Differences between the three RP-LC/MS profiles were only seen within the retention time (RT) window 28-33 min (see insert), corresponding to the elution zone of Fc/2 variants, while the three profiles remained nearly superimposable at both LC and Fd elution regions. These differences were only attributed to the lysine content of each fraction, while the oxidation content was stable between fractions and cleaved forms were not detected. Integration of peaks showed an estimation of Fc/2 and Fd oxidation of about 5% and 12% respectively for the three fractions (see Table 1). Of note, ESI MS spectra of Fc/2 fragments from the three fractions display qualitatively comparable glycoform profiles (data not

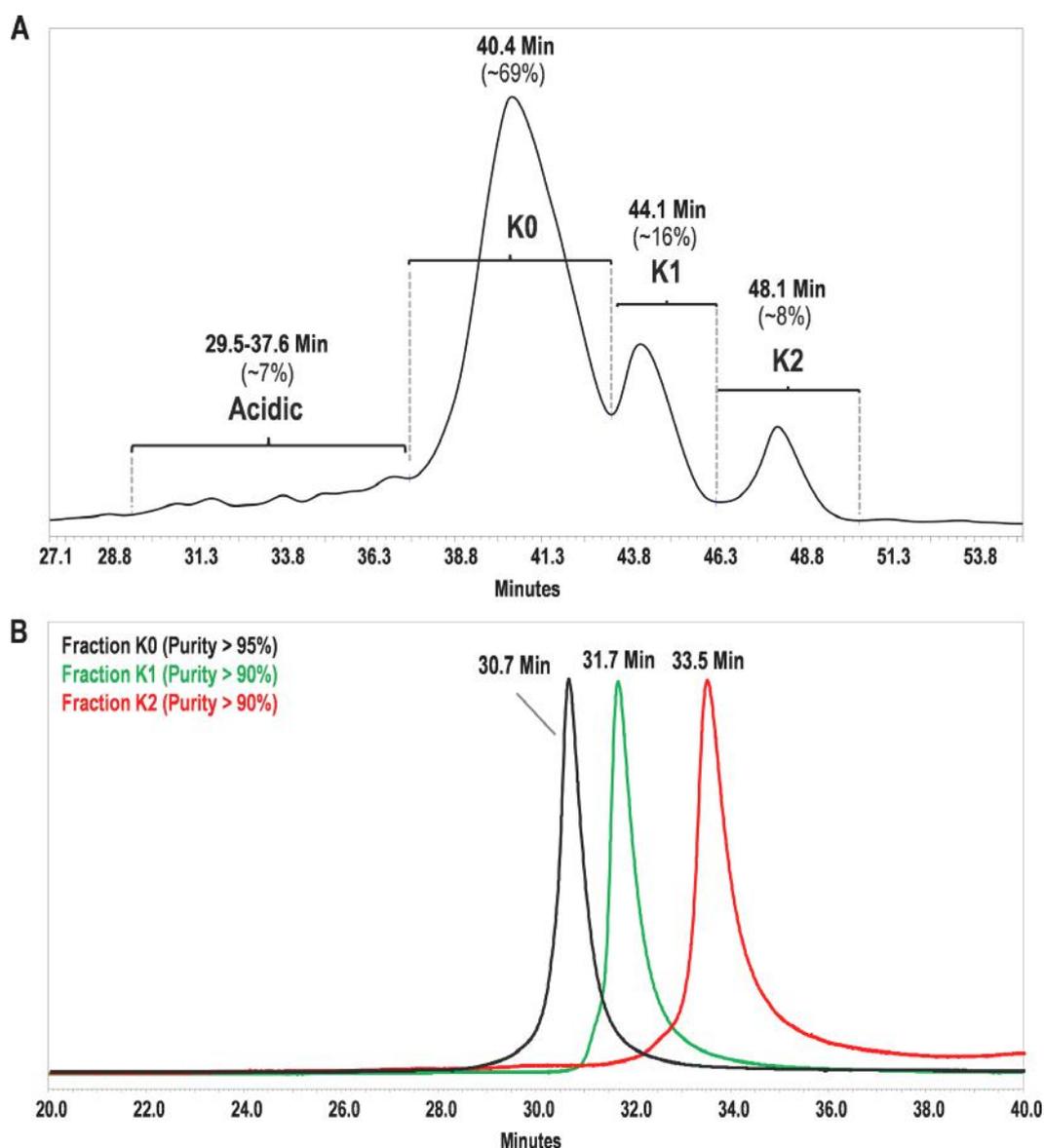


Figure 1. Preparative SCX fractionation of the human IgG1. (A) Charge variant fractions of interest K0, K1 and K2 (delimited by dotted lines). (B) Analytical SCX purity analysis of the three collected fractions.

Table 1
Summary of the biophysical characterization results of the three SCX fractions K0, K1 and K2.

	Fraction SCX [K0]	Fraction SCX [K1]	Fraction SCX [K2]
Purity assesment by analytical SCX	> 95%	> 90%	> 90%
Size Variants Profiling			
Oligomers (%)	< 1%	1%	2%
Monomers (%)	99%	98%	97%
Fragments (%)	ND	1%	1%
Middle-Up RP-LC/MS (IdeS/ DTT)			
Oxidized Fc/2-K0 (%)	5%	2%	ND
Oxidized Fc/2-K1 (%)	ND	3%	6%
Fc/2-K0 (%)	90%	57%	19%
Fc/2-K1 (%)	5%	38%	75%
Oxidized LC	ND	ND	ND
Oxidized Fd (%)	12%	12%	13%
Unoxidized Fd (%)	88%	88%	87%
Middle-Up SCX/FLR/MS (IdeS)			
(Fc/2) ₂			
Acidic (%)	11%	13%	12%
Main (%)	72%	73%	72%
Basic (%)	17%	15%	14%
F(ab') ₂			
Acidic (%)	13%	8%	8%
Main (%)	86%	90%	80%
Basic (%)	1%	3%	12%
HILIC/FLR Glycoanalysis			
Fucosylation level (%)	29%	25%	26%
Galactosylation index (°/200)	43°/200	37°/200	36°/200
Bisecting GlcNAc (%)	7%	7%	9%
Sialylated structures (%)	< 1%	< 1%	< 1%

ND: not detected

shown), suggesting homogeneous N-glycosylation between the isolated fractions. However, a dedicated and more accurate method based on HILIC chromatography was further carried out to ensure N-glycosylation consistency between the collected fractions. In summary, all data collected from this RP-LC/MS experiment suggest structural comparability of the three fractions excepted for the lysine content.

Strong Cation chromatography (SCX) is the method of choice for the elucidation of protein charge variations such as deamidation which is a common degradation that can occur during sample handling. This particular PTM is more efficiently separated and evidenced using ion exchange chromatography separation than separation technics such as RP chromatography. Fig. 2B shows SCX/FLR profiles of IdeS-produced (Fc/2)₂ and F(ab')₂ fragments for the three samples. Peaks identities were deduced from MS data while integration of the fluorescence signal was used for quantification of the different charge isoforms. A major difference between samples was observed within the elution zone of (Fc/2)₂ variants in the range 8-22 min (see insert). As expected, (Fc/2)₂, carrying the C-terminal lysine heterogeneity, eluted as three distinct major peaks corresponding to K0, K1 and K2 major species of the three respective fractions. These peaks were all slightly asymmetric and assorted by a post-peak shoulder due to N-glycan heterogeneity (elution of monoantennary structures). The abundances of acidic and basic variants were estimated relatively to the main (Fc/2)₂ peak (see Table 1). These results confirm the previous ones from RP-LC/MS analyses regarding the number of C-terminal lysine residues of each fraction. Also, these three SCX fractions display comparable relative distributions in acidic, main and basic (Fc/2)₂ peaks (see Table 1). Acidic (Fc/2)₂ variants account for ~12% of mainly deamidated variants, as confirmed by their ESI MS spectra. Basic (Fc/2)₂ variants (~15%), correspond mainly to oxidized forms (+16-Da mass shifts). Although the three profiles appeared nearly superimposable at the F(ab')₂ elution regions, slight differences were visible. Major acidic F(ab')₂ variants correspond to mono-/di-oxidized forms eluted in three

distinct elution peaks (+16-/32-Da mass shifts). The presence of these three elution peaks may be due to distinct conformers featured with distinct oxidation states/sites at the heavy chains since RP-LC/MS did not reveal the presence of oxidized LC. Previous studies, based on cation exchange chromatography of stressed IgG samples, showed that methionine oxidations at the Fc region (CH₂ domain) confer a basic behavior (Chumsae et al., 2007), while those impacting the Fab region confer an acidic behavior (Leblanc et al., 2017; Ponniah et al., 2015), as confirmed in our results. These acidic oxidized variants were very consistent between all fractions. A slight difference between fractions was observed on the basic F(ab')₂ variant side with a new peak observed only in the SCX fraction K2 (~12% of F(ab')₂) and corresponding most probably to a variant with one impaired disulfide bond, suggested by a mass shift close to +2 Da. Such basic behavior is consistent with the findings of Ouellette et al., who described basic isoforms featured with unpaired intra-chain cysteine residues, located at the V_H domain of an IgG1 (Ouellette et al., 2010). This basic behavior is also consistent with an observation that we had reported in a previous study, highlighting shifted charge state envelopes on Igde-produced Fc and Fab fragments carrying impaired cysteines towards lower m/z values (more positive charges) versus their native counterparts (Faid et al., 2018).

Finally, the N-glycan maps of the three SCX samples were accurately determined by HILIC/FLR analysis of the 2-AB-labelled derivatives (see Fig. 2C). Several relevant parameters were calculated from the integration results of the detected structures, in particular levels of fucosylation, galactosylation, bisection and sialylation, each of them known to moderately-to-highly impact the Fc/FcγRIIIa interaction (Beck and Liu, 2019; Reusch and Tejada, 2015; Shinkawa et al., 2003; Houde et al., 2010). Detected N-glycans are of the complex-type (~99%) and mostly composed of non-fucosylated and agalactosylated biantennary structures. Only slight variations of fucosylation (25-29%), bisection (7-9%) and galactosylation (36-43°/200) were observed amongst the three SCX fractions and considered as non-significant with regard to the analytical reproducibility of the method. The N-glycan relative quantitation results are summarized in Table 1 and detailed in Supplementary Table 1. It should be noticed that this result was obtained thanks to the salt-based gradient separation of the charge variants. Indeed, based on our knowledge on charge variant antibody characterization, pH-based gradient separation tends to impact elution of the different glycoforms which results in highest difficulties to collect basic variants with acceptable glycoforms homogeneity.

In summary, the three collected fractions were found to display highly comparable structural homogeneity besides their C-terminal lysine contents, which was a prerequisite for further functional testing regarding binding to human FcγRIIIa and FcRn receptors.

3.2. Affinity chromatography and SPR binding assays to the human FcγRIIIa

The binding of the three SCX fractions to the human FcγRIIIa receptor was first investigated by affinity chromatography. Analytical affinity chromatography with immobilized human FcγRIIIa receptor has been proved to be powerful to address subtle-to-significant changes in binding affinities of mAb variants. Thomann et al. (2015) succeeded in separating IgG1 glycovariants with an in-house human FcγRIIIa-immobilized column and to establish reliable correlations between RTs and both ADCC and SPR data.

Fig. 3A shows an overlay of the affinity chromatographic profiles of fractions K0, K1 and K2. The RTs of maxima were reproducibly obtained with coefficients of variations (CVs) less than 0.05%, based on three replicates. For all the tested samples, affinity chromatograms were composed of three main affinity peaks labelled as F_I (~52%), F_{II} (~27%) and F_{III} (~20%), ranked in increasing order of RTs, and thus increasing order of relative binding affinities to the human FcγRIIIa. The possibility of collecting those affinity-separated subfractions for further MS analysis constitutes a real advantage for this approach to increase data

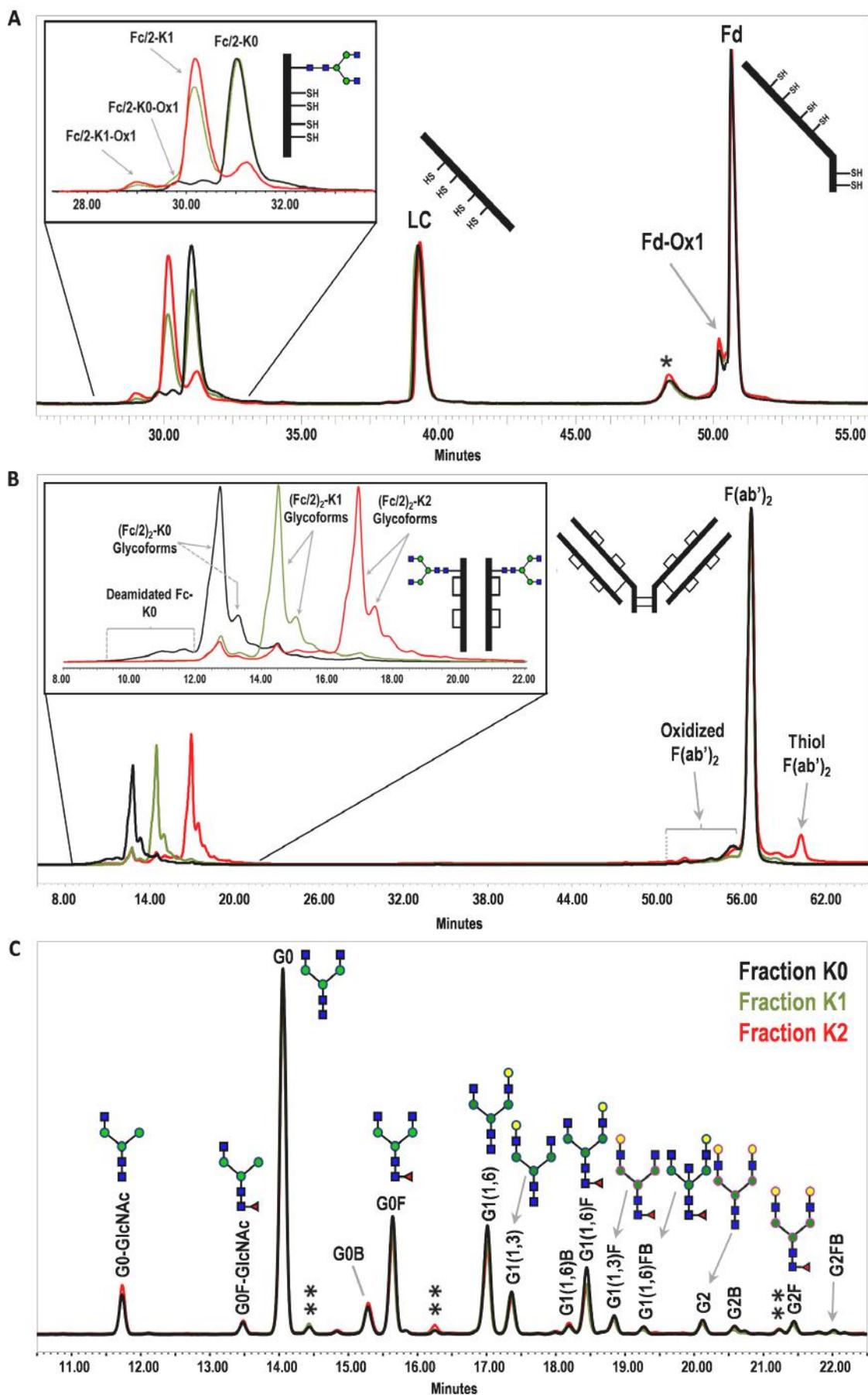


Figure 2. Overlay of middle-up RP-LC/MS profiles (A), middle-up SCX-LC/MS profiles (B) and HILIC/FLR N-glycan maps (C) of the three SCX fractions of interest K0, K1 and K2. All the chromatograms were normalized to the major peak for either the whole profile or the related inserts. The N-glycan structures were represented according to the CFG nomenclature (Consortium for Functional Glycomics). For clarity, bisected structures were not drawn. (*) points out the IdeS protease. (**) points out glycan label side-products.

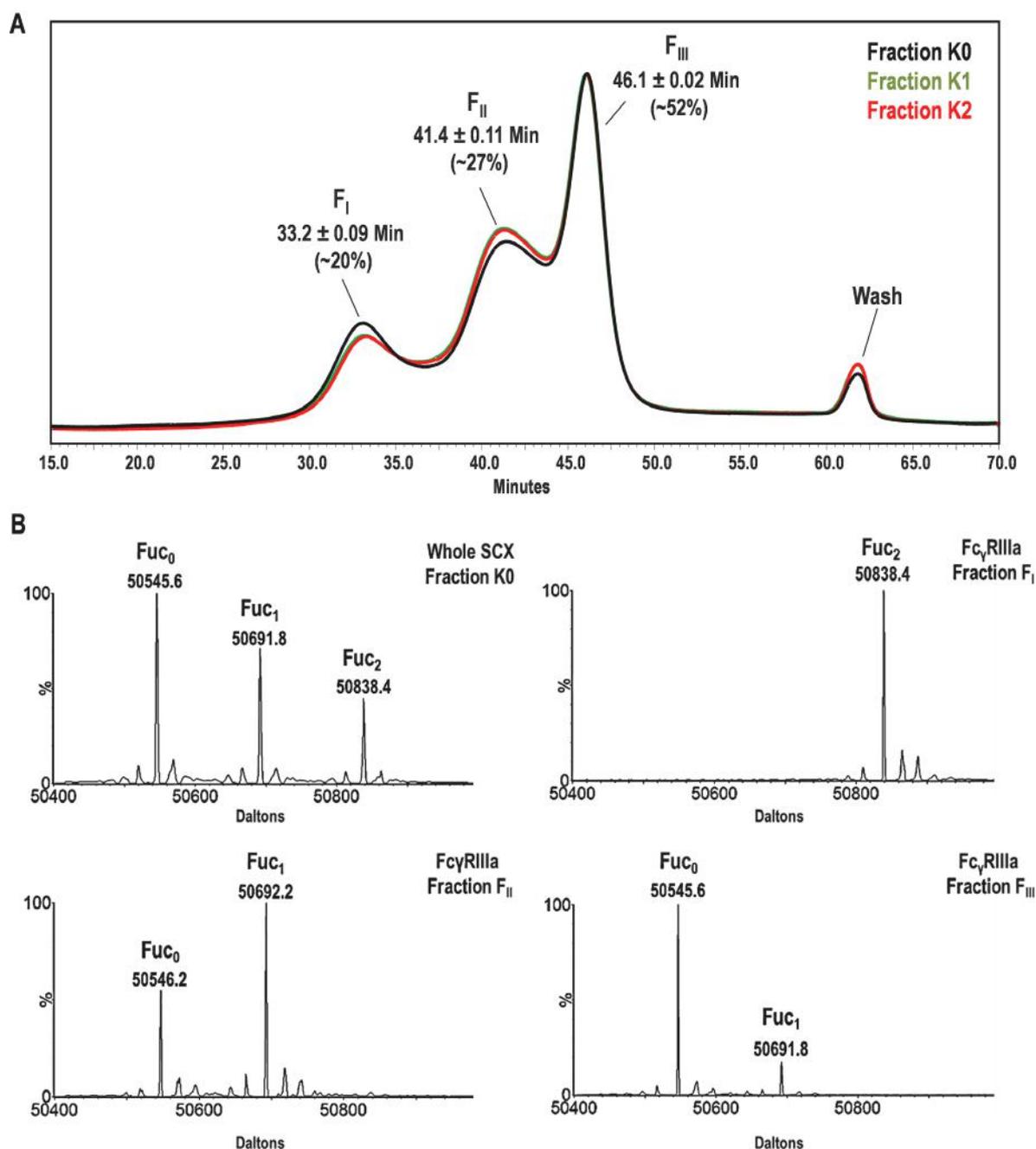


Figure 3. Overlay of affinity chromatograms on immobilized human $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ of the three SCX fractions K0, K1 and K2 (A) and MS identifications of the affinity subfractions F_I , F_{II} and F_{III} from the SCX fraction K0 (B). ESI TOF MS spectra of Fc glycoforms were obtained after combined IgdE/endoS2 digestions of the whole SCX fraction K0 and its three affinity subfractions.

confidence. Detailed identification of the three affinity peaks was carried out by middle-up RP-LC/MS analysis after IgdE and combined EndoS2/IgdE digestions. IgdE was advantageously used here to investigate affinity peaks at the Fc level which is the most relevant considering that the Fc subunit carries paired glycans as well as C-terminal lysine heterogeneity. Fig. 3B shows deconvoluted mass spectra of the Fc part obtained by combined EndoS2 and IgdE digestions of the fraction K0 starting material and its three affinity subfractions derived from $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ affinity chromatography. In these conditions, Fc glycosylation was reduced to the two innermost GlcNAc residues, displaying potential core-fucosylation heterogeneity. MS results show unambiguously that the three affinity subfractions differ by the number of core-fucose present on the Fc subunit, with fractions F_I , F_{II} and F_{III} corresponding to Fc glycoforms carrying two (Fuc_2), one (Fuc_1) and zero (Fuc_0) core-fucose (s), respectively. This result is consistent with the well-known negative effect of N-glycan core-fucosylation on $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ affinity (Shinkawa et al.,

2003; Houde et al., 2010) i.e. bifucosylated IgG1 glycoforms bind less efficiently to the affinity column. Mass spectra obtained without the addition of EndoS2 (IgdE only) show much more heterogeneity with the full N-glycan structures attached to the Fc but still lead to same conclusions regarding the impact of core-fucose (see Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 2). In the light of these data, the affinity profiles of the three SCX fractions look very close considering their difference of C-terminal lysine contents. The only slight difference of peak intensity observed at 33.2 and 41.4 min for fractions K1 and K2 compared to K0 is rather explained by the slightly lower fucosylation content of these two samples versus fraction K0 (see Glycoanalysis results of Table 1). Additional *in vitro* glycoengineered variants of this IgG1 were analyzed by the present affinity chromatography method as performance controls. An overlay of the affinity chromatographic profiles of a related batch of the human IgG1 of the study and its two derived hyperfucosylated ($\text{Fuc} \sim 88\%$) and hypergalactosylated samples

(Gal~188°/200) is presented in Supplementary Fig. 2. As previously described, the present affinity chromatography method is highly sensitive to the fucosylation level and a large increase of the peak F_I is observed for the hyperfucosylated sample, largely dominated by the bifucosylated IgG1 glycoforms. The effect of galactosylation was less significant but still well highlighted by a clear shift of the overall affinity profile towards higher RTs (z -score > 10 times the repeatability SD based on peak F_{III}). This tighter binding to the affinity column is consistent with data from Thomann *et al.*, who described significant gains in binding affinities of their hypergalactosylated IgG1 preparations *versus* native agalactosylated control to their Fc γ RIIIa-immobilized column (Thomann *et al.*, 2015). In summary, the present affinity chromatography method demonstrated the clear role of Fc-fucosylation and galactosylation as well as the most significant impact of fucose over galactose on the binding affinity towards human Fc γ RIIIa as previously reported (Shinkawa *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2010; Thomann *et al.*, 2015) but no effect at all of the C-terminal lysine clipping.

Binding affinities were also measured using an orthogonal SPR approach with human Fc γ RIIIa-immobilized chips, under intermediate fidelity conditions using three independent sample and chip preparations.

Fig. 4 shows an overlay of adjusted single-cycle kinetics (SCK) sensorgrams, obtained from the three SCX fractions while kinetic parameters deduced from the data are summarized in Table 2. The three kinetic data fitted well with a 1:1 Langmuir isotherm binding model, as judged by the low values of the goodness-of-fit parameters (Chi-square and U-value). The tested samples displayed similar association/dissociation phases, with comparable on-rate/off-rate (k_{on}/k_{off}) constants respectively ranging from $2.1 \pm 0.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (K0) to $2.7 \pm 0.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (K2) and from $6.2 \pm 1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (K0) to $7.3 \pm 0.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (K2). The deduced affinity dissociation constants (K_D), ranging from $2.8 \pm 0.2 \times 10^{-9} \text{ M}$ (K2) to $3.0 \pm 0.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ (K0), are overall consistent and no statistically significant differences were detected considering the analytical fidelity, based on three independent experiments (ANOVA p -value of 0.63 at 95% confidence). In summary, SPR data did not show any significant difference of Fc γ RIIIa binding affinity between the three SCX fractions K0, K1 and K2.

Only few studies from the literature reported the impact of C-terminal lysine clipping on mAb effector functions. Biological activities were mostly assessed by CDC-based potency assays (Antes *et al.*, 2007; van den Bremer *et al.*, 2015; Hintersteiner *et al.*, 2016) and also using an antiproliferation assay (Khawli *et al.*, 2010). Considering here the specificity of our IgG1 product with a MoA involving ADCP, we investigated the binding to the human Fc γ RIIIa receptor. Hintersteiner *et al.* were, to the best of our knowledge, the only ones who investigated binding affinities of SCX-purified basic charge variants towards this

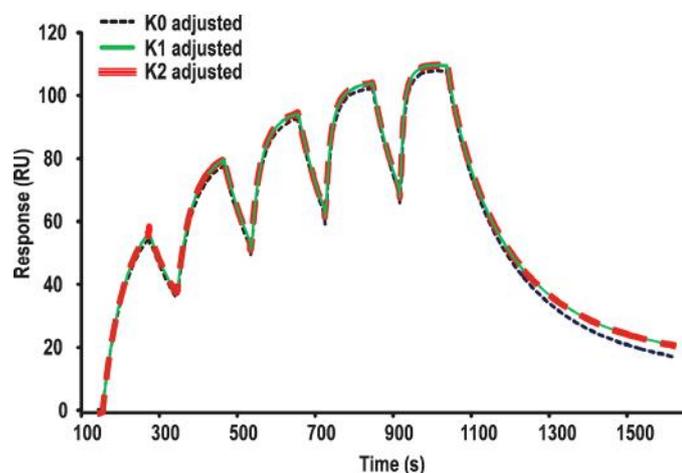


Figure 4. Overlay of adjusted single-cycle kinetics (SCK) sensorgrams of the three SCX fractions K0, K1 and K2 on human Fc γ RIIIa (Val-allotype) binding.

Table 2

Summary of the affinity/kinetic parameters calculated from SPR binding affinity experiments to the human Fc γ RIIIa receptor.

Avg k_{on} ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Avg k_{off} ($\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)	Avg K_D ($\times 10^{-9} \text{ M}$)
2.1±0.2	6.5±1.6	3.1±0.7
2.1±0.1	6.2±1.2	3.0±0.7
2.2±0.2	6.7±0.8	3.0±0.3
2.7±0.4	7.3±0.9	2.8±0.2

receptor (Hintersteiner *et al.*, 2016). They further assorted the characterization of their chimeric anti-GD2 antibody with a cell-based ADCC potency assay and concluded that both binding and potency were better for basic variants. However, further characterization of their SCX-fractionated basic fractions, demonstrated the variation of other quality attributes besides C-terminal lysine contents. N-glycosylation was especially shown to be “charge variant-dependent” in their study which makes it difficult to conclude solely about the C-terminal lysine impact. These N-glycosylational inconsistencies of the charge variants may have several explanations: it is known that during upstream process operations, glycosylation can fluctuate according to the culture period with changes in media and nutrient compositions and/or alterations of metabolic pathways and cell metabolism (Jain and Kumar, 2008; Park *et al.*, 2018). On the other hand, basic variants of mAbs may be most representative of the latter phase conditions of production *i.e.* with less time for carboxypeptidase-based proteolytic events. It is also another possibility that pH-gradient based SCX separation of charge variants is not the most robust to collect homogeneously glycosylated fractions due to the ability of such gradients to separate specific glycoforms. In our study, the three SCX fractions of interest did not present any significant altered N-glycosylation pattern *i.e.* with close fucosylation and galactosylation contents so as to conclude clearly to an absence of impact of C-terminal lysine clipping in the Fc interaction with the human Fc γ RIIIa receptor. To our best knowledge, this is the first study which clearly demonstrates the absence of relationship between C-terminal lysine variants and human Fc γ RIIIa receptor binding affinity.

3.3. Affinity chromatography to the human FcRn

FcRn is another key Fc receptor that strongly influences the PK profile of IgGs. Human FcRn binding was investigated by affinity chromatography, under conditions mimicking the pH-dependent recycling mechanism of FcRn with nanomolar affinity ligand binding at pH 6.0–6.5 and release at pH 7.0–7.4 (Vaughn and Bjorkman, 1998).

Fig. 5 shows the overlaid affinity chromatograms obtained for the three SCX fractions of interest. The chromatograms are highly superimposable and composed of a main peak eluted at 35.7 min and a minor pre-peak eluted at a slightly weaker RT of 34.2 min. Integration of UV absorbance signal at 280 nm indicates an abundance of about 94% for the main peak and about 6% for the pre-eluted one. This method, introduced by Schlothauer *et al.*, was shown to be an excellent new tool for the assessment of IgG integrity with good PK correlation (Schlothauer *et al.*, 2013). They particularly showed that oxidized IgG species displayed reduced RTs and SPR binding affinities. The oxidized species were also identified by MS in the pre-peak eluted at 34.2 min (data not shown) in accordance with the 5–6% of oxidized Fc detected by middle-up RP-LC/MS for the three SCX fractions. To note, SPR assays, using immobilized human FcRn chips, were also conducted, but results were marked by large random errors with a slightly greater tendency for the fraction K2 to bind the receptor, probably due to the negative charges of the DNA-coated chips (data not shown). Some authors reported the influence of biosensor formats on the binding of IgG to FcRn, as described for a mAb carrying a positively charged patch on its Fab domain responsible for a tighter binding to negatively charged surface of CM5 chips (Abdiche *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). As reported by Khawli *et al.* (2010), who particularly based their findings on rat sources

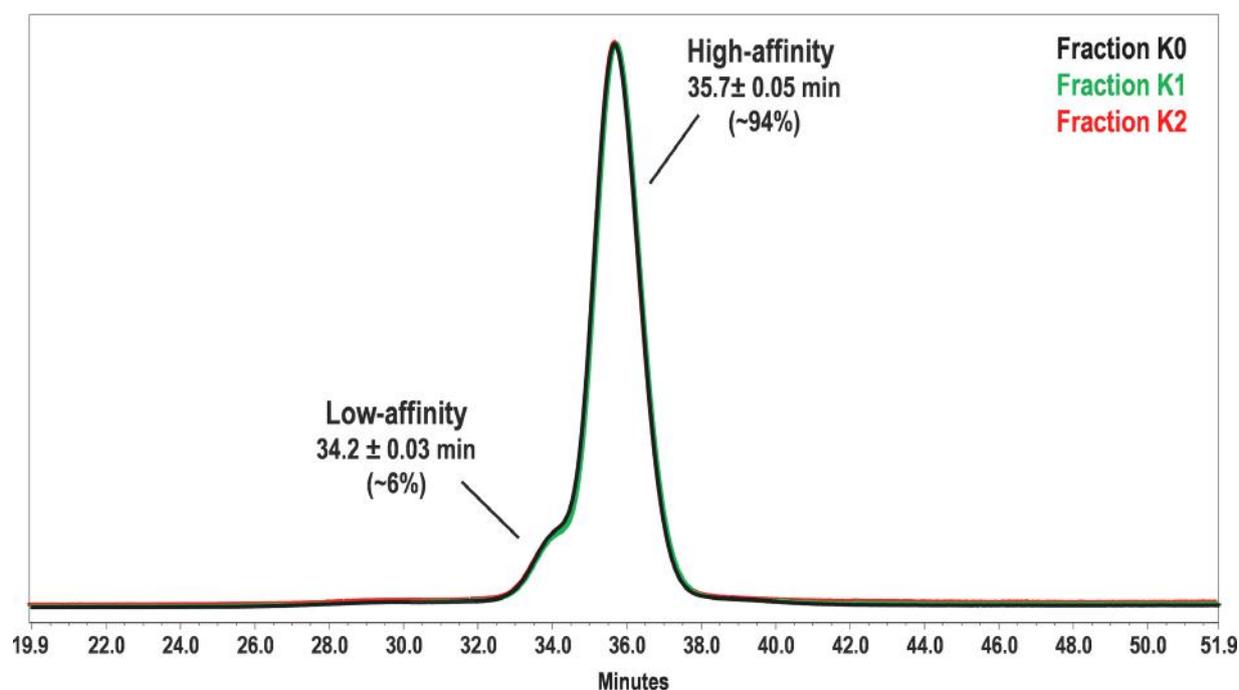


Figure 5. Overlay of affinity chromatograms on immobilized human FcRn of the three SCX fractions K0, K1 and K2.

of FcRn, our results confirm that C-terminal lysine clipping does not significantly impact the binding affinity of our IgG1 to human FcRn.

4. Conclusions

In this study, C-terminal lysine variants of an in-house IgG1 were tested to assess their impact on pharmacological activity. Affinity chromatography *versus* human FcRn and FcγRIIIa receptors was especially used to test for three charge variant preparations, obtained by preparative SCX chromatography and carrying zero, one and two C-terminal lysine(s). A thorough biophysical characterization of the prepared samples was performed and further characterization of the affinity separated peaks provided two orthogonal ways to verify the absence of differential microheterogeneities within the charge variant preparations and to conclude solely on the effect of the C-terminal lysine clipping attribute. Results presented here demonstrate that C-terminal lysine variants had no effect on the binding of human Fc to human FcRn and FcγRIIIa receptors, translating into no effect of the mAb on its FcRn-based PK profiles and FcγRIIIa-driven cytotoxicity potencies, respectively. Consequently, C-terminal lysine variants should not be considered here as a CQA in the QbD risk-assessment process of the molecule. More generally, this study emphasizes the high potential of affinity chromatography for the characterization and structure-function relationship evaluation of mAbs in biopharmaceutical development.

Funding sources

This study was fully supported by LFB Biotechnologies.

Declaration of Competing Interest

All the authors are employees of LFB Biotechnologies.

Acknowledgments

All the authors acknowledge Arthur Besle for his helpful technical support in the processing of SPR data.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ejps.2021.105730](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105730).

References

- Abdiche, Y.N., Yeung, Y.A., Chaparro-Riggers, J., Barman, I., Strop, P., Chin, S.M., Pham, A., Bolton, G., McDonough, D., Lindquist, K., Pons, J., Rajpal, A., 2015. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *MAbs* 7, 331–343.
- Alt, N., Zhang, T.Y., Motchnik, P., Taticek, R., Quarmby, V., Schlothauer, T., Beck, H., Emrich, T., Harris, R.J., 2016. Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles. *Biologicals* 44, 291–305.
- Antes, B., Amon, S., Rizzi, A., Wiederkum, S., Kainer, M., Szolar, O., Fido, M., Kircheis, R., Nechansky, A., 2007. Analysis of lysine clipping of a humanized Lewis-Y specific IgG antibody and its relation to Fc-mediated effector function. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 852, 250–256.
- Beck, A., Liu, H., 2019. Macro- and Micro-Heterogeneity of Natural and Recombinant IgG Antibodies. *Antibodies (Basel)* 8.
- Burmeister, W.P., Gastinel, L.N., Simister, N.E., Blum, M.L., Bjorkman, P.J., 1994. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 372, 336–343.
- Cai, B., Pan, H., Flynn, G.C., 2011. C-terminal lysine processing of human immunoglobulin G2 heavy chain in vivo. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 404–412.
- Chevieux, G., Tilly, N., Bihoreau, N., 2011. Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 415, 212–214.
- Chumsae, C., Gaza-Bulsecu, G., Sun, J., Liu, H., 2007. Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 850, 285–294.
- Dick Jr., L.W., Qiu, D., Mahon, D., Adamo, M., Cheng, K.C., 2008. C-terminal lysine variants in fully human monoclonal antibodies: investigation of test methods and possible causes. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 1132–1143.
- Faid, V., Denguir, N., Chapuis, V., Bihoreau, N., Chevieux, G., 2014. Site-specific N-glycosylation analysis of human factor XI: Identification of a noncanonical NXC glycosite. *Proteomics* 14, 2460–2470.
- Faid, V., Leblanc, Y., Bihoreau, N., Chevieux, G., 2018. Middle-up analysis of monoclonal antibodies after combined IgD and IdeS hinge proteolysis: Investigation of free sulfhydryls. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149, 541–546.
- Freimoser-Grundschober, A., Rueger, P., Fingas, F., Sondermann, P., Herter, S., Schlothauer, T., Umana, P., Neumann, C., 2019. FcγRIIIa chromatography to enrich a-fucosylated glycoforms and assess the potency of glycoengineered therapeutic antibodies. *J. Chromatogr. A* 460554.
- Harris, R.J., 1995. Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture. *J. Chromatogr. A* 705, 129–134.
- Hintersteiner, B., Lingg, N., Zhang, P., Woen, S., Hoi, K.M., Stranner, S., Wiederkum, S., Mutschlechner, O., Schuster, M., Loibner, H., Jungbauer, A., 2016. Charge

- heterogeneity: Basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors. *MAbs* 8, 1548–1560.
- Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S.A., Engen, J.R., 2010. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol. Cell Proteomics* 9, 1716–1728.
- Jain, E., Kumar, A., 2008. Upstream processes in antibody production: evaluation of critical parameters. *Biotechnol. Adv.* 26, 46–72.
- Khawli, L.A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z.W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D., Nijem, I., Allison, D.E., Wong, P.Y., Kao, Y.H., Quan, C., Joshi, A., Harris, R.J., Motchnik, P., 2010. Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *MAbs* 2, 613–624.
- Leblanc, Y., Ramon, C., Bihoreau, N., Chevreux, G., 2017. Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 degrees C. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1048, 130–139.
- Liu, H., Nowak, C., Shao, M., Ponniah, G., Neill, A., 2016. Impact of cell culture on recombinant monoclonal antibody product heterogeneity. *Biotechnol. Prog.* 32, 1103–1112.
- Martin, W.L., West Jr., A.P., Gan, L., Bjorkman, P.J., 2001. Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. *Mol. Cell* 7, 867–877.
- Niwa, R., Satoh, M., 2015. The current status and prospects of antibody engineering for therapeutic use: focus on glycoengineering technology. *J. Pharm. Sci.* 104, 930–941.
- Ouellette, D., Alessandri, L., Chin, A., Grinnell, C., Tarcsa, E., Radziejewski, C., Correia, I., 2010. Studies in serum support rapid formation of disulfide bond between unpaired cysteine residues in the VH domain of an immunoglobulin G1 molecule. *Anal. Biochem.* 397, 37–47.
- Park, S.Y., Reimonn, T.M., Agarabi, C.D., Brorson, K.A., Yoon, S., 2018. Metabolic responses and pathway changes of mammalian cells under different culture conditions with media supplementations. *Biotechnol. Prog.* 34, 793–805.
- Ponniah, G., Kita, A., Nowak, C., Neill, A., Kori, Y., Rajendran, S., Liu, H., 2015. Characterization of the acidic species of a monoclonal antibody using weak cation exchange chromatography and LC-MS. *Anal. Chem.* 87, 9084–9092.
- Reusch, D., Tejada, M.L., 2015. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes. *Glycobiology* 25, 1325–1334.
- Schlothauer, T., Rueger, P., Stracke, J.O., Hertenberger, H., Fingas, F., Kling, L., Emrich, T., Drabner, G., Seeber, S., Auer, J., Koch, S., Papadimitriou, A., 2013. Analytical FcRn affinity chromatography for functional characterization of monoclonal antibodies. *MAbs* 5, 576–586.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., Shitara, K., 2003. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 278, 3466–3473.
- Sondermann, P., Oosthuizen, V., 2002. X-ray crystallographic studies of IgG-Fc gamma receptor interactions. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 481–486.
- Thomann, M., Schlothauer, T., Dashivets, T., Malik, S., Avenal, C., Bulau, P., Ruger, P., Reusch, D., 2015. *in vitro* glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *PLoS. One.* 10, e0134949.
- van den Bremer, E.T., Beurskens, F.J., Voorhorst, M., Engelberts, P.J., de Jong, R.N., van der Boom, B.G., Cook, E.M., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., van Berkel, P.H., Parren, P. W., 2015. Human IgG is produced in a pro-form that requires clipping of C-terminal lysines for maximal complement activation. *MAbs* 7, 672–680.
- Vaughn, D.E., Bjorkman, P.J., 1998. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure* 6, 63–73.
- Wang, X., McKay, P., Yee, L.T., Dutina, G., Hass, P.E., Nijem, I., Allison, D., Cowan, K.J., Lin, K., Quarmby, V., Yang, J., 2017. Impact of SPR biosensor assay configuration on antibody: Neonatal Fc receptor binding data. *MAbs* 9, 319–332.

4. Conclusion

L'étude de la relation existante entre la structure et la fonction des protéines est fondamentale en biologie, c'est également particulièrement le cas des protéines thérapeutiques dont l'efficacité et l'innocuité doivent être vérifiées avant d'être administrées à des patients. Pour élucider la relation structure-fonction d'une albumine thérapeutique et d'un anticorps monoclonal, nous avons utilisé des méthodes de chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse pour la caractérisation structurale et des techniques de chromatographie d'affinité pour les tests d'activité biologique *in vitro*. Les résultats ont mis en évidence un impact négatif de la modification de trois acides aminés de l'albumine sur son interaction au récepteur FcRn, dont le rôle est de recycler cette protéine et qui lui confère une demi-vie prolongée dans le plasma. Ainsi, la modification de la Cys₃₄, la glycation de la Lys₅₂₅ et le clivage de la Leu₅₈₅ impactent négativement l'interaction albumine-FcRn, alors que d'autres modifications telles que le clivage de [Ala₁-Asp₂] et la glycation de Lys₁₉₅ et Lys₂₃₃ n'ont pas d'incidence. Ces résultats sont importants puisque ces modifications peuvent intervenir lors de la fabrication d'albumines thérapeutiques (modification de Cys₃₄) ou être la conséquence de pathologies. Nous avons également étudié l'impact de l'hétérogénéité de lysine C-terminale d'un anticorps monoclonal recombinant sur son activité pharmacocinétique (récepteur FcRn) et sur ses fonctions effectrices d'immunité (récepteur FcγRIIIa). Les anticorps sont synthétisés avec une lysine C-terminale sur chaque chaîne lourde pouvant être clivée par des carboxypeptidases présentes dans le milieu de culture, générant une hétérogénéité de la protéine. Pour évaluer l'impact de cette modification, les protéoformes K0, K1 et K2 ont été purifiées par IEX préparative, et ont subi une caractérisation structurale approfondie (IEX analytique, HILIC et RP-LC/MS) pour s'assurer de leur homogénéité (en dehors du taux de lysine C-terminale). Des analyses de chromatographie d'affinité aux récepteurs FcRn et FcγRIIIa ont permis d'établir l'absence d'impact de cette modification sur les fonctions effectrices et sur la pharmacocinétique de l'anticorps.

Discussion et perspectives

Les protéines thérapeutiques, comme tous les produits pharmaceutiques, doivent subir une caractérisation approfondie de leur structure, malgré la difficulté que représente l'analyse de molécules aussi complexes. Dans cette thèse, la caractérisation structurale de protéines thérapeutiques a été entreprise par le développement de méthodes de chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse (LC-MS), mais également à l'aide d'approches innovantes de préparation d'échantillons. Si l'analyse structurale d'une protéine est complexe, c'est d'autant plus vrai lorsqu'il s'agit d'un mélange hétérogène de protéines comme les préparations d'immunoglobulines G polyclonales (IGIV) purifiées à partir de plasma sanguin. Les IGIV présentent un degré d'hétérogénéité élevé en raison de leurs parties variables qui ciblent un grand nombre d'antigènes différents. Cette hétérogénéité est incompatible avec certaines analyses structurales, notamment pour la caractérisation de modifications post-traductionnelles. Les études de caractérisation se limitent souvent à l'analyse des taux de fragmentation ou d'agrégation par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ou par SDS-PAGE. Nous avons développé une stratégie analytique permettant de caractériser les modifications de structure primaire de ce type de produit malgré leur forte hétérogénéité. Cette stratégie consiste à séparer, grâce à une enzyme, la partie variable $F(ab')_2$, qui fixent les antigènes et est la source d'une forte hétérogénéité, de la partie constante $Fc/2$ dont la faible hétérogénéité est compatible avec une analyse LC-MS. Les fragments $Fc/2$ des quatre sous-classes d'IgG sont ensuite analysés par chromatographie de phase inverse, qui permet une séparation efficace de ces derniers, et qui est compatible avec la spectrométrie de masse. Cette méthodologie rend alors possible la caractérisation de modifications chimiques pouvant impacter la partie $Fc/2$ des IGIV telles que l'oxydation et la glycation.

L'oxydation est une modification chimique pouvant affecter les protéines en solution. Dans le cas des IgG, les résidus Met_{252} et Met_{428} de la région Fc présentent des surfaces d'accessibilité au solvant importantes qui en font des sites préférentiels d'oxydation. Par ailleurs, ces deux résidus sont situés à l'interface des domaines CH_2 et CH_3 , dans l'environnement proche du site d'interaction de la partie Fc avec le récepteur $FcRn$. Des études ont montré que l'oxydation de Met_{252} et Met_{428} diminue l'interaction du complexe IgG- $FcRn$ avec de possibles conséquences

sur les propriétés pharmacocinétiques des IgG [56]. Le niveau d'oxydation de ces résidus peut donc être considéré comme un attribut critique de qualité qui doit être évalué. En séparant les formes oxydées de fragments Fc/2, la méthode LC-MS que nous avons développée, associée à une approche de type *middle-up*, nous a permis de déterminer le niveau d'oxydation des IGIV malgré leur degré élevé d'hétérogénéité. Grâce à cette méthode, il est désormais possible d'évaluer l'impact, en termes d'oxydation, des procédés de fabrication ou de conservation à long terme sous forme liquide de ces produits biopharmaceutiques.

Cette méthode a également démontré son efficacité pour la caractérisation de formes glyquées d'IGIV. En effet, la fonction aldéhyde d'un sucre réducteur peut réagir avec la fonction amine d'une protéine à travers la réaction de Maillard, fixant de manière covalente ce dernier à la protéine. Or, il existe de nombreuses préparations commerciales d'IGIV, dont les excipients utilisés pour stabiliser les protéines en solution sont des sucres réducteurs tels que le glucose ou le maltose. Jusqu'à présent, l'absence de méthodes analytiques suffisamment performantes empêchait d'évaluer l'impact de ces excipients saccharidiques sur les IGIV. Pour y remédier, nous avons procédé à une étude de stabilité avec des préparations d'IGIV formulées avec des sucres réducteurs (glucose et maltose) et non-réducteurs (tréhalose et saccharose) sur 6 mois à quatre températures différentes. Le taux de glycation des fragments Fc/2 des échantillons a été estimé grâce aux spectres de masse après analyse avec la méthode LC-MS décrite précédemment. Si les sucres non-réducteurs n'ont pas d'impact sur la protéine en termes de glycation, les IGIV formulées avec des sucres réducteurs et conservées dans des conditions préconisées par les fabricants (jusqu'à 6 mois à 25°C) présentent des taux importants de glycation de la partie Fc/2. En effet, dans ces conditions, jusqu'à 3 molécules de sucres peuvent se fixer sur les fragments Fc/2 avec de potentielles conséquences sur la stabilité et l'activité de la protéine. Les niveaux de glycation observés pour les IGIV formulées avec des sucres réducteurs sont presque comparables à ceux rapportés dans la littérature chez des patients diabétiques. Cette étude met en évidence le risque lié à l'injection à des patients de produits biopharmaceutiques dont les principes actifs et les excipients peuvent réagir entre eux.

Cette méthodologie analytique permet de caractériser les modifications chimiques de la partie Fc/2 des IGIV, mais nous pouvons également considérer que les modifications observées sur cette partie des IgG peuvent constituer des marqueurs de modifications chimiques de

l'ensemble de la protéine. En effet, des niveaux élevés d'oxydation ou de glycation de la partie Fc peuvent suggérer l'existence de modifications similaires sur le reste de la protéine (au niveau des parties variables non-analysables). Ces modifications pouvant avoir pour conséquence une baisse de l'activité biologique de la protéine, en particulier si ces acides aminés sont impliqués dans le site de reconnaissance d'un antigène. L'impact de l'oxydation des méthionines de la partie Fc sur l'activité biologique d'anticorps monoclonaux a déjà fait l'objet de nombreuses études. Néanmoins, il serait pertinent d'évaluer l'impact de l'oxydation et de la glycation sur l'activité biologique des IGIV à travers des études de relations structure/fonction associant des analyses LC-MS et des tests d'activité biologique *in vitro* et/ou *in vivo*.

Pour l'heure, ce type de méthode LC-MS n'est pas requis par les agences réglementaires pour l'analyse des IGIV. Le taux d'oxydation, pouvant diminuer les propriétés pharmacocinétiques du produit, n'est pas évalué et des IGIV sont commercialisées alors que certains de ces produits contiennent des excipients (des sucres réducteurs) qui peuvent réagir avec les principes actifs (les protéines) au lieu de les stabiliser. Cela souligne l'importance du travail d'innovation analytique dans le domaine des protéines thérapeutiques et de l'industrie pharmaceutique, ainsi que la nécessaire évolution des exigences réglementaires pour la caractérisation des protéines thérapeutiques d'origine plasmatisque.

Dans le cas des IGIV, l'utilisation d'enzymes spécifiques des IgG pour analyser des fragments d'anticorps (approche *middle-up*) permet de focaliser l'analyse sur la partie constante et de rendre le produit analysable par LC-MS. Cette approche permet également d'améliorer les performances de séparation chromatographique et d'analyse MS en réduisant la taille des fragments analysés. Les formes oxydées ou partiellement réduites peuvent être séparées des formes natives pour une meilleure quantification relative et une meilleure identification MS. Enfin, cette approche permet de fournir des informations préliminaires sur la localisation de ces modifications. Cette stratégie analytique est très utilisée pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux et peut être déclinée sous de multiples formes (différents types d'enzymes protéolytiques et de chromatographie, avec ou sans MS/MS)

Si la chromatographie de phase inverse (RP-LC) est très répandue pour l'analyse des protéines en raison des performances chromatographiques qu'elle apporte et pour sa compatibilité avec la spectrométrie de masse, ce n'est pas la technique de choix pour

caractériser certaines modifications chimiques de protéines entières telle que la déamidation. D'autre part, les conditions dénaturantes d'analyse conduisent à une perte d'information structurale (dénaturation des structures secondaire, tertiaire et quaternaire / dissociation des complexes non-covalents). Une partie importante des travaux présentés dans cette thèse concernent le développement de méthodes de spectrométrie de masse native et plus particulièrement le couplage direct de la chromatographie d'échange d'ions avec la spectrométrie de masse (IEX-MS). La chromatographie d'échange d'ions est une des techniques de référence pour la caractérisation des modifications chimiques induisant une modification de la charge des protéines. Cette technique emploie traditionnellement des phases mobiles contenant des sels minéraux (phosphate, Na/Cl) non-volatils, incompatibles avec des analyses par spectrométrie de masse. Mais la substitution de ces sels par des sels volatils tel que l'acétate d'ammonium rend possible le couplage de l'IEX avec une source *electrospray* pour une identification directe par MS des protéoformes séparées par cette méthode. Nous avons d'abord développé, puis optimisé une méthode IEX-MS pour l'analyse d'anticorps monoclonaux avec différentes approches de préparation d'échantillon pour une caractérisation au niveau de la protéine entière ou au niveau de fragments protéiques générés par des enzymes spécifiques. L'analyse d'un anticorps entier permet de fournir rapidement des informations non-biaisées sur la structure de la protéine, mais l'hétérogénéité liée à l'effet cumulatif de plusieurs modifications peut rendre l'interprétation des données complexe. L'approche *middle-up* consistant à fragmenter l'anticorps avec une/des enzyme(s) permet de fournir une meilleure résolution chromatographique et une meilleure précision de masse pour l'identification des protéoformes. Cela permet également de fournir une première localisation des modifications sur l'anticorps. Enfin, nos travaux sur l'albumine ont conduit au développement d'une méthode IEX-MS permettant une caractérisation approfondie de différentes modifications chimiques pouvant affecter cette protéine. D'autre part, les conditions natives d'analyses ont permis de caractériser le complexe non-covalent Albumine-Cu(II) et ouvre la voie à la caractérisation de complexes protéiques non-covalent par IEX-MS. Traditionnellement, l'identification des protéoformes séparées par IEX nécessite la collecte des pics puis une analyse *bottom-up* (LC-MS/MS) des fractions. Mais il s'agit d'un processus long dont les différentes étapes peuvent induire des dégradations artéfactuelles biaisant les

résultats. De plus, l'analyse RP-LC-MS/MS des protéoformes digérées sous forme de peptides conduit inévitablement à une perte d'informations structurales. Des stratégies d'automatisation par chromatographie multi-dimensionnelle ont été développées pour permettre indirectement le couplage de l'IEX avec la spectrométrie de masse. Cela permet de réduire les temps d'analyse et d'améliorer la reproductibilité, mais ces procédés font intervenir des dispositifs complexes et la dernière dimension chromatographique en phase inverse conduit toujours à une perte d'information structurale. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de sels volatils dans les phases mobiles de méthodes IEX, permettant un couplage direct avec la spectrométrie de masse, a marqué un tournant pour la caractérisation des protéines. Le temps d'analyse est identique à celui d'une méthode IEX-UV, mais les informations fournies par la spectrométrie de masse permettent une première identification directe des protéines et des protéoformes séparées. Enfin, les conditions natives d'analyse permettent de préserver les structures secondaires, tertiaires et quaternaires. Ainsi, des modifications conformationnelles se traduisant par une variation de la distribution des états de charge (CSD : *Charge State Distribution*) sur les spectres MS natifs peuvent être détectées. L'interprétation des variations de CSD observées en IEX-MS doit néanmoins être appréhendée avec précaution puisque ces variations peuvent être la conséquence de la concentration élevée en sels ou du pH extrême nécessaires à l'élution plutôt qu'à une dénaturation [175]. Cette méthode peut également permettre l'étude de complexes non-covalents si les interactions des complexes en question sont suffisamment fortes pour résister à l'effet de dilution de la chromatographie. Depuis 2017, les études employant l'IEX-MS se sont multipliées pour la caractérisation de protéines telles que des anticorps monoclonaux [149,203], des anticorps conjugués [204], l'ovalbumine [205] ou l'érythropoïétine [206]. Cette approche est certainement amenée à se démocratiser pour la caractérisation des protéines dans le cadre pharmaceutique ou académique. Néanmoins, tout le potentiel de l'approche IEX-MS n'a pas encore été complètement exploité. Shi *et al.* ont décrit l'association de l'approche *top-down* (fragmentation en phase gazeuse de la protéine entière) et de l'IEX-MS pour la caractérisation des sites d'oxydation d'un anticorps bi-spécifique [207]. Cette étude montre le potentiel de l'IEX combinée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) pour l'identification et la localisation des modifications sur la protéine, sans avoir nécessairement recours à une analyse *bottom-up* (digestion enzymatique puis analyse RP-LC-MS/MS). Une autre approche qui semble extrêmement prometteuse est l'association de

l'IEX-MS avec la mobilité ionique. Il existe plusieurs exemples d'études associant la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) à l'IM-MS [208–210], mais le plus souvent la SEC sert plus de méthode de dessalage en ligne que pour la séparation de protéoformes. A notre connaissance, aucune étude ne décrit l'utilisation de l'IEX combinée à la mobilité ionique, or les conditions d'analyse native et le pouvoir de séparation de l'IEX associée à l'IM-MS semblent parfaitement adaptés à l'analyse conformationnelle des protéines. De plus, l'IEX étant particulièrement sensible aux modifications de distribution de charges à la surface des protéines, cette technique pourrait être utile à la séparation de conformères, et faciliter leur caractérisation par mobilité ionique.

Les travaux de caractérisation structurale présentés dans cette thèse montrent la puissance et la robustesse des techniques de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour l'identification de modification post-traductionnelles des protéines. Nous avons vu précédemment que la caractérisation d'une modification nécessite souvent de tenir compte de toutes les informations disponibles, la masse des protéoformes observées, mais également le comportement chromatographique de ces dernières. En effet, certaines modifications telle que la déamidation (+1 Da) ou la réduction de ponts disulfures (+ 2 Da) induisent de faibles variations de masses rendant leur identification difficile pour une analyse de la protéine entière, même avec un spectromètre de masse haute résolution. C'est alors le comportement chromatographique de la protéoforme qui va constituer un indice majeur sur l'identité de cette modification. De même, lorsque qu'une protéoforme peu abondante est détectée avec un signal MS et une précision de masse faibles, conduisant à une mesure de masse approximative, c'est le temps de rétention de cette dernière qui peut permettre une première identification de la modification observée. Toujours dans le cas d'une protéoforme observée en faible abondance, le recours à des stress forcés (oxydation, variation de pH), de réactifs chimiques (glucose, cysteinylglycine...) ou d'enzymes (carboxypeptidase A) peut être envisagé pour enrichir les échantillons d'une protéoforme présentant une modification d'intérêt. Mais finalement, la localisation des modifications d'une protéine sur sa séquence en acides aminés nécessite toujours l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem par les approches *bottom-up*, *top-down* ou *middle-down*.

L'étude de la structure des protéines thérapeutiques revêt une grande importance, mais évaluer l'impact que peuvent avoir les différentes caractéristiques structurales d'une protéine sur son activité biologique est primordiale. L'albumine (HSA) est une protéine plasmatique avec une demi-vie élevée grâce à son interaction avec le récepteur FcRn. C'est également une protéine qui peut subir de nombreuses modifications chimiques ou enzymatiques dans le plasma, dont certaines ont pour origine des pathologies comme le diabète, la cirrhose du foie ou la pancréatite. Si l'impact des modifications des IgG sur l'affinité au récepteur FcRn a été largement étudié, ce n'est pas le cas de l'albumine dont l'interaction avec ce récepteur n'a été découverte qu'en 2003. Nous avons donc étudié l'impact des modifications pouvant affecter l'interaction de l'albumine avec le récepteur FcRn (et donc potentiellement sur sa demi-vie) à l'aide d'une méthode de chromatographie d'affinité mettant en jeu le récepteur FcRn mimant ici le mécanisme physiologique de recyclage de cette protéine. Pour la caractérisation structurale des protéoformes séparées par chromatographie d'affinité, nous avons utilisé une méthode IEX-MS permettant d'identifier les modifications altérant (ou non) l'interaction HSA/FcRn. Ces travaux ont montré que des modifications telles que l'oxydation de Cys₃₄ (cirrhose), la glycation de Lys₅₂₅ (diabète) et le clivage de Leu₅₈₅ (pancréatite) impactent négativement l'affinité de l'albumine au récepteur FcRn et concernent des résidus proches du site d'interaction au récepteur.

L'hypoalbuminémie peut s'expliquer par une diminution de la synthèse d'albumine dans le foie ou par un phénomène d'inflammation qui induit une augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins et une diffusion de l'albumine dans le fluide extra-cellulaire. Cependant, d'autres facteurs sont évalués pour expliquer l'hypoalbuminémie puisqu'elle est également observée pour des pathologies ne s'accompagnant pas de baisse de synthèse de la protéine ou d'inflammation. L'hypothèse d'une baisse de la demi-vie de la protéine est alors une possibilité. Nos travaux montrent *in vitro* que l'oxydation de Cys₃₄, le clivage de Leu₅₈₅ et la glycation de Lys₅₂₅ induisent une diminution de l'interaction HSA-FcRn et ouvrent la voie à des études *in vivo* pour évaluer la significativité biologique de ces baisses d'affinité sur la demi-vie de l'albumine. Une réponse à cette question a été partiellement apportée en 2020 par Nilsen *et al.* [211] dans une étude où ils démontrent au travers de méthodes de caractérisation structurale (H/DX-MS, LC-MS/MS) et des études d'activité biologique *in vivo* (tests cellulaires,

test animaux, cas cliniques), une baisse très significative de la demi-vie de l'albumine ayant subi un clivage de Leu₅₈₅. Ces résultats permettent de confirmer *in vivo* l'impact négatif de cette modification sur la demi-vie de l'albumine, et par conséquent, de valider l'approche de notre étude *in vitro* sur la relation structure/fonction HSA-FcRn en lien avec la demi-vie de la protéine. Cependant, d'autres études *in vivo* concernant l'oxydation de Cys₃₄ et la glycation de Lys₅₂₅ doivent être menées avec des tests sur des souris transgéniques (modifiées génétiquement avec des récepteurs FcRn humains) ou par l'étude structurale d'albumines de patients cirrhotiques et diabétiques souffrant d'hypoalbuminémie pour confirmer l'impact physiologique réel de ces modifications sur la demi-vie de l'albumine.

D'un point de vue pharmaceutique, l'albumine thérapeutique est surtout utilisée pour ses propriétés oncotiques dans le traitement de l'hypovolémie, bien que d'autres indications thérapeutiques fassent l'objet d'investigations (traitement des ascites, du syndrome néphrotique ou des pancréatites). Plus récemment, ce sont les propriétés pharmacocinétiques de l'albumine que la recherche biomédicale a cherché à exploiter à travers le développement de protéines de fusion. En effet, la capacité de l'albumine à fixer le récepteur FcRn est utilisée pour produire des protéines de fusion composées d'une albumine et d'une autre protéine thérapeutique telles que des facteurs de la coagulation, de l'insuline ou des hormones de croissance dans le but d'augmenter leur demi-vie [212–214]. L'étude des propriétés pharmacocinétiques de ce type de produit revêt alors une grande importance et des albumines recombinantes ont été développées par bio-ingénieries dans le but d'obtenir une affinité accrue au récepteur FcRn et donc une demi-vie encore plus élevée [215].

Une modification fréquemment observée lors de la production d'anticorps monoclonaux est le clivage de la lysine en position C-terminale des chaînes lourdes de l'anticorps par des protéases présentes dans le milieu de culture. Ces clivages induisent une hétérogénéité structurale dont l'impact sur les propriétés biologiques des anticorps thérapeutiques doit être évalué. Pour cela, nous avons purifié par chromatographie d'échanges d'ions les trois protéoformes d'un anticorps disposant de deux lysines C-terminales (K2), d'une lysine C-terminale (K1) ou ayant subi un clivage complet des deux lysines C-terminales (K0). Ces trois protéoformes ont subi une caractérisation approfondie pour s'assurer de leur homogénéité structurale en dehors de la partie C-terminale des chaînes lourdes. Cette étape est primordiale puisque certaines

caractéristiques structurales, notamment le taux de fucosylation des N-glycannes ou l'oxydation, peuvent avoir un impact significatif sur l'activité biologique. L'activité biologique de ces trois protéoformes a ensuite été évaluée *in vitro* par chromatographie d'affinité et par résonance plasmonique de surface pour le récepteur FcγRIIIa, impliqué dans les fonctions effectrices d'immunité de l'anticorps, et pour le récepteur FcRn, responsable des propriétés pharmacocinétiques. Nos résultats n'ont montré aucun impact du nombre de lysines en position C-terminale des chaînes lourdes sur l'affinité de la partie Fc de l'anticorps pour ces deux récepteurs. Une précédente étude publiée par Hintersteiner et al. [216] avait démontré pour un anticorps chimérique une augmentation d'affinité aux récepteurs FcRn et FcγRIIIa des formes basiques purifiées par chromatographie d'échange d'ions (riches en protéoformes avec lysines C-terminales). Cependant, leur étude démontrait également l'existence d'une hétérogénéité structurale entre les fractions en termes d'oxydation et de glycosylation qui sont des modifications connues pour impacter l'affinité des anticorps aux récepteurs FcRn et FcγRIIIa. Ces résultats controversés expliquent le protocole rigoureux de caractérisation structurale utilisé lors de notre étude pour évaluer avec fiabilité l'impact des lysines C-terminales d'un anticorps sur ses propriétés biologiques.

Ces deux études ont mis en évidence l'intérêt de la chromatographie d'affinité comme test d'activité *in vitro* dans le cadre d'études sur la relation structure/fonction des protéines. En effet, cette technique permet d'une part de séparer les protéoformes en mélange présentant des affinités différentes pour un récepteur, là où la résonance plasmonique de surface détermine des constantes d'affinité moyennes de l'échantillon. D'autre part, la chromatographie d'affinité offre la possibilité de collecter des fractions pour déterminer les différences structurales entre les espèces ayant des interactions différentes vis-à-vis du récepteur d'intérêt. Pour une identification directe des protéoformes ayant des affinités différentes pour un récepteur, le couplage de la chromatographie d'affinité avec la spectrométrie de masse est envisageable par l'utilisation de sels volatils dans la phase mobile. Cela a été démontré par Gahoual et al. [113] en couplant une colonne d'affinité au récepteur FcRn à un spectromètre de masse pour la caractérisation de formes oxydées d'un anticorps monoclonal. Ce type d'études *in vitro* est un préalable à des tests d'activité biologiques *in vivo*

plus approfondis pour déterminer l'impact physiologique des caractéristiques structurales de protéines.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans cette thèse abordent comme problématique principale la caractérisation structurale des protéines, et plus particulièrement dans un contexte pharmaceutique.

Dans la première partie, nous avons réalisé une revue bibliographique détaillant les modes de fabrication et les indications thérapeutiques des principales classes de protéines thérapeutiques, qu'elles soient d'origine plasmatisque ou recombinante. Nous avons également rappelé l'importance de la caractérisation de la structure des protéines dans l'étude de leurs fonctions biologiques et pour leur utilisation comme produits biopharmaceutiques. Enfin, nous avons dressé un état de l'art des différentes techniques d'analyse des protéines par chromatographie liquide et par spectrométrie de masse, ainsi que différentes stratégies de préparation d'échantillon permettant leur caractérisation.

La seconde partie de cette thèse traite des travaux que nous avons publiés sur la caractérisation des protéines thérapeutiques par chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse, ainsi que sur l'étude de la relation entre la structure et les fonctions biologiques de protéines thérapeutiques.

- Nous avons développé une méthode RP-LC/MS associée à une approche *middle-up* pour l'analyse d'IgG. L'utilisation d'enzymes spécifiques permet de générer des fragments d'anticorps de taille réduite fournissant une meilleure séparation chromatographique et une analyse MS plus performante. Mais cette approche a surtout permis l'analyse par LC-MS de préparation hétérogène d'IgG polyclonales (IGIV) en focalisant l'analyse sur la partie constante (fragments Fc/2) de ces protéines. Cette analyse a rendu possible la détermination du niveau d'oxydation des IgG, connu pour réduire leurs propriétés pharmacocinétiques, et a permis de mettre en évidence le risque de glycation lié à l'utilisation de sucres réducteurs comme excipients pour ce type de produits. Cette méthode a également démontré son efficacité pour l'étude de l'intégrité des ponts disulfures d'anticorps monoclonaux.
- Nos travaux portent également sur le développement du couplage de la chromatographie d'échange d'ions (IEX) avec la spectrométrie de masse native. L'IEX est une méthode de

référence pour évaluer les variations de charge des protéines, mais est, dans sa configuration classique, incompatible avec un couplage MS. Par l'utilisation de sels volatils dans les phases mobiles d'IEX, nous avons développé une méthode de couplage IEX-MS pour la caractérisation de modifications chimiques impactant des protéines telles que des anticorps monoclonaux ou l'albumine. L'identification directe par MS des protéoformes séparées par IEX est alors possible, réduisant considérablement les temps d'analyse et fournissant des informations sur la conformation des protéines ou sur des complexes protéiques non-covalents.

- Enfin, nous avons étudié la relation structure/fonction de deux protéines thérapeutiques grâce à une caractérisation structurale par LC-MS et à des tests d'activité biologique *in vitro*. Nous avons démontré que trois modifications chimiques de l'albumine, l'oxydation de Cy₃₄, la glycation de Lys₅₂₅, et le clivage de Leu₅₈₅, réduisent l'affinité de la protéine pour le récepteur néonatal Fc (FcRn) et peuvent potentiellement affecter la demi-vie de la protéine dans le plasma. Nous avons également mené des investigations sur l'impact biologique du clivage de la lysine en position C-terminale des chaînes lourdes d'un anticorps monoclonal. Grâce à une caractérisation structurale rigoureuse, nos résultats ont montré de manière non-équivoque que cette modification n'a pas d'impact sur les fonctions effectrices d'immunité (affinité au récepteur FcγRIIIa) et sur les propriétés pharmacocinétiques (affinité au récepteur FcRn) de l'anticorps.

Ces travaux offrent des perspectives intéressantes concernant l'analyse de protéines thérapeutiques. Ainsi, malgré leur hétérogénéité, l'analyse des modifications chimiques d'IgG polyclonales est désormais possible et devrait conduire à une évolution des exigences réglementaires quant à la caractérisation de ce type de produits pharmaceutiques. Le couplage de l'IEX avec la spectrométrie de masse marque une avancée pour la caractérisation des protéines, par le gain de temps et par les informations structurales qu'elle fournit. Il y a peu de doute sur le fait que les applications concernant l'IEX-MS soient amenées à se multiplier à l'avenir pour l'analyse de différentes protéines ou complexes protéiques et en combinaison avec d'autres techniques de spectrométrie de masse. Enfin, l'étude sur la relation structure/fonction entre l'albumine et le récepteur FcRn nécessite des investigations *in vivo*

complémentaires, mais ouvre la voie vers une meilleure compréhension de certaines pathologies impliquant cette protéine.

La partie résultats de cette thèse regroupe des articles publiés entre 2014 et 2019, et si ces travaux sont classés par thématiques, il est intéressant d'observer qu'il y a également une cohérence chronologique, qui reflète l'évolution de mon parcours scientifique sur cette période. En effet, mes premiers travaux publiés concernent l'utilisation d'une technique chromatographique répandue pour l'analyse des protéines (RP-LC), et facilement compatible avec la spectrométrie de masse. La principale innovation concerne l'utilisation d'une stratégie de préparation d'échantillon permettant l'analyse par LC-MS de protéines hétérogènes dont la caractérisation structurale était jusque-là assez « rudimentaire ». Le couplage de la chromatographie d'échange d'ions avec la spectrométrie de masse native est une innovation importante présentée dans cette thèse et répond à une problématique rencontrée depuis longtemps pour l'analyse de protéines à visée pharmaceutique. Si ce type de couplage avait pu être développé bien avant, puisqu'il ne nécessite qu'un système chromatographique HPLC et un spectromètre de masse haute résolution, la première méthode IEX-MS pour l'analyse de protéines n'a été décrite qu'en 2015 par Muneeruddin et al. Nos travaux publiés en 2017 décrivent pour la première fois la caractérisation par IEX-MS de protéines avec des structures complexes telles que des anticorps monoclonaux et l'albumine. Enfin, par un cheminement logique, les derniers articles publiés concernent l'évaluation de l'impact de caractéristiques structurales sur les fonctions biologiques d'une protéine. Si la base de notre métier est de caractériser la structure des protéines, il est stimulant d'aller plus loin en évaluant la relation entre les éléments de structure et les fonctions biologiques de ces biomolécules. Pour cela, nous disposons d'outils *in vitro* telle que la chromatographie d'affinité qui peuvent permettre d'apporter une première réponse à cette question, et d'orienter de futures études *in vivo*.

Cette thèse s'inscrit dans une démarche d'obtention d'un doctorat par validation des acquis de l'expérience sur la base de travaux de recherche que j'ai publiés. La rédaction de ce manuscrit m'a permis de les appréhender avec un regard nouveau. Le travail bibliographique effectué lors de la rédaction de cette thèse m'a également permis de consolider et d'approfondir mes connaissances scientifiques, voire d'en acquérir de nouvelles. Cette démarche a ainsi pour objectif de confronter mes travaux de recherche à l'examen par

l'institution académique et universitaire, pour l'obtention d'un diplôme qui devrait me permettre de poursuivre et de faire évoluer ma carrière professionnelle dans le domaine de la recherche et du développement en biotechnologie.

Références

- [1] J. Hartmann, H.G. Klein, Supply and demand for plasma-derived medicinal products - A critical reassessment amid the COVID-19 pandemic, *Transfusion*. 60 (2020) 2748–2752. <https://doi.org/10.1111/trf.16078>.
- [2] T. Burnouf, Modern Plasma Fractionation, *Transfusion Medicine Reviews*. 21 (2007) 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2006.11.001>.
- [3] T. Burnouf, Plasma fractionation, *ISBT Science Series*. 7 (2012) 62–67. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2012.01557.x>.
- [4] E.J. Cohn, J.L. Oncley, L.E. Strong, W.L. Hughes, S.H. Armstrong, CHEMICAL, CLINICAL, AND IMMUNOLOGICAL STUDIES ON THE PRODUCTS OF HUMAN PLASMA FRACTIONATION. I. THE CHARACTERIZATION OF THE PROTEIN FRACTIONS OF HUMAN PLASMA 12, *Journal of Clinical Investigation*. 23 (1944) 417–432. <https://doi.org/10.1172/jci101508>.
- [5] Pool 1964 High-potency Antihemophilic Factor Concentrate, (n.d.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/203312a0>.
- [6] C.K. Kasper, Judith Graham Pool and the discovery of cryoprecipitate, *Haemophilia*. 18 (2012) 833–835. <https://doi.org/10.1111/hae.12042>.
- [7] S. Barandun, P. Kistler, F. Jeunet, H. Isliker, Intravenous Administration of Human γ -Globulin*, *Vox Sanguinis*. 7 (1962) 157–174. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1962.tb03240.x>.
- [8] S. Barandun, P. Kistler, F. Jeunet, H. Isliker, Intravenous Administration of Human γ -Globulin, *Vox Sanguinis*. 7 (1962) 157–174. <https://doi.org/10.1159/000464763>.
- [9] A. Farrugia, P. Poulis, Intravenous immunoglobulin: Regulatory perspectives on use and supply, *Transfusion Medicine*. 11 (2001) 63–74. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00288.x>.
- [10] T. Burnouf, Modern Plasma Fractionation, *Transfusion Medicine Reviews*. 21 (2007) 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2006.11.001>.

- [11] T. Burnouf, Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 664 (1995) 3–15. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00532-A](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00532-A).
- [12] T. Burnouf, Fractionnement plasmatique international : état des lieux, *Transfusion Clinique et Biologique*. 14 (2007) 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2007.04.002>.
- [13] T. Burnouf, Recombinant plasma proteins, *Vox Sanguinis*. 100 (2011) 68–83. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2010.01384.x>.
- [14] J.L.C. Miller, J. Petteway, D.C. Lee, Ensuring the pathogen safety of intravenous immunoglobulin and other human plasma-derived therapeutic proteins, in: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Mosby Inc., 2001. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.117823>.
- [15] T. Burnouf, Plasma fractionation, *ISBT Science Series*. 7 (2012) 62–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2012.01557.x>.
- [16] B. Flan, S. Arrabal, Manufacture of plasma-derived products in France and measures to prevent the risk of vCJD transmission: Precautionary measures and efficacy of manufacturing processes in prion removal, *Transfusion Clinique et Biologique*. 14 (2007) 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2007.04.008>.
- [17] M. Stucki, N. Boschetti, W. Schäfer, T. Hostettler, F. Käsermann, T. Nowak, A. Gröner, C. Kempf, Investigations of prion and virus safety of a new liquid IVIG product, *Biologicals*. 36 (2008) 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2008.01.004>.
- [18] T. Burnouf, M. Radosevich, Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products, *Haemophilia*. 9 (2003) 24–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00701.x>.
- [19] T. Burnouf, Actualités sur les médicaments dérivés du sang, *Hématologie*. 14 (2008) 36–47. <https://doi.org/10.1684/hma.2008.0200>.

- [20] F.A. Ofose, J. Freedman, J.W. Semple, Plasma-derived biological medicines used to promote haemostasis, *Thrombosis and Haemostasis*. 99 (2008) 851–862. <https://doi.org/10.1160/TH07-10-0592>.
- [21] U.I. Ekeowa, B. Gooptu, D. Belorgey, P. Hägglöf, S. Karlsson-Li, E. Miranda, J. Pérez, I. MacLeod, H. Kroger, S.J. Marciniak, D.C. Crowther, D.A. Lomas, α 1-Antitrypsin deficiency, chronic obstructive pulmonary disease and the serpinopathies, *Clinical Science*. 116 (2009) 837–850. <https://doi.org/10.1042/CS20080484>.
- [22] A. Farrugia, P. Poulis, Intravenous immunoglobulin: regulatory perspectives on use and supply, *Transfusion Medicine*. 11 (2001) 63–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00288.x>.
- [23] O.C. BRUTON, AGAMMAGLOBULINEMIA, *Pediatrics*. 9 (1952) 722. <http://pediatrics.aappublications.org/content/9/6/722.abstract>.
- [24] P. Imbach, V. d'APUZZO, A. Hirt, E. Rossi, M. Vest, S. Barandun, C. Baumgartner, A. Morell, M. Schöni, H.P. Wagner, HIGH-DOSE INTRAVENOUS GAMMAGLOBULIN FOR IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA IN CHILDHOOD, *The Lancet*. 317 (1981) 1228–1231. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)92400-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)92400-4).
- [25] G.M. Liunbruno, F. Bennardello, A. Lattanzio, P. Piccoli, G. Rossetti, Recommendations for the use of albumin and immunoglobulins, *Blood Transfusion*. 7 (2009) 216–234. <https://doi.org/10.2450/2009.0094-09>.
- [26] M. Garcovich, M.A. Zocco, A. Gasbarrini, Clinical use of albumin in hepatology, *Blood Transfusion*. 7 (2009) 268–277. <https://doi.org/10.2450/2008.0080-08>.
- [27] C. Francoz, F. Durand, Suppléance artificielle du foie par le système MARS™ : intérêt et limites en réanimation, *Reanimation*. 16 (2007) 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.08.003>.
- [28] P. Caraceni, M. Tufoni, M.E. Bonavita, Clinical use of albumin, *Blood Transfusion*. 11 (2013). <https://doi.org/10.2450/2013.005s>.

- [29] J.F. Morrow, P. Berg, Cleavage of Simian Virus 40 DNA at a Unique Site by a Bacterial Restriction Enzyme, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 69 (1972) 3365. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.11.3365>.
- [30] S.N. Cohen, A.C.Y. Chang, H.W. Boyer, R.B. Helling, Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro&/em>; *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70 (1973) 3240. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>.
- [31] J. Dumas, B. Robert, Bioproduction de protéines thérapeutiques: Revue et perspectives, *Medecine/Sciences*. 25 (2009) 18–26. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009252s18>.
- [32] M.E. Lalonde, Y. Durocher, Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells, *Journal of Biotechnology*. 251 (2017) 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>.
- [33] K. Swiech, V. Picanço-Castro, D.T. Covas, Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production, *Protein Expression and Purification*. 84 (2012) 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.023>.
- [34] A. Loos, H. Steinkellner, IgG-Fc glycoengineering in non-mammalian expression hosts, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 526 (2012) 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.011>.
- [35] R. O’Flaherty, A. Bergin, E. Flampouri, L.M. Mota, I. Obaidi, A. Quigley, Y. Xie, M. Butler, Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing, *Biotechnology Advances*. 43 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>.
- [36] M. Kesik-Brodacka, Progress in biopharmaceutical development, *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 65 (2018) 306–322. <https://doi.org/10.1002/bab.1617>.
- [37] J.B. Goh, S.K. Ng, Impact of host cell line choice on glycan profile, *Critical Reviews in Biotechnology*. 38 (2018) 851–867. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1416577>.
- [38] J. Dumont, D. Eewart, B. Mei, S. Estes, R. Kshirsagar, Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives, *Critical*

- Reviews in Biotechnology. 36 (2016) 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>.
- [39] L.R. Bertolini, H. Meade, C.R. Lazzarotto, L.T. Martins, K.C. Tavares, M. Bertolini, J.D. Murray, The transgenic animal platform for biopharmaceutical production, *Transgenic Research*. 25 (2016) 329–343. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9933-9>.
- [40] G. Chevreux, V. Faid, J.M. Scohyers, N. Bihoreau, N-/O-glycosylation analysis of human FVIIa produced in the milk of transgenic rabbits, *Glycobiology*. 23 (2013) 1531–1546. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt085>.
- [41] J. Kling, First US approval for a transgenic animal drug, *Nature Biotechnology*. 27 (2009) 302–303. <https://doi.org/10.1038/nbt0409-302>.
- [42] M.J.B. Burnett, A.C. Burnett, Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities, *PLANTS, PEOPLE, PLANET*. 2 (2020) 121–132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>.
- [43] K. Tsumoto, Y. Isozaki, H. Yagami, M. Tomita, Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies, *Immunotherapy*. 11 (2019) 119–127. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0130>.
- [44] D.R. Goulet, W.M. Atkins, Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 109 (2020) 74–103. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>.
- [45] A. Beck, E. Wagner-Rousset, T. Wurch, N. Corvaia, Therapeutic antibodies and related products: Choosing the right structure for success, *Medecine/Sciences*. 25 (2009) 1024–1032. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121024>.
- [46] G. KÖHLER, C. MILSTEIN, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*. 256 (1975) 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>.
- [47] P.J. Carter, Potent antibody therapeutics by design, *Nature Reviews Immunology*. 6 (2006) 343–357. <https://doi.org/10.1038/nri1837>.

- [48] R.J. Rose, A.F. Labrijn, E.T.J. van den Bremer, S. Loverix, I. Lasters, P.H.C. van Berkel, J.G.J. van de Winkel, J. Schuurman, P.W.H.I. Parren, A.J.R. Heck, Quantitative analysis of the interaction strength and dynamics of human IgG4 half molecules by native mass spectrometry, *Structure*. 19 (2011) 1274–1282. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.06.016>.
- [49] T. Graf, K. Heinrich, I. Grunert, H. Wegele, M. Habegger, P. Bulau, M. Leiss, Recent advances in LC–MS based characterization of protein-based bio-therapeutics – mastering analytical challenges posed by the increasing format complexity, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 186 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113251>.
- [50] Z.E. Sauna, H.A.D. Lagassé, A. Alexaki, V.L. Simhadri, N.H. Katagiri, W. Jankowski, C. Kimchi-Sarfaty, Recent advances in (therapeutic protein) drug development, *F1000Research*. 6 (2017). <https://doi.org/10.12688/f1000research.9970.1>.
- [51] R.H. Garrett, C.M. Grisham, B. Lubochinsky, *Biochimie, De Boeck Supérieur*, 2000. <https://books.google.fr/books?id=MRWjswEACAAJ>.
- [52] P. Beltrao, P. Bork, N.J. Krogan, V. van Noort, Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications, *Molecular Systems Biology*. 9 (2013). <https://doi.org/10.1002/msb.201304521>.
- [53] G. Walsh, Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals, *Drug Discovery Today*. 15 (2010) 773–780. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.009>.
- [54] F. Higel, A. Seidl, F. Sörgel, W. Friess, N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 100 (2016) 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.01.005>.
- [55] G.D. Pipes, P. Campbell, P. v. Bondarenko, B.A. Kerwin, M.J. Treuheit, H.S. Gadgil, Middle-down fragmentation for the identification and quantitation of site-specific methionine oxidation in an IgG1 molecule, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99 (2010) 4469–4476. <https://doi.org/10.1002/jps.22158>.

- [56] H. Pan, K. Chen, L. Chu, F. Kinderman, I. Apostol, G. Huang, Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn, *Protein Science*. 18 (2009) 424–433. <https://doi.org/10.1002/pro.45>.
- [57] J. Vlasak, R. Ionescu, *Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods*, 2008.
- [58] J. Vlasak, M.C. Bussat, S. Wang, E. Wagner-Rousset, M. Schaefer, C. Klinguer-Hamour, M. Kirchmeier, N. Corvaia, R. Ionescu, A. Beck, Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody, *Analytical Biochemistry*. 392 (2009) 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.043>.
- [59] Y.T. Zhang, J. Hu, A.L. Pace, R. Wong, Y.J. Wang, Y.H. Kao, Characterization of asparagine 330 deamidation in an Fc-fragment of IgG1 using cation exchange chromatography and peptide mapping, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 965 (2014) 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.06.018>.
- [60] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, J. Sun, Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 837 (2006) 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.053>.
- [61] E.T.J. van den Bremer, F.J. Beurskens, M. Voorhorst, P.J. Engelberts, R.N. de Jong, B.G. van der Boom, E.M. Cook, M.A. Lindorfer, R.P. Taylor, P.H.C. van Berkel, P.W.H.I. Parren, Human IgG is produced in a pro-form that requires clipping of C-terminal lysines for maximal complement activation, *MAbs*. 7 (2015) 672–680. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1046665>.
- [62] A. Lapolla, P. Traldi, D. Fedele, Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins, *Clinical Biochemistry*. 38 (2005) 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.09.007>.
- [63] A.K. Miller, D.M. Hambly, B.A. Kerwin, M.J. Treuheit, H.S. Gadgil, Characterization of site-specific glycation during process development of a human therapeutic monoclonal

- antibody, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 100 (2011) 2543–2550. <https://doi.org/10.1002/jps.22504>.
- [64] E.I. Park, S.M. Manzella, J.U. Baenziger, Rapid clearance of sialylated glycoproteins by the asialoglycoprotein receptor, *Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 4597–4602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210612200>.
- [65] S. Magnusson, T. Berg, Extremely rapid endocytosis mediated by the mannose receptor of sinusoidal endothelial rat liver cells, *Biochemical Journal*. 257 (1989) 651–656. <https://doi.org/10.1042/bj2570651>.
- [66] M. Habegger, K. Bomans, K. Diepold, M. Hook, J. Gassner, T. Schlothauer, A. Zwick, C. Spick, J.F. Kepert, B. Hienz, M. Wiedmann, H. Beck, P. Metzger, M. Mølhøj, C. Knoblich, U. Grauschopf, D. Reusch, P. Bulau, Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies: Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes, *MAbs*. 6 (2014) 327–339. <https://doi.org/10.4161/mabs.27876>.
- [67] S. Rogstad, A. Faustino, A. Ruth, D. Keire, M. Boyne, J. Park, A Retrospective Evaluation of the Use of Mass Spectrometry in FDA Biologics License Applications, in: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Springer New York LLC, 2017: pp. 786–794. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1531-9>.
- [68] N. Alt, T.Y. Zhang, P. Motchnik, R. Taticek, V. Quarmby, T. Schlothauer, H. Beck, T. Emrich, R.J. Harris, Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles, *Biologicals*. 44 (2016) 291–305. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.06.005>.
- [69] B. Bobály, S. Fleury-Souverain, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillarme, S. Fekete, Current possibilities of liquid chromatography for the characterization of antibody-drug conjugates, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 147 (2018) 493–505. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.022>.
- [70] S. Fekete, D. Guillarme, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein

- Biopharmaceuticals, *Analytical Chemistry*. 88 (2016) 480–507. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04561>.
- [71] S. Fekete, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 101 (2014) 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011>.
- [72] K. Sandra, I. Vandenhede, P. Sandra, Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization, *Journal of Chromatography A*. 1335 (2014) 81–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.057>.
- [73] B.L. Duivelshof, A. Murisier, J. Camperi, S. Fekete, A. Beck, D. Guillarme, V. D’Atri, Therapeutic Fc-fusion proteins: Current analytical strategies, *Journal of Separation Science*. 44 (2021) 35–62. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000765>.
- [74] M. Hall, Chapter 21 - Size Exclusion Chromatography (SEC), in: G. Jagschies, E. Lindskog, K. Łacki, P. Galliher (Eds.), *Biopharmaceutical Processing*, Elsevier, 2018: pp. 421–432. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00021-9>.
- [75] E.S.P. Bouvier, S.M. Koza, Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 63 (2014) 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.002>.
- [76] S. Fekete, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 113 (2015) 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037>.
- [77] W. Zhang, M.J. Czupryn, Analysis of isoaspartate in a recombinant monoclonal antibody and its charge isoforms, n.d. www.elsevier.com/locate/jpba.
- [78] C. Quan, E. Alcalá, I. Petkovska, D. Matthews, E. Canova-Davis, R. Taticek, S. Ma, A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: Where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior, *Analytical Biochemistry*. 373 (2008) 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.09.027>.

- [79] S. Wang, R. Ionescu, N. Peekhaus, J. Yu Leung, S. Ha, J. Vlasak, Separation of post-translational modifications in monoclonal antibodies by exploiting subtle conformational changes under mildly acidic conditions, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 6496–6502. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.044>.
- [80] B. Yan, S. Steen, D. Hambly, J. Valliere-Douglass, T. vanden Bos, S. Smallwood, Z. Yates, T. Arroll, Y. Han, H. Gadgil, R.F. Latypov, A. Wallace, A. Lim, G.R. Kleemann, W. Wang, A. Balland, Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98 (2009) 3509–3521. <https://doi.org/10.1002/jps.21655>.
- [81] G. Ponniah, A. Kita, C. Nowak, A. Neill, Y. Kori, S. Rajendran, H. Liu, Characterization of the Acidic Species of a Monoclonal Antibody Using Weak Cation Exchange Chromatography and LC-MS, *Analytical Chemistry*. 87 (2015) 9084–9092. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02385>.
- [82] G. Teshima, M.X. Li, R. Danishmand, C. Obi, R. To, C. Huang, J. Kung, V. Lahidji, J. Freeberg, L. Thorner, M. Tomic, Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 2091–2097. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.107>.
- [83] D.S. Hage, Analysis of biological interactions by affinity chromatography: Clinical and pharmaceutical applications, *Clinical Chemistry*. 63 (2017) 1083–1093. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.262253>.
- [84] D.S. Hage, J.A. Anguizola, C. Bi, R. Li, R. Matsuda, E. Papastavros, E. Pfaunmiller, J. Vargas, X. Zheng, Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 69 (2012) 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.004>.
- [85] E.L. Rodriguez, S. Poddar, S. Iftexhar, K. Suh, A.G. Woolfork, S. Ovbude, A. Pekarek, M. Walters, S. Lott, D.S. Hage, Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years, *Journal of Chromatography B: Analytical*

- Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 1157 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>.
- [86] L.J. Brady, T. Martinez, A. Balland, Characterization of nonenzymatic glycation on a monoclonal antibody, *Analytical Chemistry*. 79 (2007) 9403–9413. <https://doi.org/10.1021/ac7017469>.
- [87] A. Heger, T. Grunert, P. Schulz, D. Josic, A. Buchacher, Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography, n.d.
- [88] M. Thomann, T. Schlothauer, T. Dashivets, S. Malik, C. Avenal, P. Bulau, P. Rüger, D. Reusch, In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity, *PLoS ONE*. 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134949>.
- [89] T. Schlothauer, P. Rueger, J.O. Stracke, H. Hertenberger, F. Fingas, L. Kling, T. Emrich, G. Drabner, S. Seeber, J. Auer, S. Koch, A. Papadimitriou, Analytical FcRn affinity chromatography for functional characterization of monoclonal antibodies, *MABs*. 5 (2013) 576–586. <https://doi.org/10.4161/mabs.24981>.
- [90] S. Hjertén, Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*. 87 (1973) 325–331. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)91733-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)91733-9).
- [91] M. Tassi, J. de Vos, S. Chatterjee, F. Sobott, J. Bones, S. Eeltink, Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products, *Journal of Separation Science*. 41 (2018) 125–144. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700988>.
- [92] S. Fekete, J.L. Veuthey, A. Beck, D. Guilleme, Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 130 (2016) 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.04.004>.
- [93] D. Boyd, T. Kaschak, B. Yan, HIC resolution of an IgG1 with an oxidized Trp in a complementarity determining region, *Journal of Chromatography B: Analytical*

- Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 879 (2011) 955–960. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.006>.
- [94] M. Haverick, S. Mengisen, M. Shameem, A. Ambrogelly, Separation of mAbs molecular variants by analytical hydrophobic interaction chromatography HPLC: Overview and applications, *MAbs*. 6 (2014) 852–858. <https://doi.org/10.4161/mabs.28693>.
- [95] J. Valliere-Douglass, L. Jones, D. Shpektor, P. Kodama, A. Wallace, A. Balland, R. Bailey, Y. Zhang, Separation and characterization of an IgG2 antibody containing a cyclic imide in CDR1 of light chain by hydrophobic interaction chromatography and mass spectrometry, *Analytical Chemistry*. 80 (2008) 3168–3174. <https://doi.org/10.1021/ac702245c>.
- [96] G. Karlsson, S. Winge, Separation of native and latent forms of human antithrombin by hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography, *Protein Expression and Purification*. 21 (2001) 149–155. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1349>.
- [97] M. Rodriguez-Aller, D. Guillarme, A. Beck, S. Fekete, Practical method development for the separation of monoclonal antibodies and antibody-drug-conjugate species in hydrophobic interaction chromatography, part 1: Optimization of the mobile phase, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 118 (2016) 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.11.011>.
- [98] V. D’Atri, A. Murisier, S. Fekete, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Current and future trends in reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of therapeutic proteins, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 130 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115962>.
- [99] D. Ren, G.D. Pipes, D. Hambly, P. v. Bondarenko, M.J. Treuheit, H.S. Gadgil, Top-down N-terminal sequencing of Immunoglobulin subunits with electrospray ionization time of flight mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*. 384 (2009) 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.09.026>.
- [100] B. Bobály, M. Lauber, A. Beck, D. Guillarme, S. Fekete, Utility of a high coverage phenyl-bonding and wide-pore superficially porous particle for the analysis of monoclonal

- antibodies and related products, *Journal of Chromatography A*. 1549 (2018) 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.043>.
- [101] A. Staub, D. Guillarme, J. Schappler, J.L. Veuthey, S. Rudaz, Intact protein analysis in the biopharmaceutical field, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55 (2011) 810–822. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.031>.
- [102] S. Fekete, J.L. Veuthey, D. Guillarme, New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 69 (2012) 9–27. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.024>.
- [103] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins, *Biochemical Journal*. 35 (1941) 1358–1368. <https://doi.org/10.1042/bj0351358>.
- [104] L. Nováková, L. Matysová, P. Solich, Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*. 68 (2006) 908–918. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.035>.
- [105] S. Fekete, D. Guillarme, Ultra-high-performance liquid chromatography for the characterization of therapeutic proteins, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 63 (2014) 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.05.012>.
- [106] D.R. Stoll, D.C. Harmes, J. Danforth, E. Wagner, D. Guillarme, S. Fekete, A. Beck, Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 87 (2015) 8307–8315. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01578>.
- [107] C. Gstöttner, D. Klemm, M. Habegger, A. Bathke, H. Wegele, C. Bell, R. Kopf, Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS, *Analytical Chemistry*. 90 (2018) 2119–2125. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04372>.
- [108] A. Goyon, L. Dai, T. Chen, B. Wei, F. Yang, N. Andersen, R. Kopf, M. Leiss, M. Mølhøj, D. Guillarme, C. Stella, From proof of concept to the routine use of an automated and

- robust multi-dimensional liquid chromatography mass spectrometry workflow applied for the charge variant characterization of therapeutic antibodies, *Journal of Chromatography A*. 1615 (2020) 460740. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460740>.
- [109] E. Farsang, D. Guillarme, J.L. Veuthey, A. Beck, M. Lauber, A. Schmudlach, S. Fekete, Coupling non-denaturing chromatography to mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 185 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113207>.
- [110] K. Muneeruddin, J.J. Thomas, P.A. Salinas, I.A. Kaltashov, Characterization of small protein aggregates and oligomers using size exclusion chromatography with online detection by native electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*. 86 (2014) 10692–10699. <https://doi.org/10.1021/ac502590h>.
- [111] K. Muneeruddin, M. Nazzaro, I.A. Kaltashov, Characterization of Intact Protein Conjugates and Biopharmaceuticals Using Ion-Exchange Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Top-Down Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 87 (2015) 10138–10145. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02982>.
- [112] B. Kükreker, V. Filipe, E. van Duijn, P.T. Kasper, R.J. Vreeken, A.J.R. Heck, W. Jiskoot, Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography, *Pharmaceutical Research*. 27 (2010) 2197–2204. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0224-5>.
- [113] R. Gahoual, A.K. Heidenreich, G.W. Somsen, P. Bulau, D. Reusch, M. Wührer, M. Habberger, Detailed Characterization of Monoclonal Antibody Receptor Interaction Using Affinity Liquid Chromatography Hyphenated to Native Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 89 (2017) 5404–5412. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00211>.

- [114] B. Chen, Y. Peng, S.G. Valeja, L. Xiu, A.J. Alpert, Y. Ge, Online Hydrophobic Interaction Chromatography-Mass Spectrometry for Top-Down Proteomics, *Analytical Chemistry*. 88 (2016) 1885–1891. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04285>.
- [115] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules*, 1989.
- [116] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2 (1988) 151–153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802>.
- [117] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, Molecular Beams of Macroions, *The Journal of Chemical Physics*. 49 (1968) 2240–2249. <https://doi.org/10.1063/1.1670391>.
- [118] S. Banerjee, S. Mazumdar, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*, *International Journal of Analytical Chemistry*. 2012 (2012) 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- [119] E.J. Finehout, K.H. Lee, *An Introduction to Mass Spectrometry Applications in Biological Research*, *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 32 (2004) 93–100. <https://doi.org/10.1002/bmb.2004.494032020331>.
- [120] G. Siuzdak, *Review The emergence of mass spectrometry in biochemical research*, 1994.
- [121] A.J.R. Heck, R.H.H. van den Heuvel, Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*. 23 (2004) 368–389. <https://doi.org/10.1002/mas.10081>.
- [122] I. Manisali, D.D.Y. Chen, B.B. Schneider, *Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: Past, present, and future*, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 25 (2006) 243–256. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.07.007>.

- [123] A. Konijnenberg, A. Butterer, F. Sobott, Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1834 (2013) 1239–1256. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.11.013>.
- [124] M. Wilm, M. Mann, Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source, *Analytical Chemistry*. 68 (1996) 1–8. <https://doi.org/10.1021/ac9509519>.
- [125] A.C. Leney, A.J.R. Heck, Native Mass Spectrometry: What is in the Name?, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 28 (2017) 5–13. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1545-3>.
- [126] A.T. Kicman, M.C. Parkin, R.K. Iles, An introduction to mass spectrometry based proteomics-Detection and characterization of gonadotropins and related molecules, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 260–262 (2007) 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.02.022>.
- [127] C.H. (Winston) Chen, Review of a current role of mass spectrometry for proteome research, *Analytica Chimica Acta*. 624 (2008) 16–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.017>.
- [128] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers, *Applied Spectroscopy Reviews*. 44 (2009) 210–230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.
- [129] A. Wortmann, T. Pimenova, S. Alves, R. Zenobi, Investigation of the first shot phenomenon in MALDI mass spectrometry of protein complexes, *Analyst*. 132 (2007) 199–207. <https://doi.org/10.1039/B615411E>.
- [130] M. Fagyas, K. Úri, I.M. Siket, G.B.Á. Fülöp, V. Csató, A. Daragó, J. Boczán, E. Bányai, I.E. Szentkirályi, T.M. Maros, T. Szerafin, I. Édes, Z. Papp, A. Tóth, New perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) II: Albumin suppresses Angiotensin Converting Enzyme (ACE) activity in human, *PLoS ONE*. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087844>.

- [131] W. Paul, H. Steinwedel, Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld; Zeitschrift Für Naturforschung A. 8 (1953) 448–450. <https://doi.org/doi:10.1515/zna-1953-0710>.
- [132] G.L. Glish, R.W. Vachet, The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, Nature Reviews Drug Discovery. 2 (2003) 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>.
- [133] W.C. Wiley, I.H. McLaren, Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution, Review of Scientific Instruments. 26 (1955) 1150–1157. <https://doi.org/10.1063/1.1715212>.
- [134] B.A. Mamyrin, V.I. Karataev, D. v Shmikk, V.A. Zagulin, The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution, Zh. Eksp. Teor. Fiz. 64 (1973) 82–89.
- [135] A.P. Jonsson, Review Mass spectrometry for protein and peptide characterisation, 2001.
- [136] A. Makarov, Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis, Analytical Chemistry. 72 (2000) 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>.
- [137] J.P. Savaryn, T.K. Toby, N.L. Kelleher, A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics, Proteomics. 16 (2016) 2435–2443. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600113>.
- [138] K. Biemann, Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure, Biomedical & Environmental Mass Spectrometry. 16 (1988) 99–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bms.1200160119>.
- [139] P. Roepstorff, J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, Biomedical Mass Spectrometry. 11 (1984) 601. <https://doi.org/10.1002/bms.1200111109>.
- [140] V.H. Wysocki, K.A. Resing, Q. Zhang, G. Cheng, Mass spectrometry of peptides and proteins, Methods. 35 (2005) 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.08.013>.
- [141] K.O. Zhurov, L. Fornelli, M.D. Wodrich, Ü.A. Laskay, Y.O. Tsybin, Principles of electron capture and transfer dissociation mass spectrometry applied to peptide and protein

- structure analysis, *Chemical Society Reviews*. 42 (2013) 5014–5030. <https://doi.org/10.1039/c3cs35477f>.
- [142] R.A. Zubarev, Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry, *Current Opinion in Biotechnology*. 15 (2004) 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.12.002>.
- [143] R.A. Zubarev, D.M. Horn, E.K. Fridriksson, N.L. Kelleher, N.A. Kruger, M.A. Lewis, B.K. Carpenter, F.W. McLafferty, Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Multiply Charged Protein Cations, *Analytical Chemistry*. 72 (2000) 563–573. <https://doi.org/10.1021/ac990811p>.
- [144] F. Lermyte, Y.O. Tsybin, P.B. O'Connor, J.A. Loo, Top or Middle? Up or Down? Toward a Standard Lexicon for Protein Top-Down and Allied Mass Spectrometry Approaches, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 30 (2019) 1149–1157. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02201-x>.
- [145] I.A. Kaltashov, C.E. Bobst, R.R. Abzalimov, G. Wang, B. Baykal, S. Wang, Advances and challenges in analytical characterization of biotechnology products: Mass spectrometry-based approaches to study properties and behavior of protein therapeutics, *Biotechnology Advances*. 30 (2012) 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.006>.
- [146] A.L. Marie, C. Przybylski, F. Gonnet, R. Daniel, R. Urbain, G. Chevreux, S. Jorieux, M. Taverna, Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin, *Analytica Chimica Acta*. 800 (2013) 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.09.023>.
- [147] M. Habberger, M. Leiss, A.K. Heidenreich, O. Pester, G. Hafenmair, M. Hook, L. Bonnington, H. Wegele, M. Haindl, D. Reusch, P. Bulau, Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry, *MAbs*. 8 (2016) 331–339. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1122150>.
- [148] K. Muneeruddin, C.E. Bobst, R. Frenkel, D. Houde, I. Turyan, Z. Sosic, I.A. Kaltashov, Characterization of a PEGylated protein therapeutic by ion exchange chromatography

- with on-line detection by native ESI MS and MS/MS, *Analyst*. 142 (2017) 336–344. <https://doi.org/10.1039/c6an02041k>.
- [149] F. Füssl, K. Cook, K. Scheffler, A. Farrell, S. Mittermayr, J. Bones, Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies Using Direct Coupled pH Gradient Cation Exchange Chromatography to High-Resolution Native Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 90 (2018) 4669–4676. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05241>.
- [150] Y. Zhao, R.R. Abzalimov, I.A. Kaltashov, Interactions of Intact Unfractionated Heparin with Its Client Proteins Can Be Probed Directly Using Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 88 (2016) 1711–1718. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03792>.
- [151] N.L. Kelleher, H.Y. Lin, G.A. Valaskovic, D.J. Aaserud, E.K. Fridriksson, F.W. McLafferty, Top down versus bottom up protein characterization by tandem high- resolution mass spectrometry, *Journal of the American Chemical Society*. 121 (1999) 806–812. <https://doi.org/10.1021/ja973655h>.
- [152] Z. Zhang, B. Shah, Characterization of Variable Regions of Monoclonal Antibodies by Top-Down Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 79 (2007) 5723–5729. <https://doi.org/10.1021/ac070483q>.
- [153] Y.O. Tsybin, L. Fornelli, C. Stoermer, M. Luebeck, J. Parra, S. Nallet, F.M. Wurm, R. Hartmer, Structural analysis of intact monoclonal antibodies by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Analytical Chemistry*. 83 (2011) 8919–8927. <https://doi.org/10.1021/ac201293m>.
- [154] J.M. Lodge, K.L. Schauer, D.R. Brademan, N.M. Riley, E. Shishkova, M.S. Westphall, J.J. Coon, Top-Down Characterization of an Intact Monoclonal Antibody Using Activated Ion Electron Transfer Dissociation, *Analytical Chemistry*. 92 (2020) 10246–10251. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00705>.
- [155] S. Fekete, A.-L. Gassner, S. Rudaz, J. Schappler, D. Guillarme, Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 42 (2013) 74–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.012>.

- [156] G. Chevreux, N. Tilly, N. Bihoreau, Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*. 415 (2011) 212–214. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.030>.
- [157] Y. An, Y. Zhang, H.M. Mueller, M. Shameem, X. Chen, A new tool for monoclonal antibody analysis Application of IdeS proteolysis in IgG domain-specific characterization, *MABS*. 6 (2014) 879–893. <https://doi.org/10.4161/mabs.28762>.
- [158] K. Srzentić, L. Fornelli, Y.O. Tsybin, J.A. Loo, H. Seckler, J.N. Agar, L.C. Anderson, D.L. Bai, A. Beck, J.S. Brodbelt, Y.E.M. van der Burgt, J. Chamot-Rooke, S. Chatterjee, Y. Chen, D.J. Clarke, P.O. Danis, J.K. Diedrich, R.A. D'Ippolito, M. Dupré, N. Gasilova, Y. Ge, Y.A. Goo, D.R. Goodlett, S. Greer, K.F. Haselmann, L. He, C.L. Hendrickson, J.D. Hinkle, M. v. Holt, S. Hughes, D.F. Hunt, N.L. Kelleher, A.N. Kozhinov, Z. Lin, C. Malosse, A.G. Marshall, L. Menin, R.J. Millikin, K.O. Nagornov, S. Nicolardi, L. Paša-Tolić, S. Pengelley, N.R. Quebbemann, A. Resemann, W. Sandoval, R. Sarin, N.D. Schmitt, J. Shabanowitz, J.B. Shaw, M.R. Shortreed, L.M. Smith, F. Sobott, D. Suckau, T. Toby, C.R. Weisbrod, N.C. Wildburger, J.R. Yates, S.H. Yoon, N.L. Young, M. Zhou, Interlaboratory Study for Characterizing Monoclonal Antibodies by Top-Down and Middle-Down Mass Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 31 (2020) 1783–1802. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00036>.
- [159] C.M. Eakin, A. Miller, J. Kerr, J. Kung, A. Wallace, Assessing analytical methods to monitor isoAsp formation in monoclonal antibodies, *Frontiers in Pharmacology*. 5 APR (2014). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00087>.
- [160] L. Fornelli, D. Ayoub, K. Aizikov, A. Beck, Y.O. Tsybin, Middle-down analysis of monoclonal antibodies with electron transfer dissociation orbitrap fourier transform mass spectrometry, *Analytical Chemistry*. 86 (2014) 3005–3012. <https://doi.org/10.1021/ac4036857>.
- [161] F. Zhang, W. Ge, G. Ruan, X. Cai, T. Guo, Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry-Based Proteomics and Software Tools: A Glimpse in 2020, *Proteomics*. 20 (2020). <https://doi.org/10.1002/pmic.201900276>.

- [162] L. Switzar, M. Giera, W.M.A. Niessen, Protein digestion: An overview of the available techniques and recent developments, *Journal of Proteome Research*. 12 (2013) 1067–1077. <https://doi.org/10.1021/pr301201x>.
- [163] U. Leurs, U.H. Mistarz, K.D. Rand, Getting to the core of protein pharmaceuticals - Comprehensive structure analysis by mass spectrometry, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 93 (2015) 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.012>.
- [164] R.S. Rogers, M. Abernathy, D.D. Richardson, J.C. Rouse, J.B. Sperry, P. Swann, J. Wypych, C. Yu, L. Zang, R. Deshpande, A View on the Importance of “Multi-Attribute Method” for Measuring Purity of Biopharmaceuticals and Improving Overall Control Strategy, *AAPS Journal*. 20 (2018). <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0168-3>.
- [165] A.J.R. Heck, Native mass spectrometry: A bridge between interactomics and structural biology, *Nature Methods*. 5 (2008) 927–933. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1265>.
- [166] J.A. Loo, Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*. 16 (1997) 1–23. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1997\)16:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1997)16:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-L).
- [167] K. Breuker, F.W. McLafferty, Stepwise evolution of protein native structure with electrospray into the gas phase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (2008) 18145. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807005105>.
- [168] G. van der Rest, H. Rezaei, F. Halgand, Transient multimers modulate conformer abundances of prion protein monomer through conformational selection, *Scientific Reports*. 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48377-w>.
- [169] I.A. Kaltashov, C.E. Bobst, J. Pawlowski, G. Wang, Mass spectrometry-based methods in characterization of the higher order structure of protein therapeutics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 184 (2020) 113169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113169>.

- [170] I.A. Kaltashov, S.J. Eyles, Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*. 21 (2002) 37–71. <https://doi.org/10.1002/mas.10017>.
- [171] G. Terral, A. Beck, S. Cianférani, Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 1032 (2016) 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.044>.
- [172] E. Jurneczko, P.E. Barran, How useful is ion mobility mass spectrometry for structural biology? the relationship between protein crystal structures and their collision cross sections in the gas phase, *Analyst*. 136 (2011) 20–28. <https://doi.org/10.1039/c0an00373e>.
- [173] C.J. Hogan, B.T. Ruotolo, C. v Robinson, J. Fernandez de la Mora, Tandem Differential Mobility Analysis-Mass Spectrometry Reveals Partial Gas-Phase Collapse of the GroEL Complex, *The Journal of Physical Chemistry B*. 115 (2011) 3614–3621. <https://doi.org/10.1021/jp109172k>.
- [174] C. Atmanene, E. Wagner-Rousset, M. Malissard, B. Chol, A. Robert, N. Corvaia, A. van Dorsselaer, A. Beck, S. Sanglier-Cianférani, Extending mass spectrometry contribution to therapeutic monoclonal antibody lead optimization: Characterization of immune complexes using noncovalent ESI-MS, *Analytical Chemistry*. 81 (2009) 6364–6373. <https://doi.org/10.1021/ac9007557>.
- [175] I.A. Kaltashov, J.W. Pawlowski, W. Yang, K. Muneeruddin, H. Yao, C.E. Bobst, A.N. Lipatnikov, LC/MS at the whole protein level: Studies of biomolecular structure and interactions using native LC/MS and cross-path reactive chromatography (XP-RC) MS, *Methods*. 144 (2018) 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.019>.
- [176] M.A. Tito, J. Miller, N. Walker, K.F. Griffin, E. Diane Williamson, D. Despeyroux-Hill, R.W. Titball, C. v. Robinson, Probing molecular interactions in intact antibody: Antigen complexes, an electrospray time-of-flight mass spectrometry approach, *Biophysical Journal*. 81 (2001) 3503–3509. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75981-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75981-4).

- [177] J. Marcoux, T. Champion, O. Colas, E. Wagner-Rousset, N. Corvaia, A. van Dorsselaer, A. Beck, S. Cianférani, Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate, *Protein Science*. 24 (2015) 1210–1223. <https://doi.org/10.1002/pro.2666>.
- [178] G. Ben-Nissan, M. Sharon, The application of ion-mobility mass spectrometry for structure/function investigation of protein complexes, *Current Opinion in Chemical Biology*. 42 (2018) 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.026>.
- [179] D. Bagal, J.F. Valliere-Douglass, A. Balland, P.D. Schnier, Resolving Disulfide Structural Isoforms of IgG2 Monoclonal Antibodies by Ion Mobility Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 82 (2010) 6751–6755. <https://doi.org/10.1021/ac1013139>.
- [180] A. Beck, F. Debaene, H. Diemer, E. Wagner-Rousset, O. Colas, A. van Dorsselaer, S. Cianférani, Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies, *Journal of Mass Spectrometry*. 50 (2015) 285–297. <https://doi.org/10.1002/jms.3554>.
- [181] F. Debaene, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. van Dorsselaer, A. Beck, S. Cianférani, Time Resolved Native Ion-Mobility Mass Spectrometry to Monitor Dynamics of IgG4 Fab Arm Exchange and “Bispecific” Monoclonal Antibody Formation, *Analytical Chemistry*. 85 (2013) 9785–9792. <https://doi.org/10.1021/ac402237v>.
- [182] F. Debaene, A. Bœuf, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. van Dorsselaer, A. Beck, S. Cianférani, Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment, *Analytical Chemistry*. 86 (2014) 10674–10683. <https://doi.org/10.1021/ac502593n>.
- [183] S.M. Dixit, D.A. Polasky, B.T. Ruotolo, Collision Induced Unfolding of Isolated Proteins in the Gas Phase: Past, Present, and Future, 2017. <http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>.
- [184] O. Hernandez-Alba, E. Wagner-Rousset, A. Beck, S. Cianférani, Native Mass Spectrometry, Ion Mobility, and Collision-Induced Unfolding for Conformational

- Characterization of IgG4 Monoclonal Antibodies Native Mass Spectrometry, Ion Mobility and Collision Induced Un-folding for Conformational Characterisation of IgG4 Monoclonal An-tibodies, (n.d.). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00912i>.
- [185] Y. Tian, J.L. Lippens, C. Netirojjanakul, I.D.G. Campuzano, B.T. Ruotolo, Quantitative collision-induced unfolding differentiates model antibody–drug conjugates, *Protein Science*. 28 (2019) 598–608. <https://doi.org/10.1002/pro.3560>.
- [186] L. Cravello, D. Lascoux, E. Forest, Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17 (2003) 2387–2393. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rcm.1207>.
- [187] R.N. Straus, R.A. Jockusch, Hydrogen-Deuterium Exchange and Electron Capture Dissociation to Interrogate the Conformation of Gaseous Melittin Ions, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 30 (2019) 864–875. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02150-5>.
- [188] Q. Zhang, L.N. Willison, P. Tripathi, S.K. Sathe, K.H. Roux, M.R. Emmett, G.T. Blakney, H.-M. Zhang, A.G. Marshall, Epitope Mapping of a 95 kDa Antigen in Complex with Antibody by Solution-Phase Amide Backbone Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 83 (2011) 7129–7136. <https://doi.org/10.1021/ac201501z>.
- [189] D. Houde, J. Arndt, W. Domeier, S. Berkowitz, J.R. Engen, Characterization of IgG1 Conformation and conformational dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Analytical Chemistry*. 81 (2009) 2644–2651. <https://doi.org/10.1021/ac802575y>.
- [190] W. Burkitt, P. Domann, G. O'Connor, Conformational changes in oxidatively stressed monoclonal antibodies studied by hydrogen exchange mass spectrometry, *Protein Science*. 19 (2010) 826–835. <https://doi.org/10.1002/pro.362>.
- [191] Y. Yan, H. Wei, Y. Fu, S. Jusuf, M. Zeng, R. Ludwig, S.R. Krystek, G. Chen, L. Tao, T.K. Das, Isomerization and Oxidation in the Complementarity-Determining Regions of a

- Monoclonal Antibody: A Study of the Modification-Structure-Function Correlations by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 88 (2016) 2041–2050. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02800>.
- [192] D. Houde, Y. Peng, S.A. Berkowitz, J.R. Engen, Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding, *Molecular and Cellular Proteomics*. 9 (2010) 1716–1728. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900540-MCP200>.
- [193] A. Baerga-Ortiz, C.A. Hughes, J.G. Mandell, E.A. Komives, Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein, *Protein Science*. 11 (2002) 1300–1308. <https://doi.org/10.1110/ps.4670102>.
- [194] R.E. Iacob, G.M. Bou-Assaf, L. Makowski, J.R. Engen, S.A. Berkowitz, D. Houde, Investigating monoclonal antibody aggregation using a combination of H/DX-MS and other biophysical measurements, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 102 (2013) 4315–4329. <https://doi.org/10.1002/jps.23754>.
- [195] X.R. Liu, M.M. Zhang, M.L. Gross, Mass Spectrometry-based protein footprinting for higher-order structure analysis: Fundamentals and applications, *Chemical Reviews*. 120 (2020) 4355–4454. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00815>.
- [196] D.M. Hambly, M.L. Gross, Laser flash photolysis of hydrogen peroxide to oxidize protein solvent-accessible residues on the microsecond timescale, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 16 (2005) 2057–2063. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.09.008>.
- [197] L.M. Jones, H. Zhang, W. Cui, S. Kumar, J.B. Sperry, J.A. Carroll, M.L. Gross, Complementary MS methods assist conformational characterization of antibodies with altered S-S bonding networks, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 24 (2013) 835–845. <https://doi.org/10.1007/s13361-013-0582-4>.
- [198] C. Chumsae, G. Gaza-Bulsecu, J. Sun, H. Liu, Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody,

- Journal of Chromatography B. 850 (2007) 285–294.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.050>.
- [199] A. Hawe, J.C. Kasper, W. Friess, W. Jiskoot, Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 38 (2009) 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.06.001>.
- [200] R. Tyler-Cross, V. Schirchs, Effects of Amino Acid Sequence, Buffers, and Ionic Strength on the Rate and Mechanism of Deamidation of Asparagine Residues in Small Peptides*, 1991.
- [201] E. Tamizi, A. Jouyban, Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 98 (2016) 26–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.10.016>.
- [202] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, L. Zhou, Mass Spectrometry Analysis of Photo-Induced Methionine Oxidation of a Recombinant Human Monoclonal Antibody, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 20 (2009) 525–528. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.11.011>.
- [203] Y. Yan, A.P. Liu, S. Wang, T.J. Daly, N. Li, Ultrasensitive Characterization of Charge Heterogeneity of Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Strong Cation Exchange Chromatography Coupled to Native Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*. 90 (2018) 13013–13020. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03773>.
- [204] Y. Matsuda, M. Kliman, B.A. Mendelsohn, Application of Native Ion Exchange Mass Spectrometry to Intact and Subunit Analysis of Site-Specific Antibody–Drug Conjugates Produced by AJICAP First Generation Technology, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 31 (2020) 1706–1712. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00129>.
- [205] F. Füssl, A. Criscuolo, K. Cook, K. Scheffler, J. Bones, Cracking Proteoform Complexity of Ovalbumin with Anion-Exchange Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry under Native Conditions, *Journal of Proteome Research*. 18 (2019) 3689–3702. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00375>.

- [206] G. van Schaick, C. Gstöttner, A. Büttner, D. Reusch, M. Wuhrer, E. Domínguez-Vega, Anion exchange chromatography – Mass spectrometry for monitoring multiple quality attributes of erythropoietin biopharmaceuticals, *Analytica Chimica Acta*. 1143 (2021) 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.027>.
- [207] R.L. Shi, G. Xiao, T.M. Dillon, M.S. Ricci, P. v. Bondarenko, Characterization of therapeutic proteins by cation exchange chromatography-mass spectrometry and top-down analysis, *MAbs*. 12 (2020). <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1739825>.
- [208] A. Etkirch, O. Hernandez-Alba, O. Colas, A. Beck, D. Guillarme, S. Cianférani, Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 1086 (2018) 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.010>.
- [209] G. van der Rest, F. Halgand, Size Exclusion Chromatography-Ion Mobility-Mass Spectrometry Coupling: a Step Toward Structural Biology, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 28 (2017) 2519–2522. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1810-0>.
- [210] V. Le-Minh, F. Halgand, G. van der Rest, M. Taverna, C. Smadja, Conformation assessment of therapeutic monoclonal antibodies by SEC-MS: Unravelling analytical biases for application to quality control, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 185 (2020) 113252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113252>.
- [211] J. Nilsen, E. Trabjerg, A. Grevys, C. Azevedo, S.O. Brennan, M. Stensland, J. Wilson, K.M.K. Sand, M. Bern, B. Dalhus, D.C. Roopenian, I. Sandlie, K.D. Rand, J.T. Andersen, An intact C-terminal end of albumin is required for its long half-life in humans, *Communications Biology*. 3 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0903-7>.
- [212] B.L. Osborn, L. Sekut, M. Corcoran, C. Poortman, B. Sturm, G. Chen, D. Mather, H.L. Lin, T.J. Parry, Albutropin: a growth hormone–albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys, *European Journal of*

- Pharmacology. 456 (2002) 149–158. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02644-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02644-4).
- [213] S. Schulte, Half-life extension through albumin fusion technologies, *Thrombosis Research*. 124 (2009) S6–S8. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(09\)70157-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0049-3848(09)70157-4).
- [214] A. Duttaroy, P. Kanakaraj, B.L. Osborn, H. Schneider, O.K. Pickeral, C. Chen, G. Zhang, S. Kaithamana, M. Singh, R. Schulingkamp, D. Crossan, J. Bock, T.E. Kaufman, P. Reavey, M. Carey-Barber, S.R. Krishnan, A. Garcia, K. Murphy, J.K. Siskind, M.A. Mclean, S. Cheng, S. Ruben, C.E. Birse, O. Blondel, Development of a Long-Acting Insulin Analog Using Albumin Fusion Technology, 2005.
- [215] M. Bern, J. Nilsen, M. Ferrarese, K.M. K Sand, T.T. Gjølborg, H.E. Lode, R.J. Davidson, R.M. Camire, E.S. Baekkevold, S. Foss, A. Grevys, B. Dalhus, J. Wilson, L.S. Høydahl, G.J. Christianson, D.C. Roopenian, T. Schlothauer, T.E. Michaelsen, M.C. Moe, S. Lombardi, M. Pinotti, I. Sandlie, A. Branchini, J. Terje Andersen, An engineered human albumin enhances half-life and transmucosal delivery when fused to protein-based biologics, 2020. <http://stm.sciencemag.org/>.
- [216] B. Hintersteiner, N. Lingg, P. Zhang, S. Woen, K.M. Hoi, S. Stranner, S. Wiederkum, O. Mutschlechner, M. Schuster, H. Loibner, A. Jungbauer, Charge heterogeneity: Basic antibody charge variants with increased binding to Fc receptors, *MAbs*. 8 (2016) 1548–1560. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1225642>.