



HAL
open science

Capillary electrophoresis-mass spectrometry applied to the quantitative and structural study of monoclonal antibodies after administration

Tessa Reinert

► **To cite this version:**

Tessa Reinert. Capillary electrophoresis-mass spectrometry applied to the quantitative and structural study of monoclonal antibodies after administration. Analytical chemistry. Université de Strasbourg, 2023. English. NNT : 2023STRAF049 . tel-04601237

HAL Id: tel-04601237

<https://theses.hal.science/tel-04601237>

Submitted on 4 Jun 2024

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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
Chimie de la Matière Complexe (CMC) – UMR 7140

THÈSE

présentée par :

Tessa REINERT

Soutenue le : **18 octobre 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique

Électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse appliquée à l'étude quantitative et structurale d'anticorps monoclonaux après administration

THÈSE dirigée par :

Dr FRANCOIS Yannis
Pr HOUZE Pascal

Maître de Conférences, Université de Strasbourg
Professeur-Praticien-Hospitalier, Assistance Publique-
Hôpitaux de Paris

PRESIDENTE DE JURY :

Dr CIANFERANI Sarah

Directrice de Recherche CNRS, Université de
Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr FILLET Marianne
Pr MENET Marie-Claude

Professeur des Universités, Université de Liège
Professeur des Universités, Université Paris Saclay

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr CLAVIER Séverine
Dr GAHOUAL Rabah
Pr GUILLARME Davy

Responsable de laboratoire, Sanofi Vitry-sur-Seine
Maître de Conférences, Université Paris Cité
Professeur des Universités, Université de Genève

À ma famille

*The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of
thinking about them.*

William Lawrence Bragg

If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Loin d'être une expérience solitaire, la thèse, c'est avant tout des collaborations et interactions scientifiques mais aussi humaines. Avant de vous lancer dans le vif du sujet, je tiens donc à présenter et remercier les personnes formidables ayant éclairé ce parcours de thèse.

Tout d'abord, je souhaite remercier sincèrement Pr. Marianne Fillet et Pr. Davy Guillaume, rapporteurs de ce travail, ainsi que Dr. Sarah Cianféroni, Dr. Séverine Clavier et Pr. Marie-Claude Menet d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche. C'est un honneur de voir ces travaux considérés par votre expertise.

J'en profite pour remercier toutes les personnes et institutions impliquées dans le projet ANR qui a financé ce doctorat.

Ces prochains remerciements s'adressent de manière non exhaustive, aux personnes m'ayant entourée ces trois dernières années.

Je commence évidemment par remercier très chaleureusement mes trois directeurs de thèse : Dr. Yannis Francois, Pr. Pascal Houzé et Dr. Rabah Gahoual, pour m'avoir fait confiance et accompagnée dans mes idées tout au long de ce doctorat. J'ai eu la chance d'avoir trois encadrants de très grande qualité, et je suis reconnaissante d'avoir évolué avec vous durant ces trois années. Pascal, tu m'as toujours aidée à maintenir l'objectif concret de ce travail, merci beaucoup pour cela. Yannis, merci pour toutes tes idées, tes conseils et ta patience, à chaque fois que j'en ai eu besoin. Tu m'as également appris à vidanger, à démonter/remonter la plupart de nos appareils, et même quelques bases d'électricité, qui en fait, on ne dirait pas, mais sont tellement nécessaires pour obtenir des électrophérogrammes ! Merci de m'avoir laissé réparer des trucs à coup de papier alu, ça marche trop bien. Rabah, je voudrais souligner et remercier ton investissement et tes nombreux conseils. Tu m'as toujours spontanément mise en avant et encouragée à poursuivre mes idées, je te remercie énormément pour ta confiance. Rabah, Yannis, votre encadrement, vos conseils et votre bienveillance m'ont fait grandir en tant que chercheuse, mais aussi d'un point de vue personnel. Merci infiniment pour votre soutien permanent (sauf quand vous voulez gagner au mini-golf).

Un grand merci également à tous les membres de mes deux laboratoires d'accueil. Merci à Dr. Emmanuelle Leize-Wagner, directrice du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et des Systèmes (LSMIS), pour tout ce que tu m'as appris sur la spectrométrie de masse et pour tes conseils pertinents tout au long de ce projet. Merci aussi à Dr. Noëlle Poitier pour la qualité de tes conseils scientifiques et ton aide à chaque fois que je suis venue t'en demander. Du côté de l'unité de Technologies Chimique et Biologique pour la Santé (UTCBS), je voudrais remercier aussi tous les membres pour leur chaleureux accueil à chaque fois que je suis venue. Merci à Dr. Nathalie Mignet pour ton soutien et la pertinence de tes remarques. Un grand merci à Dr. Khair Alhareth pour la bonne humeur que tu apportes à chaque discussion.

Et comment ne pas remercier les collègues doctorants ! D'abord, Clarisse Gosset, que dis-je : Dr Clarisse Gosset, ma sista' de thèse. Des nombreuses pauses thé aux stress précongrès, des attaques de capillaires aux démontages de CE, juste : merci d'avoir été là. Merci pour tes idées, ta bonne humeur, tes

encouragements, merci à toi et à ta maman pour nous avoir nourris au chocolat, ça a été un privilège de réaliser ma thèse à tes côtés. Merci également à Dr Mathieu Galmiche, mon compère de bureau qui avance à mille à l'heure. Merci pour tes conseils, les discussions scientifiques, pour les cafés et les pizzas du midi ! Merci à vous deux de m'avoir formé à la CE, du montage de capillaires aux dizaines de BGE faits et refaits. Je vous souhaite plein de bonheur pour la suite. Émilie Hirschler, ma dernière coéquipière de thèse, ça a été un vrai bonheur de partager tous ces moments avec toi. Toujours avec le sourire, des anecdotes et des passions (entre autres culinaires), tu es une pile électrique. Je ne doute pas de tes réussites futures et te souhaite tout le meilleur pour la suite de ta thèse, et pour le reste aussi ! Merci à vous trois, on a beaucoup ri !

Merci également à Anthony et Christophe de m'avoir accueillie à la fin de vos thèses.

Puis vient le tour des stagiaires, qui chaque année ont apporté leur bonne humeur à la vie du laboratoire. Je tiens à remercier particulièrement Alexandre Kulus, Aynur Naghizade et Lola Alez-Martin, dont les stages de M2 auront été de grands moments de ma thèse. Vos efforts accompagnés de votre enthousiasme furent extrêmement agréables et ont permis de concrétiser des beaux projets ! Lola, je te souhaite une excellente réussite pour la thèse que tu débutes, dont je ne doute pas de l'accomplissement. Des remerciements aussi à Oumayma que j'ai co-encadrée, avec beaucoup de plaisir. Je tiens aussi à remercier Clémence, Aurore, Louis, Mévie, Nicolas et Silya avec qui j'ai eu le plaisir de passer de nombreux moments. Du côté de l'UTCBS, un grand merci à Maryame Berkani pour le super stage effectué sur ce projet.

Évidemment, un grand merci à Stéphanie Coutin, que l'on retrouve les midis, dans la joie et la bonne humeur. Ces repas, à parler d'absolument tous les sujets qui nous viennent à l'esprit, vont beaucoup me manquer. Merci Steph pour ta bienveillance, tes encouragements et pour ces super moments.

Et puis je voudrais également mentionner les voisins du laboratoire : l'équipe de Biogéochimie moléculaire avec le Dr. Pierre Adam, Dr. Philippe Schaeffer, Estelle Motsch, Alice Fradet et Yu Min Kiw. J'ai véritablement adoré ces discussions dans le couloir. Merci pour tout le matériel que vous nous avez prêté, jusqu'au ventilateur, nécessaire ces derniers jours de rédactions.

Je remercie aussi Dr. Laurent Raibaut, toujours plein d'enthousiasme et avec le sourire, ça a été un plaisir de te croiser au labo.

Toujours dans les remerciements des personnes de l'institut Lebel, je voudrais faire une mention à Sanaa Dreistadt, qui a toujours su faire preuve de patience et d'une réactivité incroyable dès que j'avais besoin d'aide administrative. Merci beaucoup.

Je voudrais aussi remercier chaleureusement Dominique Melon, pour les nombreuses fois où tu as sauvé ma thèse en répondant à mes mails et mes questions. Merci pour ta bienveillance et ta rapidité pour m'aider à réparer la CE.

Ces remerciements sont aussi l'opportunité de m'adresser aux nombreuses personnes avec qui j'ai pu travailler lors de collaborations. En premier lieu, je souhaiterais remercier l'équipe de l'IBMC Philippe

Hamman, Johana Chicher et Lauriane Kuhn pour m'avoir introduite à la protéomique. Lauriane, merci pour tout le temps que tu m'as accordé et pour tes nombreuses explications sur divers sujets. Un puits de science. Merci également à Dr. Alexander Smirnov et Christelle Gruffaz au GMGM pour le projet très intéressant que nous avons pu débiter ensemble. Ces réunions m'ont énormément appris sur certains aspects de la biologie.

Je voudrais aussi mentionner tous les membres de l'équipe LSMBO dirigée par le Dr. Sarah Cianferani. Merci pour votre bienveillance lors de mes passages. Merci au Dr. Oscar Hernandez d'avoir pris le temps de faire progresser mes travaux par nos discussions et de m'avoir formé à la photométrie de masse. Je voudrais également remercier Hugo, Corentin, Jérôme, Rania, Jeewan, Marie, avec qui j'ai eu le plaisir de passer du temps lors de congrès ou bien lors de mes passages à Cronenbourg. En particulier, Corentin, avec qui j'ai pu découvrir Minneapolis. Puis Jérôme, qui m'a accompagnée à la fête de la Tomate de la Nouvelle-Orléans (oui oui) ainsi que ses bars jazz. Ça a été une pause post-rédaction géniale !

J'en viens ensuite à mon expérience d'enseignement à la Faculté de Chimie de Strasbourg. Tout d'abord, merci beaucoup Yannis de m'avoir fait confiance pour encadrer des TP, ça a été une expérience extrêmement enrichissante. Et puis bien entendu, en vrai, je voudrais remercier Thomas Weissenberger. Merci énormément pour ta bienveillance lors des TP, pour toute l'aide apportée dès que la CI a fait des siennes, et pour les innombrables blagues que tu sors à la seconde.

J'ai pu également compter sur de nombreux collègues ayant partagé ces enseignements avec moi. On retrouve Clacla et Emilie, ainsi que Dr. Anaïs Rodrigues, Dr Guillermo Monreal Santiago, Dr. Supansa Chimjarn et Dr. Ahmad Saad: Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous !

Merci également à tous les étudiants que j'ai pu encadrer, pour votre enthousiasme et motivation ! Je retire de cette expérience une grande satisfaction !

À présent, je vais remercier mes proches, à qui je dois beaucoup.

Déjà, je voudrais commencer par celles qui ont partagé ma vie de thésarde à Stras : Anaïs et Alizée. Mes motivations du sport, mes références organiciennes. Je pense qu'on sera parvenu à faire le tour des crêperies et pizzerias. Nos sorties furent à chaque fois un grand bol d'air frais, merci beaucoup à vous deux pour cela. Anaïs, notre collocation fut une source de plénitude pour moi. J'ai adoré rentrer nous raconter nos journées, nos petites habitudes, et les week-ends que, par alignement céleste, l'on parvenait à passer ensemble.

Ensuite, je pense à Cécile, ma compatriote analytique. Avec nos sujets de thèse tellement complémentaires, ça a été vraiment une excitation et une joie immense de te retrouver aux congrès ! Surtout, merci pour toutes ces soirées sur Paris, et ces fous rires que je retrouve avec toi ! Lors de mes passages à Paris, je retrouve aussi Irène, ma complice de l'ECPM. Merci pour ton soutien et pour tous ces moments. Puis, je remercie Élise, on se connaît depuis le lycée et c'est toujours trop top quand on se retrouve ! De l'ECPM, il y a évidemment Eva, Lukas, Ann-So, Albi et Honorine. Vous êtes vraiment des perles !

Je n'oublie pas Margaux et Ysalis ! VH, le ski, le séma, (jeunesse jeunesse) la couture, nos weekends... je vous remercie pour tous ces moments.

Et puis évidemment, j'en arrive à ma petite secte : Chab, Elliott, Alex, Lili, Neness, Mouch, Maryon Pompom, Andréa, Célia, Yohan, Quentin, Constance, Zoé, Morgane, Armand, Julie. Une belle brochette. Vous êtes juste incroyables, mes élastiques incassables, mes coupains formidables. Merci à tous pour chaque moment. Neness, ça fait près de 20 ans que je suis en fou rire dès que je suis avec toi, merci d'augmenter ainsi mon espérance de vie.

Cette thèse est dédiée à tous les membres de ma famille, pour votre soutien depuis le début.

Tout d'abord un grand merci à mes grands-parents Mireille, Gilbert et Anny pour chacune de vos attentions. Dédicace assurément aussi à Nadine, Philippe, Andreï, Max', Yoann, Fiona, Paul et Léon, les best du Jura!

Merci à mes petits frérots, Math' et Robi, le sang. Merci pour vos blagues (parfois nulles), vos délires (souvent farfelus), et votre soutien à mes projets (toujours présent). Un grand merci à Kimie et Maelle aussi ! Et puis évidemment, merci à mes parents, Lydia et Yannick, pour tout ce que vous faites pour moi. Merci d'apporter constamment de la joie, dans notre famille de grands enfants qui raffolent de jeux. Merci 'Pa pour tes encouragements et toutes tes attentions. Merci Môman pour ton indéfectible soutien, et d'avoir relu ma thèse avec grande attention.

Merci à ma deuxième famille, Blandine, Jean, Denis, Noëlle, Méli, Hugo, Marine et Alex (oui tu as le droit à un deuxième remerciement), qui m'a si bien accueillie. Merci pour tous ces moments partagés, vous êtes géniaux.

Enfin, j'en arrive à toi, Armand. Merci pour ton amour, ton énergie, et tes attentions quotidiennes. Merci pour tes investissements et encouragements dans cette thèse (tmtc), que ce soit dans les plats préparés (oui ça compte :)!), dans les longues discussions sur mes projets, dans tes conseils mathématiques, ou tes nombreuses relectures. Merci pour ton cœur, tes rires, les miens. J'ai hâte de ce nouveau chemin avec toi.

SOMMAIRE GENERAL

REMERCIEMENTS.....	- 3 -
SOMMAIRE GÉNÉRAL.....	- 7 -
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	- 11 -
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES.....	- 13 -
NOTATIONS.....	- 17 -
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	- 19 -
PARTIE I : INTRODUCTION ET REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 24 -
Chapitre 1. Anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	- 25 -
1.1. Structure des mAbs	- 25 -
1.2. Infliximab, un mAb thérapeutique.....	- 32 -
Chapitre 2. Couplage CE-MS/MS pour l'analyse d'anticorps monoclonaux	- 37 -
2.1. Électrophorèse capillaire.....	- 37 -
2.2. Spectrométrie de masse.....	- 41 -
2.3. Couplage CE-MS pour la caractérisation des mAbs.....	- 50 -
2.4. Conclusion	- 62 -
Chapitre 3. Méthodes pour le suivi quantitatif de mAbs.....	- 63 -
3.1. Quantification de mAbs par ELISA.....	- 64 -
3.2. Quantification de mAbs par spectrométrie de masse	- 67 -
Conclusion.....	- 76 -

PARTIE II : MISE EN PLACE DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE - 77 -

Chapitre 4. Sélection des peptides à suivre.....	- 81 -
4.1. <i>Quantification absolue : Sélection de l'étalon interne et des peptides signatures-</i>	<i>81 -</i>
4.2. <i>Caractérisation structurale : Sélection des sites de PTM</i>	<i>83 -</i>
Chapitre 5. Développement de la méthode de purification	- 87 -
5.1. <i>Introduction.....</i>	<i>88 -</i>
5.2. <i>Materials and methods.....</i>	<i>90 -</i>
5.3. <i>Results and discussion</i>	<i>94 -</i>
5.4. <i>Conclusion</i>	<i>103 -</i>
5.5. <i>Supporting Information.....</i>	<i>105 -</i>
Chapitre 6. Analyse CESI-MS/MS des peptides	- 107 -
6.1. <i>Optimisation de la séparation électrophorétique</i>	<i>107 -</i>
6.2. <i>Analyse par spectrométrie de masse.....</i>	<i>110 -</i>
Chapitre 7. Mise en place d'une stratégie de normalisation pour la caractérisation des PTM-	115 -
7.1. <i>Quantification relative brute des PTM après analyse CE-MS/MS.....</i>	<i>115 -</i>
7.2. <i>Mise en place d'une stratégie de normalisation</i>	<i>119 -</i>
Conclusion.....	- 124 -

PARTIE III : APPLICATION DE LA STRATÉGIE CE-MS/MS POUR LA QUANTIFICATION ET CARACTÉRISATION STRUCTURALE DE L'INFLIXIMAB APRÈS ADMINISTRATION..... - 125 -

Chapitre 8. Quantification et caractérisation structurale simultanée d'infliximab <i>in vivo</i> -	129 -
8.1. <i>Introduction.....</i>	<i>130 -</i>
8.2. <i>Materials and methods.....</i>	<i>132 -</i>
8.3. <i>Results and discussion</i>	<i>137 -</i>
8.4. <i>Conclusion</i>	<i>148 -</i>
8.5. <i>Supporting Information.....</i>	<i>149 -</i>

Chapitre 9. Prédiction des PTM post-administration du produit original de l’infiximab et de ses biosimilaires	- 153 -
9.1. Introduction	- 155 -
9.2. Materials and methods	- 157 -
9.3. Results and discussion	- 160 -
9.4. Conclusion	- 166 -
9.5. Supporting information	- 168 -
9.6. Discussions additionnelles	- 169 -
Conclusion	- 178 -

PARTIE IV : IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION D’ANTICORPS IMMUNOGÈNES PAR CE-MS/MS.....	- 179 -
--	---------

Chapitre 10. Stratégie CE-MS/MS pour la détermination de constante de dissociation entre deux anticorps	- 183 -
10.1. Introduction	- 186 -
10.2. Materials and methods	- 188 -
10.3. Results and discussions	- 190 -
10.4. Conclusions	- 198 -
10.5. Supporting information	- 199 -
Chapitre 11. Quantification simultanée de l’infiximab et de ses anticorps immunogènes dans le sérum par CE-MS/MS	- 201 -
11.1 Introduction	- 202 -
11.2 Materials and methods	- 204 -
11.3 Results and discussions	- 206 -
11.4 Conclusions	- 213 -
11.5 Supporting information	- 214 -
11.6 Discussions additionnelles	- 215 -

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	- 219 -
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 224 -
LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	- 240 -
ENSEIGNEMENTS DÉLIVRÉS.....	- 242 -
AUTRES RESPONSABILITÉS	- 242 -
ANNEXES.....	243

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	
ADA :	<i>Anti-Drug Antibody</i>
ADC :	<i>Antibody Drug Conjugate</i>
ADCC :	<i>Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>
ADM :	<i>Adalimumab</i>
AMM :	<i>Autorisation de Mise sur le Marché</i>
AQUA :	<i>Absolute QUAntification</i>
ATI :	<i>Antibody To Infliximab</i>
B	
BGE :	<i>Background Electrolyte</i>
C	
CDC :	<i>Complement Dependent Cytotoxicity</i>
CDR :	<i>Complementary Determining Regions</i>
CE :	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CE-ESI-MS :	<i>Capillary Electrophoresis hyphenated to Electrospray ionisation and Mass spectrometry</i>
CH :	<i>Constant Heavy region</i>
CID :	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CQA :	<i>Critical Quality Attribute</i>
CV :	<i>Coefficient de Variation</i>
CZE :	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
D	
Da :	<i>Dalton</i>
DDA :	<i>Data Dependent acquisition</i>
DIA :	<i>Data Independent acquisition</i>
DLS :	<i>Diffusion Light Scattering</i>
DTT :	<i>Dithiothreitol</i>
deaN :	<i>Asparagine Deamidation</i>
E	
ECD :	<i>Electron Capture Dissociation</i>
EIE :	<i>Extracted ion electropherogram</i>
ELISA :	<i>Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay</i>
EMA :	<i>European Medicines Agency</i>
EOF :	<i>Electro-osmotic flow</i>
ESI :	<i>Electrospray ionization</i>
ETD :	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
F	
FA :	<i>Formic Acid</i>
F _{ab} :	<i>Fragment antigen binding</i>
F _c :	<i>Fragment crystallizable</i>
F _c R :	<i>F_c Receptor</i>
F _c R _n :	<i>F_c Receptor neonatal</i>
FDA :	<i>US Food and Drug Administration</i>
FWHM :	<i>Full Width at Half Maximum</i>
G	
GlcNAc :	<i>N-acétylglucosamine</i>

GS1/2 :	<i>Gas Supply</i>
H	
HC :	<i>Heavy Chain</i>
HMSA :	<i>Homogeneous Mobility Shift Assay</i>
HPLC :	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP :	<i>Horseradish Peroxidase</i>
I	
IAA :	<i>Iodoacetamide</i>
IDMS :	<i>Isotopic Dilution Mass Spectrometry</i>
IFX :	<i>Infliximab</i>
Ig :	<i>Immunoglobuline</i>
IgG :	<i>Immunoglobuline G</i>
isoD :	<i>Aspartic acid isomerization</i>
ITP :	<i>Isotachophorèse</i>
K	
kDa :	<i>kiloDalton</i>
L	
LBA :	<i>Ligand Binding Assay</i>
LC :	<i>Light Chain</i>
LOD :	<i>Limit of Detection</i>
LOQ :	<i>Limit of Quantification</i>
M	
M :	<i>Molaire</i>
mAb :	<i>Monoclonal Antibody</i>
MALDI :	<i>Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MALS :	<i>Multi-angle Light Scattering</i>
MAM :	<i>Multiple Attribute Monotoring</i>
MP :	<i>Mass Photometry</i>
MRM :	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS :	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS :	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
MT :	<i>Migration Time</i>
m/z :	<i>rapport masse sur charge</i>
N	
NATI :	<i>Neutralizing Antibody to Infliximab</i>
NF-κB :	<i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NK :	<i>Natural Killer Cell</i>
Non-NATI :	<i>Non Neutralizing Antibody to Infliximab</i>
O	
oxiM :	<i>Methionine oxidation</i>
P	
PBS :	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PFF :	<i>Peptide fragment fingerprinting</i>
PMF :	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
PTM :	<i>Post Translational Modification</i>

PSAQ : *Protein Standard Absolute Quantification*

Q

Q : *Quadripôle*

QbD : *Quality by Design*

QC : *Quality Controls*

R

RG : *RapiGestSF®*

RGA : *Reporter Gene Assay*

RIA : *Radioimmunoassay*

RT : *Room Temperature*

RSD : *Residual Standard Deviation*

S

SEC : *Steric Exclusion Chromatography*

SIL : *Stable Isotope Labeled mAb*

SPR : *Surface Plasmon Resonance*

SRM : *Single Reaction Monitoring*

sTNF- α : *Soluble Tumor Necrosis Factor alpha*

T

TAQSI : *Targeted Absolute Quantitative proteomics SILAC internal standards*

t-ITP : *transient Isotachopheresis*

TMB : *3',5,5'-tétraméthylbenzidine*

tmTNF- α : *Transmembrane Tumor Necrosis Factor alpha*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha*

TOF : *Time of Flight*

V

VH : *Variable Heavy chain*

V_{inj} : *Volume d'injection*

VL : *Variable Light chain*

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES

Chapitre 1

- Figure 1.1.** Représentation schématique des différents types d'anticorps monoclonaux.
Figure 1.2. Mécanisme de déamidation d'asparagine (N) en acide aspartique (D) ou acide iso-aspartique (*isoD*).
Figure 1.3. Mécanismes d'action de l'infliximab dans le système humain.
Table 1.1. Liste des principales modifications post-traductionnelles des acides aminés d'un anticorps.
Table 1.2. Formes d'infliximab titulaire d'une autorisation de mise sur le marché en France.

Chapitre 2

- Figure 2.1.** Représentation schématique d'une séparation d'analytes en électrophorèse capillaire de zone (CZE).
Figure 2.2. Représentation schématique d'une séparation d'analytes en isotachophorèse (ITP).
Figure 2.3. Premières interfaces développées pour le couplage CE-ESI-MS.
Figure 2.4. Représentation schématique de l'interface CESI.
Figure 2.5. Représentation schématique du TTOF 5600.
Figure 2.6. Principe de fonctionnement d'un quadripôle.
Figure 2.7. Mécanisme de dissociation des peptides par CID.
Figure 2.8. Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol avec réflectron.
Figure 2.9. Schematic representation of the structure of a monoclonal antibody.
Figure 2.10. Representation of the principal analytical approach used for the characterization of mAbs.
Figure 2.11. Electrophérogramme obtenu après analyse d'un digest peptidique d'infliximab par CE-ESI-MS/MS.
Figure 2.12. Différentes approches analytiques pour la caractérisation des glycosylations des mAbs.
Figure 2.13. Analyse CE-ESI-MS des glycopeptides non-sialylés de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) après digestion tryptique.

Chapitre 3

- Figure 3.1.** Format Bridging ELISA utilisé pour la quantification de mAb dans du sérum.
Figure 3.2. Principe de la quantification absolue d'un mAb issu d'une matrice sérique par MS, par ajout d'étalons internes.
Figure 3.3. Principaux critères d'une validation de méthode, selon les réglementations FDA et EMA.

Chapitre 4

- Figure 4.1.** Méthodologie schématisée de l'approche de quantification et caractérisation structurale de l'infliximab mise en place.
Figure 4.2. Représentation schématique de l'infliximab et localisation des *hotspots* sélectionnés pour le suivi structural de l'infliximab post-administration.
Table 4.1. Peptides choisis pour le suivi quantitatif de l'infliximab dans le sérum humain.

Chapitre 5

- Figure 5.1.** Représentations des différents paramètres de rendements considérés pour évaluer les protocoles de purification d'échantillons avant analyse CE-MS/MS.
Figure 5.2. Approches étudiées pour l'extraction spécifique et la digestion de l'infliximab issu d'une matrice biologique pour mener à sa quantification et caractérisation structurale via la CE-MS/MS.
Figure 5.3. EIE du peptide SINSATHYAESVK.
Figure 5.4. Effets de la taille du filtre sur le rendement de l'étape de filtration.
Figure 5.5. Rendement de la filtration lorsque l'infliximab est introduit dans le filtre dans H₂O ou dans un tampon citrate.
Figure 5.6. Performance de la filtration de l'infliximab dilué dans un tampon citrate avec ou sans ajout de surfactant.
Figure 5.S1: Rendement calculé pour l'étape d'extraction de l'infliximab.
Figure 5.S2. Durée de l'étape d'isotachophorèse de chaque échantillon dans la séparation par CE.
Figure 5.S3. Rendement de l'étape d'extraction par affinité selon les conditions de filtration.
Figure 5.S4. Spectres MALS et UV de l'infliximab dans de l'eau ou un tampon citrate.
Table 5.1. Comparaison des trois stratégies étudiées sur le rendement total d'infliximab, la répétabilité, les limites de détection et de quantification, et la visibilité des PTM.

- Table 5.2.** Résolution des entre les peptides modifiés et non modifiés observés selon le protocole de préparation des échantillons.
- Table 5.S1.** Caractéristiques des peptides suivis pour le suivi CE-MS/MS d'infliximab et du SIL-IFX.

Chapitre 6

- Figure 6.1.** Evolution des paramètres de séparations électrophorétiques d'un digest peptidique d'infliximab issu de matrice sérique différentes acquisitions.
- Figure 6.2.** Stratégie d'acquisition MS implémentée pour la quantification d'infliximab par *bottom-up*.
- Table 6.1.** Plan d'expérience utilisé pour l'optimisation des conditions électrophorétiques.
- Table 6.2.** Paramètres de l'acquisition MS et MS/MS des peptides séparés en CE.

Chapitre 7

- Figure 7.1.** Spectres MS (EIE) et MS/MS des glycopeptides de l'infliximab après analyse CE-MS/MS du digest peptidique.
- Figure 7.2.** EIE des peptides avec ou sans sites *hotspot* PTM de l'infliximab après analyse CE-MS/MS du digest peptidique.
- Figure 7.3.** Proportions relatives des 9 PTM observées par CE-MS/MS pour l'infliximab ou le SIL-IFX issus de sérums, selon deux protocoles de digestions peptidiques.
- Figure 7.4.** Stratégie de normalisation implémentée pour la détermination des proportions de PTM apparues seulement lors de l'administration de l'infliximab aux patients, f_{blood}^{IFX} .
- Figure 7.5.** Stratégie de normalisation appliquée à des sérums modèles dopés avec de l'infliximab et du SIL.
- Figure 7.6.** Proportions normalisées f_{blood}^{IFX} des 9 PTM pour l'infliximab ou le SIL-IFX issus de sérums dopés modèles, selon deux protocoles de digestions peptidique.
- Table 7.1.** Proportions relatives brutes après analyse CE-MS/MS (L_{ref}^{IFX} et L_{ref}^{SIL}) moyennes des PTM de l'infliximab et de SIL-infliximab dopés dans des sérums sains.

Chapitre 8

- Figure 8.1.** Représentation schématique du protocole mit en place pour la quantification absolue et la caractérisation simultanée de PTM de l'infliximab issu de sérum, par CE-MS/MS.
- Figure 8.2.** Justesse et précision de la quantification d'infliximab par CE-MS/MS et comparaison à l'analyse ELISA.
- Figure 8.3.** Profils de glycosylation obtenu par analyse CE-MS/MS d'infliximab issu de matrice sérique ou de formulation pure.
- Figure 8.4.** Proportions relatives de PTM obtenues par analyse CE-MS/MS d'infliximab issu de matrice sérique ou de formulation pure.
- Figure 8.5.** Quantification d'infliximab dans les sérums de 24 patients traités avec cette biothérapie, par CE-MS/MS et tests ELISA.
- Figure 8.6.** Représentation schématique de la procédure appliquée pour quantifier précisément les PTM de l'infliximab seulement apparues après administration du traitement aux patients.
- Figure 8.7.** Mesures de la variation de la proportion des glycanes de l'infliximab lorsqu'il a circulé dans l'organisme de chaque patient.
- Figure 8.8.** Mesures de la variation de la proportion des PTM de l'infliximab lorsqu'il a circulé dans l'organisme de chaque patient.
- Figure 8.9.** Etude des évolutions de la concentration absolue d'infliximab et de la proportion de f_{blood}^{IFX} de N⁵⁷ avec le temps de résidence de l'infliximab dans le corps des patients.
- Figure 8.S1.** Séquence d'acides aminés de l'infliximab.
- Figure 8.S2.** Etude de la linéarité de la méthode de quantification absolue d'infliximab.
- Figure 8.S3.** Etude de la stabilité du digest peptidique de l'infliximab et du SIL-IFX.
- Figure 8.S4.** Séparations CE de peptides avec ou sans les PTM *deaN*¹³⁷ ou *isoD*²⁸³.
- Figure 8.S5.** Proportions relatives de PTM obtenues par analyse CE-MS/MS du SIL-IFX issu de matrice sérique ou de formulation pure.
- Figure 8.S6.** Profils de glycosylation obtenu par analyse CE-MS/MS du SIL-IFX issu de matrice sérique ou de formulation pure.

Table 8.1.	Présentation des différentes étapes éventuellement inductrices de PTM endogènes.
Table 8.2.	Résultats compilés de la validation de méthode CE-MS/MS pour la quantification absolue d'infliximab dans du sérum biologique.
Table 8.3.	Test de Welch pour identifier statistiquement les PTM de l'infliximab apparues post-administration.
Table 8.S1.	Valeurs des concentrations d'infliximab dans le sérum des 24 patients obtenues par CE-MS/MS ou ELISA.
Table 8.S2.	Valeurs des proportions relatives des 6 glycanes de l'infliximab dans le sérum de 21 patients obtenues par CE-MS/MS.
Table 8.S3.	Valeurs des proportions relatives des 6 PTM de l'infliximab dans le sérum de 21 patients obtenues par CE-MS/MS.

Chapitre 9

Figure 9.1.	Représentation schématique de l'établissement du calcul permettant de quantifier précisément les PTM de l'infliximab seulement apparues durant le stress d'incubation contrôlé <i>in vitro</i> .
Figure 9.2.	Représentation schématique de la procédure appliquée pour quantifier précisément les PTM de l'infliximab seulement apparues durant le stress d'incubation contrôlé <i>in vitro</i> .
Figure 9.3.	Séparations CE de peptides avec ou sans les PTM <i>deaN</i> ⁵⁷ ou <i>isoD</i> ⁴⁰⁴ .
Figure 9.4.	PTM de l'infliximab (original et biosimilaires) seulement apparues durant le stress d'incubation contrôlé <i>in vitro</i> dans du sérum.
Figure 9.5.	Rendements de l'extraction spécifique de l'infliximab (original et biosimilaires) selon le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du sérum.
Figure 9.6.	Profils de glycosylation de l'infliximab (original et biosimilaires) selon le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du sérum.
Figure 9.7.	Proportions d'oxydations de méthionines de l'infliximab (original et biosimilaires) selon le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du sérum.
Figure 9.8.	Proportions de déamidation de l'infliximab (original Remicade®) selon le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du sérum.
Figure 9.9.	Proportions de déamidation de l'infliximab (biosimilaires Inflectra® et Remsima®) selon le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du sérum.
Figure 9.10.	Différents aspects du sérum après prélèvement du sang aux patients.
Figure 9.11.	Proportions de déamidation de l'infliximab (original Remicade®) selon le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du PBS ou du bicarbonate d'ammonium.
Figure 9.S1.	Proportions relatives de PTM obtenues par analyse CE-MS/MS du SIL-IFX issu de matrice sérique.
Figure 9.S2.	Comparaison de l'évolution de la proportion de f_{blood}^{IFX} de <i>deaN</i> ⁵⁷ avec le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du sérum et <i>in vivo</i> dans le corps de patients.
Figure 9.S3.	Comparaison de l'évolution de la proportion de f_{blood}^{IFX} de <i>deaN</i> ³⁸⁷ avec le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du sérum et <i>in vivo</i> dans le corps de patients.
Table 9.1.	Valeurs de surfaces accessibles de 12 asparagines de l'infliximab selon les structures 3D
Table 9.2.	Valeurs de surfaces accessibles des chaînes latérales des acides aminés en C-terminal des asparagines considérées.
Table 9.S1.	Proportions relatives brutes (avant normalisation) des PTM de l'infliximab (original et biosimilaires) selon le temps d'incubation <i>in vitro</i> dans du sérum.

Chapitre 10

Figure 10.1.	Analyses par photométrie de masse a. d'un mélange équimolaire SIL-IFX et NATI b. de NATI seul c. de SIL-IFX seul d. d'un mélange équimolaire SIL-ADM et NATI.
Figure 10.2.	Formes schématiques des complexes (1 :1) entre l'infliximab et le NATI.
Figure 10.3.	Etude cinétique de la complexation infliximab/NATI par photométrie de masse.
Figure 10.4.	Représentation schématique du protocole pour déterminer la constante de dissociation K_d entre un infliximab et un NATI, par CE-MS/MS.
Figure 10.5.	Régression linéaire du ratio peptidique MS de $IFX^*_{LC01} / ADM^*_{HC01}$ avec la concentration de SIL-IFX.
Figure 10.6.	Décroissance du ratio peptidique MS de $IFX^*_{LC01} / ADM^*_{HC01}$ avec la concentration de NATI.
Figure 10.7.	Plot de a_0/K_d en fonction de la concentration de NATI a_0 pour déterminer le K_d .
Figure 10.S1.	Séparation CE des peptides IFX^*_{LC01} du SIL-IFX et ADM^*_{HC01} du SIL-ADM.

- Figure 10.S2.** Impact des concentrations de NATI a_0 sur la détermination du K_d .
Table 10.1. Ions MS et MS/MS des peptides suivis pour le SIL-IFX et le SIL-ADM.
Table 10.2. Tableau d'avancement de la réaction de complexation entre un paratope de l'infliximab et un de NATI.

Chapitre 11

- Figure 11.1.** Représentation schématique du protocole pour quantifier simultanément l'infliximab et le NATI dans du sérum, par CE-MS/MS.
Figure 11.2. Régression linéaire du ratio peptidique MS de IFX_{LC01} / ADM*_{HC01} avec la concentration d'infliximab.
Figure 11.3. Biais du rétrocalcul de la concentration de NATI a_0 après analyse CE-MS/MS de sérums dopés à des concentrations connues.
Figure 11.4. Application de la stratégie pour la quantification simultanée d'infliximab et de NATI à des contrôles qualités de sérums modèles dopés en des concentrations connues.
Figure 11.5. Application de la stratégie pour la quantification simultanée d'infliximab et de NATI à 13 sérums de patients.
Figure 11.6. Représentation schématique du protocole final menant à la multi-caractérisation d'un sérum d'un patient traité avec de l'infliximab.
Figure 11.S1. Séparation CE des peptides de suivi de l'infliximab, du SIL-IFX et du SIL-ADM.
Figure 11.S2. Spectres MS/MS obtenus après fragmentation CID des peptides signatures de l'infliximab, du SIL-IFX et du SIL-ADM.
Table 11.1. Ions MS et MS/MS des peptides suivis pour l'infliximab, le SIL-IFX et le SIL-ADM.
Table 11.2. Concentration de NATI, d'infliximab, et proportions de certaines *deaN* et *isoD* de l'infliximab apparues *in vivo* chez 13 sérums de patients.

NOTATIONS

ξ Potentiel zêta de la double couche en CE (V)

ε	Constante diélectrique de l'électrolyte support BGE ($\text{kg}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$)
η	Viscosité de l'électrolyte support ($\text{kg}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
E	Intensité du champ électrique ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$)
μ_{eo}	Mobilité électroosmotique ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
μ_{ep}	Mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
μ_{app}	Mobilité apparente ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
q	Charge globale de l'analyte
r	Rayon hydrodynamique (cm)
H	Hauteur d'un plateau théorique
v_x	Vitesse de la phase mobile ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)
E_c	Energie cinétique (J)
V	Potentiel appliqué au capillaire (V)
D_m	Coefficient de diffusion ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)
MT	Temps de migration (min)
ω	Largeur du pic (min)
V_{inj}	Volume d'injection (nL)
K_d	Constante de dissociation
γ	Coefficient d'activité
$r - ratio$	Rapport des Aires MS des peptides IFX* _{LC01} /ADM* _{LC01} (SIL-IFX/SIL-ADM)
$y - ratio$	Rapport des Aires MS des peptides IFX _{LC01} /ADM* _{LC01} (IFX/SIL-ADM)
p	Probabilité d'une interaction infliximab/NATI
f_Y^X	Facteur de modification d'une PTM sur un acide aminé de la protéine « X », lors de l'étape « Y » de sa vie
L_Z^X	Proportion relative brute d'une PTM sur un acide aminé de la protéine « X » obtenue après analyse CE-MS/MS d'un échantillon « Z »

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Fin 2022, on recense près de 1200 anticorps monoclonaux (mAbs) à usage thérapeutique en cours d'essais cliniques et environ 130 approuvés par les autorités européennes ou américaines pour le traitement de maladies. Leur intérêt thérapeutique repose sur leur grande spécificité et leur durée

de demi-vie relativement longue par rapport à d'autres biomolécules, leur attribuant une meilleure efficacité et facilité d'administration aux patients. Lors de la production de ces biomolécules, il est important de contrôler à la fois leur concentration, mais aussi certains autres critères. En Europe, ces paramètres sont définis par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) et sont désignés sous le nom de Critères de Qualité Critiques (CQA). Cette démarche est essentielle en raison de la complexité structurelle des anticorps, qui peut entraîner des micro-hétérogénéités susceptibles de compromettre leur efficacité thérapeutique. Par exemple, il est nécessaire de contrôler la proportion de certaines modifications post-traductionnelles (PTM) ou de glycosylations, connues pour leur influence sur les interactions de l'anticorps avec son antigène ou des récepteurs biologiques. Ces dégradations structurelles sont caractérisées par des réactions enzymatiques sur les acides aminés constitutifs de l'anticorps.

Le risque d'agrégation est également à considérer avec précaution, car il peut conduire à l'élimination prématurée du mAb de l'organisme du patient. Par ailleurs, il est essentiel que le traitement demeure soluble et peu visqueux pour conserver son efficacité. Ainsi, avant de pouvoir commercialiser un nouvel anticorps en obtenant son autorisation de mise sur le marché (AMM), les laboratoires développant les mAbs thérapeutiques doivent utiliser diverses méthodes analytiques pour caractériser leur produit. Il convient également de mettre en place des conditions de production et de stockage rigoureusement contrôlées pour assurer une stabilité optimale des anticorps, réduisant ainsi les risques de micro-hétérogénéités incontrôlées et permettant l'administration efficace de ces biomolécules aux patients.

Puis, lorsqu'un mAb a reçu une AMM et est utilisé en tant que traitement thérapeutique d'une maladie, il est administré aux patients pour rejoindre leur circulation sanguine. Étant donné que les mAbs ont une demi-vie d'environ vingt jours, une administration régulière est nécessaire chez ces patients. Il est ainsi crucial de surveiller en permanence la concentration sanguine du mAb, car cette mesure permet d'ajuster la dose thérapeutique suivante, pour conserver une efficacité optimale du traitement. De plus, lorsque la concentration sanguine du mAb thérapeutique semble anormalement faible, d'autres mesures quantitatives sont alors employées pour déterminer si le patient a développé une réaction immunitaire face à ce traitement. Ces deux types de suivis quantitatifs (du mAb thérapeutique et de la réaction auto-immune) sont donc couramment effectués en routine de suivi clinique, à l'aide d'analyses distinctes qui sont à la fois rapides et simples à réaliser. Ceci vise à offrir une prise en charge optimale des patients traités par mAb.

Néanmoins, ces suivis quantitatifs ne parviennent pas encore à totalement appréhender les réponses cliniques de certains patients. De manière pour le moment peu expliquée, après l'administration d'une dose équivalente, certains patients éliminent le traitement à un rythme plus élevé que d'autres. On dit que le mAb a eu une clairance plus élevée. De plus, les réactions

indésirables, incluant l'immunogénicité ainsi que des réactions sévères, varient considérablement d'un patient à un autre. Ce manque de compréhension entraîne une difficulté à prédire les pertes de réponses cliniques, et complique donc la prise en charge thérapeutique. Tout en reconnaissant les avantages indéniables des mAbs thérapeutiques en tant que traitements efficaces, la pratique clinique suggère que la réponse des patients à ces traitements nécessiterait davantage d'informations sur le sort des mAbs après leur administration. À titre d'exemple, le suivi structurel dans l'organisme des patients est encore peu exploré à ce jour. Il apparaît donc impératif de revoir l'approche du suivi des mAbs thérapeutiques, en enrichissant la dimension quantitative, avec une autre qualitative. Cela impliquerait notamment le suivi des micro-hétérogénéités après administration, pour mieux comprendre la dynamique et les variations structurelles de ces anticorps dans la circulation sanguine des patients.

Pour le moment, plusieurs défis subsistent face à ces intentions. Dans un premier temps, bien que la quantification de protéines dans des matrices biologiques soit plutôt bien établie, les méthodes de caractérisation de la structure des anticorps ont essentiellement été appliquées à des produits de formulation. La présence de nombreuses autres protéines et immunoglobulines dans le sérum collecté des patients rend la caractérisation d'un mAb s'y trouvant, particulièrement complexe. De plus, une préoccupation majeure réside dans la multiplication des méthodes pour l'obtention de toutes ces informations. Le manque de standardisation, et surtout la nécessité de réaliser de nombreuses manipulations en parallèle, complexifient la prise en charge clinique. Cela implique de longues caractérisations coûteuses, ainsi que des erreurs associées à des manipulations successives d'échantillons. Il devient donc urgent de développer des méthodes de multi-attributs de ces échantillons biologiques, afin de collecter simultanément plusieurs informations, facilitant alors leurs corrélations.

La spectrométrie de masse (MS) s'est imposée depuis une vingtaine d'années comme une méthode de référence pour l'identification, la quantification et la caractérisation de biomolécules (peptides, protéines, complexes macromoléculaires). Les développements de sources d'ionisation dites "douces", telles que l'électrospray (ESI) et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), et des méthodes de fragmentation dans le spectromètre, ont facilité la caractérisation et même la localisation d'hétérogénéités. Les performances instrumentales continuent d'être améliorées en termes de précision, de mesure de masse, de résolution, de gamme de masse ou encore de sensibilité, afin de relever les défis de l'analyse d'échantillons complexes. De manière à faciliter leur caractérisation, des méthodes séparatives sont généralement couplées à la MS. Parmi celles-ci, on retrouve l'électrophorèse capillaire (CE), offrant une excellente efficacité de pics. La CE est apparue dans les années 1980 comme une méthode de séparation de choix, au vu

de sa rapidité de séparation et sa grande efficacité. Son couplage à la MS a longtemps été un défi technologique, mais les récents développements d'interfaces, et notamment celle *sheathless*, permettent depuis une dizaine d'années le couplage CE-ESI-MS/MS, présentant une excellente efficacité de séparation et sensibilité.

C'est dans ce contexte que se positionnent les travaux détaillés dans ce manuscrit. Ce doctorat s'inscrit dans un projet financé par l'Agence Nationale de Recherche française intitulé *MethAmAbs-Nouvelles approches analytiques adaptées à l'étude des biothérapies dans les milieux biologiques*. Ce projet, d'une période de 3 ans et demi, a débuté en décembre 2019. L'objectif est la mise en place d'une méthode analytique basée sur le couplage CE-ESI-MS/MS pour simultanément quantifier et caractériser structurellement un mAb dans du sérum. L'infliximab, un traitement anti-inflammatoire, régulièrement administré à des individus dans le cadre de la maladie de Crohn, a été étudié dans ce contexte. Il est apparu nécessaire d'utiliser le couplage analytique CE-MS/MS permettant, à partir de la matrice sérique, l'obtention simultanée des informations suivantes :

- La quantification absolue de ce traitement ;
- La caractérisation et l'identification de certaines PTM de l'infliximab survenues pendant sa circulation dans le système sanguin des patients ;
- La quantification des anticorps anti-infliximab immunogènes développés par l'organisme des patients en réaction au traitement.

Ce manuscrit est divisé en 4 parties :

- La première partie est dédiée à la revue bibliographique, structurée en trois chapitres. Le premier est consacré à la maladie de Crohn et à l'utilisation de l'infliximab dans ce contexte. Ensuite, une introduction bibliographique à l'électrophorèse capillaire, la spectrométrie de masse, ainsi qu'à leur couplage pour l'étude des anticorps monoclonaux, est présentée. Enfin, le troisième chapitre aborde les méthodes classiques de quantification de mAb dans des matrices biologiques ;
- La deuxième partie expose les travaux de développement et d'optimisation de la stratégie analytique, visant la quantification et la caractérisation de certaines modifications structurelles de l'infliximab issu d'une matrice biologique. Une approche spécifique d'extraction de cet anticorps, suivie d'une analyse peptide-centrée *bottom-up* en CE-ESI-MS/MS, a été mise en place. Cette section décrit notamment les améliorations apportées à la purification et à la séparation électrophorétique pour atteindre une sensibilité adéquate aux objectifs. De plus, une stratégie permettant de normaliser la quantification des modifications structurelles de l'anticorps est proposée dans le septième chapitre. Cette normalisation permet d'identifier

et de caractériser les modifications post-traductionnelles de l'infliximab survenues uniquement lorsqu'il a circulé dans l'organisme d'un patient ;

- La partie III de ce manuscrit présente dans un premier temps la validation de la méthode par CE-MS/MS menant à la quantification absolue de l'infliximab issu de sérum.

Puis, est décrite l'application de l'approche analytique à 24 sérums prélevés de patients atteints de la maladie de Crohn et traités avec l'infliximab. Simultanément, pour chaque sérum, la concentration de l'infliximab et la caractérisation de ses PTM apparues post-administration ont été obtenues.

Ensuite, le chapitre 9 expose une méthodologie *in vitro* mise en place pour simuler et prédire l'évolution des PTM post-administration de l'infliximab. La stratégie a été appliquée à différents produits commerciaux de l'infliximab (original et biosimilaires) ;

- Enfin, la Partie IV est dédiée à l'extension de la méthode analytique pour quantifier, conjointement aux deux premiers points, le développement d'une réaction auto-immune chez le patient.

Le chapitre 10 présente une nouvelle stratégie développée pour déterminer par CE-MS/MS la constante de dissociation entre un anticorps monoclonal thérapeutique et un anticorps issu d'une réaction auto-immune de l'organisme.

Pour finir, le dernier chapitre de ce manuscrit présente comment le couplage CE-ESI-MS/MS permet, en une seule analyse d'un échantillon sérique, l'obtention simultanée de trois informations cruciales lors d'un suivi clinique de traitement par mAb. Ces informations regroupent la concentration absolue de l'anticorps thérapeutique, la concentration d'anticorps anti-médicament neutralisants (traduisant une réaction auto-immune), et les PTM de l'infliximab après son administration.

PARTIE I : INTRODUCTION ET REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1.

ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES

Préambule

Les anticorps sont des protéines présentes dans les fluides biologiques ou en tant que récepteurs membranaires à la surface des lymphocytes. Ils sont produits par le système immunitaire dans le but de neutraliser des antigènes, tels que des virus ou des bactéries que l'organisme ne reconnaît pas et considère comme étrangers. Un site présent sur l'anticorps, appelé paratope, permet la reconnaissance spécifique de celui-ci à l'épitope d'un antigène. Un individu produit environ 10 milliards d'anticorps, chacun spécifique d'un antigène unique [1].

Cette spécificité a été mise à profit pour l'utilisation d'anticorps à des fins thérapeutiques. En 1975, la première méthode décrivant la production en grande quantité d'anticorps prédéfinis par hybridation cellulaire entre des cellules de rate de souris et des cellules myéloïdes a été décrite par Köhler et Milstein [2]. Cette méthode a ouvert la voie à la production d'anticorps monoclonaux (mAbs), issus d'une même lignée cellulaire. Depuis, des améliorations dans ce domaine ont permis le développement et la mise sur le marché de ces mAbs en tant que biothérapies. Il s'agit d'un des secteurs dans le domaine pharmaceutique le plus développé. Cet engouement est principalement expliqué par la grande spécificité des mAbs pour un antigène particulier.

1.1. Structure des mAbs

1.1.1. Structure protéique des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig). Il s'agit de protéines constituées d'acides aminés et possédant au moins un site de glycosylation. Chez l'humain, les anticorps se répartissent en 5 grandes classes d'Ig, qui se différencient par leurs propriétés physico-chimiques, leurs structures et concentrations sériques. Parmi ces classes, on retrouve des anticorps monomériques (IgG, IgD et IgE) et polymériques (IgA et IgM). Les IgG sont les plus abondantes (80 % des Ig) dans l'organisme.

Dans le cas de développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques, il s'agit généralement d'IgG qui sont produites et commercialisées. Ces glycoprotéines, d'environ 150 kDa, forment quatre chaînes polypeptidiques, constituant deux chaînes lourdes identiques (*Heavy Chain* – HC) et deux chaînes légères également identiques (*Light Chain* – LC). Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures, ce qui confère à l'anticorps une certaine flexibilité et sa forme de Y (Figure 1.1). Selon le nombre de ponts disulfures, les IgG sont subdivisées en plusieurs sous-classes (IgG1 et IgG4 : deux, IgG2 : quatre, IgG3 : quinze). La séquence linéaire des acides

aminés dans une protéine correspond à sa structure dite primaire, et permet de la caractériser précisément. Par convention, la structure primaire est décrite à partir de la fonction amine terminale (N-ter) jusqu'à la fonction acide carboxylique terminale (C-ter).

Les chaînes lourdes et légères sont subdivisées en plusieurs parties, incluant les régions constantes (*Constant Heavy Chain* – CH1, CH2 et CH3 et *Constant Light Chain* – CL), communes à toutes les IgG. On retrouve également deux régions variables, (*Variable Heavy* – VH et *Variable Light* – VL), incluant des séquences d'acides aminés spécifiques au mAb. C'est par ces régions variables que l'anticorps va interagir avec son antigène. Généralement, on distingue la partie supérieure du mAb, contenant la région de liaison à l'antigène (*Fragment antigen binding region* – F_{ab}) à celle cristallisable (*Fragment crystallizable region* – F_c).

Il existe quatre grandes familles d'anticorps monoclonaux thérapeutiques à ce jour : les murins, chimériques, humanisés et humains. Ils se distinguent par leur proportion de séquence issue d'anticorps murins ou humains, ce qui impacte la susceptibilité du traitement à l'immunogénicité, c'est-à-dire au développement d'une défense immunitaire (Figure 1.1).

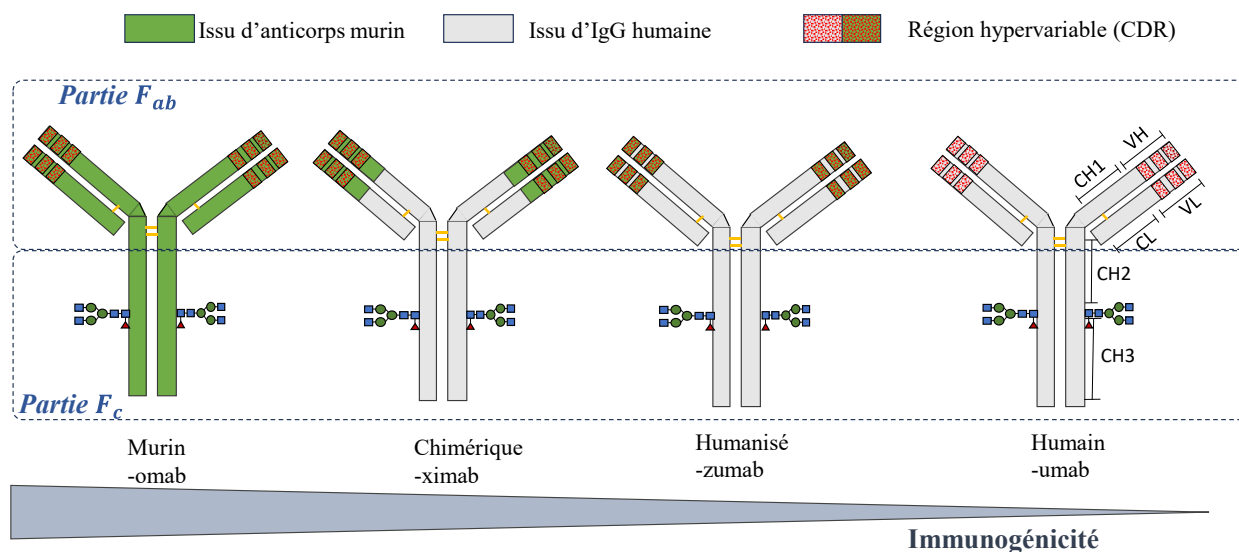


Figure 1.1. Représentation schématique des différents types d'anticorps monoclonaux.

1.1.2. Fonctions effectrices

1.1.2.a. Inhibition de l'antigène

Les zones hypervariables (*Complementary Determining Regions* – CDR), spécifiques à chaque mAb, constituent la zone d'interaction avec l'épitope de l'antigène (zone rouge, Figure 1.1). Cette interaction implique des surfaces de l'ordre de 500 à 600 Å² avec un nombre d'acides aminés directement impliqués dans la liaison variant de six à une vingtaine. Cette liaison spécifique

de l'épitope d'un antigène au paratope du mAb est non covalente et réversible, et implique des interactions multiples (forces de Van der Waals, forces électrostatiques, liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes).

La force de l'interaction antigène/anticorps, mais aussi de toute autre interaction protéine/ligand, se mesure par un paramètre appelé affinité. Elle se définit comme la somme des forces de liaison et de répulsion entre un épitope et un paratope. Généralement, on peut définir l'affinité par la valeur de la constante de dissociation (K_d), qui lui est inversement proportionnelle. Dans le cas d'espèces dites polyvalentes, c'est-à-dire avec plusieurs sites de liaison, tels que les anticorps, on distingue l'affinité intrinsèque de l'avidité. L'affinité intrinsèque se réfère généralement à l'interaction monovalente que va faire un paratope d'un anticorps avec un épitope d'un antigène. Cette affinité s'affranchit des données conformationnelles des autres régions de l'anticorps. L'avidité considère, en plus de la force de cette interaction monovalente, le nombre de paratopes de l'anticorps, ainsi que les réarrangements stériques associés à plusieurs liaisons. C'est donc l'intensité de l'ensemble des forces des interactions non covalentes.

1.1.2.b. Cytotoxicités des mAbs

En plus de la liaison antigène-anticorps, un mAb peut se lier à d'autres récepteurs présents sur des cellules de l'organisme menant à des activités cytotoxiques de lyse de cellules. Ces mécanismes sont également importants dans la fonction biologique du mAb et s'effectuent après liaison de certains récepteurs biologiques dits " $F_c\gamma R$ " vers l'interface CH2-CH3 de l'anticorps. Deux grandes formes de cytotoxicités peuvent être induites par les mAbs : la cytotoxicité dépendante des anticorps (*Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity* – ADCC) et la cytotoxicité dépendante du complément (*Complement Dependent Cytotoxicity* – CDC).

L'ADCC est induite par reconnaissance des récepteurs $F_c\gamma R$ présents à la surface des cellules de l'immunité innée (macrophage ou d'une cellule NK (*Natural Killer*)) par l'interface CH2-CH3 du mAb [3–5]. Après interaction mAb/ $F_c\gamma R$, le macrophage va induire une phagocytose menant à la destruction de la cellule cible, tandis que les cellules NK, elles, induisent l'apoptose de la cellule cible par l'intermédiaire de perforines.

La CDC, elle, met en jeu l'interaction entre la région F_c du mAb et une protéine C1q du complément [6]. Cela active et clive ensuite successivement d'autres complexes jusqu'à la polymérisation de C9, qui va créer des pores dans la cellule cible, menant à sa destruction [7].

1.1.2.c. Mécanisme de recyclage de l'anticorps

Les IgG ont un temps de demi-vie dans l'organisme d'une vingtaine de jours (selon le mAb). Cette longue demi-vie est assurée par leur liaison au récepteur néonatal F_cRn . Le F_cRn empêche la

dégradation lysosomale des IgG plasmatiques en assurant leur extraction dans des cellules endothéliales pour les restituer intactes dans la circulation sanguine. Les compartiments intracellulaires de ces cellules ont un pH légèrement acide (pH ~ 6) ce qui entraîne l'interaction du FcRn avec des résidus histidines du domaine CH2 de l'anticorps [8,9]. Puis, ces mAbs sont recyclés vers la surface cellulaire, où ils se dissocient à pH neutre et sont libérés, prolongeant ainsi leur durée de vie dans la circulation [10,11].

1.1.3. Modifications post-traductionnelles

Au cours de la vie de l'anticorps monoclonal, les acides aminés le composant peuvent subir des réactions chimiques. Il s'agit de Modifications Post-Traductionnelles (PTM) car elles apparaissent après synthèse de la protéine. Ces PTM peuvent modifier la structure ou la fonction du mAb et jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires et biologiques. Il a été répertorié près de 600 PTM dans la base de données Uniprot, pour les protéines, peptides et lipoprotéines. Les plus communes concernant les mAbs sont présentées dans la Table 1.1, avec la différence de masse induite sur l'acide aminé considéré. Toutes ces modifications représentent la micro-hétérogénéité de l'anticorps.

Table 1.1. Liste des principales modifications post-traductionnelles des acides aminés d'un anticorps

<i>PTM</i>	<i>Acide aminé concerné (Symbole)</i>	<i>Différence de masse (Da)</i>
Phosphorylation	Tyr (Y), Ser (S), Thr (T), Arg (R), Cys (C), Asp (D), His (H)	+ 79.966
Acétylation	Cys (C), Ser (S), Lys (K) en N-term	+ 42.011
Méthylation	Thr (T), Ser (S), Glu (E), Asp (D), Leu (L), <i>iso</i> Leu (<i>iso</i> L), Arg (R), Gln (Q), Asn (N), Lys (K), His (H), Cys (C) en N-term	+ 14.017
Glycosylation	Asn (N) (N-glycosylation) Ser (S), Thr (T), Pro (P), Lys (K) (O-glycosylation)	> 800
Hydroxyproline	Pro (P)	+ 15.995
Sulfonation	Tyr (Y)	+ 79.957
Pont disulfure	Cys (C)	- 2.016
Déamidation	Arg (R), Asn (N), Gln (Q)	+ 0.984
Acide pyroglutamique	N-terminal Gln	- 17.027
Nitration	Tyr (Y)	+ 45
Oxydation	Met (M), Trp (W), His (H), Cys (C)	+ 15.995
Isomérisation	Asp (D), Leu (L)	± 0

Il a été démontré que certaines PTM jouent un rôle dans l'activité biologique de protéines, selon leur nature et localisation. Ainsi, il est apparu essentiel de développer des méthodes analytiques d'identification et de suivi de ces modifications. Certains sites de protéines thérapeutiques ont notamment été définis par les autorités américaines ou européennes comme des critères de qualité critique (CQA). Cela consiste en des sites d'acides aminés dits *hotspots*, dont la caractérisation de PTM est nécessaire avant commercialisation, car peut impacter l'efficacité et la sûreté du traitement [12].

▪ Déamidation des asparagines

La déamidation d'asparagine (N → *dea*N) est une réaction pouvant se produire à pH acide ou basique, et dont le mécanisme est décrit Figure 1.2. L'acide aminé passe par un intermédiaire réactionnel, le succinimide, avant d'évoluer en un acide aspartique (L ou D selon l'épimère formé). Généralement, lorsqu'on parle de l'acide aspartique, il n'y a pas de distinction entre les 2 épimères. La déamidation d'asparagine est une modification dite non-enzymatique, souvent signalée comme l'une des causes majeures des hétérogénéités de charge des anticorps [13]. En effet, l'acide aspartique (D) résultant de cette déamidation présente une charge négative à pH 7.4, et augmente la masse de l'acide aminé de 1 Da (Figure 1.2). Les déamidations peuvent se produire à toutes étapes de la vie d'un anticorps ; de sa production dans les cellules, à son stockage. Le pH, la température, la composition du tampon de stockage, sont tous des facteurs impactant cette PTM [14]. Aussi, son analyse est d'autant plus complexe qu'il faut s'affranchir de ces réactions indésirables [12,14].

La caractérisation des *dea*N fait l'objet de nombreuses études, car il a été démontré que certaines déamidations ont lieu *in vivo*, c'est-à-dire après administration [15–17]. Des études ont cherché à évaluer l'impact de ces déamidations, et plus particulièrement de celles localisées en zones CDR des anticorps. Il a été montré une diminution de l'affinité de cette liaison avec l'augmentation du pourcentage de déamidation en zone CDR [18]. Hintersteiner *et al.* (2016) ont démontré que les altérations de la liaison entre un anticorps et son antigène, ou ses différents récepteurs F_c, causées par la déamidation, ne semblent pas être dues à un changement de conformation mais plutôt à un changement de la surface de charge [19]. Néanmoins, ces résultats restent peu nombreux et suggèrent que l'impact biologique de la déamidation est spécifique à l'anticorps en question et à la position de l'asparagine.

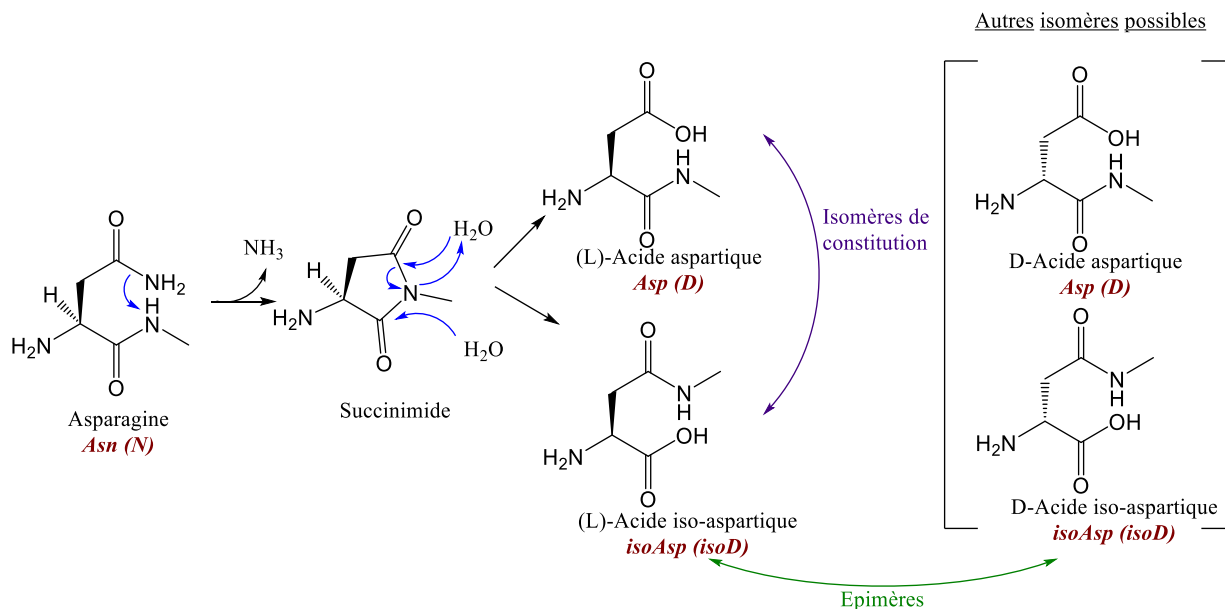


Figure 1.2. Mécanisme de déamidation d'asparagine (Asn, N) en acide aspartique (Asp, D) ou acide iso-aspartique (isoAsp, isoD). La réaction passe par un intermédiaire succinimide.

■ Isomérisation des acides aspartiques

L'isomérisation des acides aspartiques (D \rightarrow isoD) peut se produire après la déamidation d'asparagine (Figure 1.2, mécanisme du bas). Comme présenté par la Figure 1.2, l'acide isoaspartique est un isomère de constitution de l'acide aspartique. Toujours dû au site de chiralité présent sur cet acide aminé, il est possible d'observer des épimères dont la différenciation est plus complexe. Dans le cadre de ce projet de doctorat, l'isomérisation considérée est celle de constitution. Ainsi, les dénominations « D » et « isoD » ne s'appliquent qu'à l'acide aspartique (D) sous toutes ses formes épimériques et à son isomère de constitution, l'acide isoaspartique (isoD).

Comme pour les *dean*, les *isoD* survenant sur la zone CDR d'anticorps monoclonaux ont été identifiées responsables de perte d'affinité à un antigène [20]. Les *isoD* font donc partie des CQA d'anticorps monoclonaux et doivent être caractérisées. Cette PTM n'impacte pas la masse de l'acide aminé, mais peut entraîner une différence conformationnelle par rapport à l'acide aspartique. Ainsi, les stratégies basées sur des différenciations de conformations peuvent distinguer ces deux formes. On retrouve des techniques de séparation comme l'électrophorèse capillaire [21] ou la chromatographie d'interactions hydrophobes [22,23]. La RMN peut également distinguer ces formes [24].

■ Oxydations de méthionines

Les oxydations de méthionine (M \rightarrow *oxiM*) sont des PTM courantes, consistant en l'oxydation de la méthionine en méthionine sulfoxyde. Cette oxydation *oxiM* augmente la taille et la polarité de

la chaîne latérale de l'acide aminé, résultant ainsi en une diminution de l'hydrophobie, mais favorise les liaisons hydrogène [25]. La méthionine sulfoxyde (*oxiM*) présente 16 Da de plus que son analogue non modifié (M).

En ce qui concerne l'activité biologique d'un anticorps soumis à une *oxiM*, certaines études ont montré qu'un grand nombre de méthionines oxydées sur un anticorps peut limiter l'affinité d'interaction entre la région F_c et des récepteurs comme le récepteur F_cRn néonatal [26]. Ainsi il semblerait que la demi-vie dans le sérum d'un anticorps ayant subi de nombreuses oxydations soit plus courte que celle d'un anticorps non modifié [27].

Des études suggèrent en particulier que les oxydations de la M²⁵² (méthionine positionnée au 252^e acide aminé d'un IgG de la chaîne lourde) et de M⁴³³ modifient la conformation de l'interface CH2-CH3, et dégradent les activités cytotoxiques d'anticorps thérapeutiques [28,29]. De plus, cette étude a montré que le degré d'oxydation de M²⁵² est important, car une oxydation de 40 % ne semble pas altérer la demi-vie de l'anticorps. En revanche, une oxydation de 80 % de cet acide aminé réduit la demi-vie d'un facteur 4.

▪ **Glycosylations.**

Les mAbs appartenant à la classe des IgG, ils présentent une N-glycosylation sur une asparagine du domaine CH2 des chaînes lourdes de la région F_c. À cet endroit, on retrouve en effet une séquence asparagine-X-serine/thréonine, où X correspond à n'importe quel acide aminé, à l'exception d'une proline [30].

Lors de la production d'un mAb, ces glycoprotéines apparaissent comme un mélange hétérogène de glycoformes. Elles sont constituées de différentes chaînes d'oligosaccharides formées sur le site d'asparagine. La N-glycosylation des protéines commence dans le réticulum endoplasmique (RE), où l'ajout de monosaccharides a lieu, puis la glycoprotéine migre vers le canal de Golgi où elle subit d'autres modifications des mannoses qui la composent [31,32]. Ce processus est complexe et aboutit à l'incorporation de différents types de glycans [33]. Cette diversité glycanique est néanmoins reproductible et un profil de glycosylation représentant l'abondance de chaque glycan peut être établi pour chaque IgG.

Les N-glycans jouent un rôle important sur l'orientation du domaine CH2 et donc dans l'interaction de la partie F_c avec certains récepteurs présents à la surface des cellules effectrices [34]. Il a été par exemple discuté que les régions F_c aglycosylés, c'est-à-dire sans N-glycan, ne peuvent pas se lier à certains récepteurs nécessaires à l'activité cytotoxique des mAbs [35,36].

Ces interactions sont également impactées par la forme glycanique du site. Par exemple, les fucosylations semblent diminuer certaines interactions avec des récepteurs FcR [37]. Ainsi, lors de la production d'une biomolécule IgG, une préoccupation importante est la bonne reproductibilité des proportions glycaniques la composant. Il s'agit d'un critère CQA. Il est

important de pouvoir contrôler la modification du glycan, mais aussi de vérifier l'homogénéité des profils de glycosylations obtenus après synthèse des mAbs.

1.2. Infliximab, un mAb thérapeutique

1.2.1. Maladie de Crohn

1.2.1.a. Historique de la maladie

La maladie de Crohn est une maladie chronique intestinale, apparaissant sous la forme d'inflammation sévère, tout au long du tube digestif. Elle a été identifiée pour la première fois en 1769 par le médecin italien Giovanni Battista Morgagni qui a diagnostiqué un jeune homme d'une maladie intestinale invalidante. Les observations se multiplient, et en 1932, le Dr. Burrill. B. Crohn publie avec plusieurs de ses confrères un article dans *Journal of the American Medical Association* décrivant les symptômes de la maladie, qui fut plus tard renommée en son nom [38]. Cette maladie pourrait résulter d'une combinaison de susceptibilité génétique, de facteurs environnementaux et d'une altération du microbiote intestinal, conduisant à une dérégulation des réponses immunitaires innées [39].

1.2.1.b. Mécanisme inflammatoire : rôle du TNF- α

Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) est une cytokine produite par diverses cellules du système immunitaire, en particulier les macrophages et les lymphocytes T. Son nom vient de sa capacité à déclencher des nécroses de tumeurs. Il s'agit d'une cytokine pro-inflammatoire, qui alerte le système immunitaire de la présence d'un agent pathogène en enflammant la zone concernée. Sa biologie et ses mécanismes d'actions sont complexes et continuent de faire l'objet de nombreuses publications et études cliniques [40]. À faible concentration, le TNF- α est nécessaire à l'organisme, car il permet l'augmentation des défenses immunitaires face aux infections. Néanmoins, des concentrations localisées excessives au cours de la physiopathologie de certaines maladies telles que la maladie de Crohn, conduisent à une inflammation incontrôlée et dangereuse. Le TNF- α est présent dans l'organisme sous deux formes : sa forme transmembranaire (tmTNF, 26 kDa) précurseur, qui peut être libérée sous forme soluble (sTNF, 17 kDa) [3,6]. Les deux formes peuvent interagir avec des récepteurs exprimés à la surface de toutes les cellules nucléiques ou endothéliales. Cela peut mener à la production de cytokines et chemokines pro-inflammatoires, au recrutement des cellules sur le site d'inflammation, à l'apoptose des cellules ou encore à la formation de granulomes [41–44]. Cette cascade d'interactions cellulaires aboutit à un mécanisme d'action inflammatoire complexe et varié.

1.2.1.c. Prise en charge thérapeutique

En France, le nombre de patients atteints de la maladie de Crohn ne cesse d'augmenter, avec en 2020 : 120 000 cas [45]. Les causes exactes de cette maladie intestinale chronique ne sont pas complètement élucidées. Cependant, des liens ont été établis entre les facteurs génétiques, environnementaux et le microbiote intestinal des patients [39]. La prise en charge thérapeutique est complexe, et peut amener à de la chirurgie si les voies médicamenteuses ont conduit à des échecs. On retrouve par exemple la prescription de corticoïdes, généralement associés à d'autres traitements, mais qui présentent de nombreux effets indésirables comme l'hypertension artérielle. Pour l'instant, les prises en charge thérapeutiques ont pour objectif de limiter les symptômes de cette maladie et améliorer la qualité de vie des patients, mais ne mènent pas à la guérison.

Vers les années 1990, il a été identifié que la maladie de Crohn était liée à une augmentation excessive de la quantité de TNF- α aux sites de l'inflammation. Ainsi, l'élimination de cette cytokine est devenue un objectif thérapeutique [46]. La première étude pilote en 1993, sur des patients atteints d'une autre maladie inflammatoire, la polyarthrite rhumatoïde, a démontré que l'utilisation d'un anticorps anti-TNF- α , l'infliximab, réduisait les symptômes inflammatoires [47]. Puis, en 1998, la *Food and Drug Administration* (FDA) a autorisé l'utilisation d'agents anti-TNF- α pour le traitement de la maladie de Crohn. Ainsi, leur développement s'est accéléré et à ce jour, plusieurs antagonistes au TNF- α sont enregistrés : l'infliximab (IFX), l'adalimumab (ADM), le golimumab et l'éta nercept (qui est une protéine de fusion). Seuls l'IFX et l'ADM sont prescrits pour le traitement de la maladie de Crohn. Une récente étude a démontré que l'affinité entre ces deux traitements avec le TNF- α (soluble et transmembranaire) était identique [48].

La diversité des réponses cliniques des patients traités par anti-TNF- α reste néanmoins encore mal comprise, ce qui complique la prise en charge thérapeutique. Bien que ces traitements soient parmi les plus efficaces, les agents anti-TNF- α ne sont pas sans risques. Selon une étude clinique de 2008 ayant suivi 651 patients traités avec de l'infliximab sur 6 ans, le traitement fut efficace pour 82,7 % d'entre eux. Néanmoins, 14,6 % des patients ont développé un effet indésirable sévère [49].

Il arrive également que des patients présentent une perte de réponse clinique, c'est-à-dire que le traitement arrête d'être efficace de manière immédiate ou après plusieurs mois, et doivent donc changer de traitement [50,51]. Dans certains cas, ces pertes de réponses sont associées au développement d'une immunogénicité de la part des patients. Ceux-ci vont produire des anticorps dirigés contre l'agent anti-TNF- α , l'éliminant de la circulation sanguine. Cependant, il arrive que d'autres patients développent cette immunogénicité, mais présentent tout de même une rémission clinique. Ainsi, ces cas soulignent la diversité des réponses cliniques des maladies auto-immunes.

1.2.2. Traitement par infliximab

1.2.2.a. Commercialisation de l'infliximab

L'infliximab (IFX) a été développé pour la première fois en 1989 par des chercheurs de l'université de médecine de New York. Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique de 144 kDa, composé d'une région constante d'immunoglobuline IgG1 humaine et d'une partie variable issue d'un anticorps murin. Cette partie variable est dirigée contre le facteur de nécrose tumorale TNF- α de manière spécifique [52].

La première forme d'infliximab ayant reçu une autorisation de mise sur le marché en France en 2000 est le Remicade®. Il s'agit du produit biopharmaceutique original, qui s'est vu produire plusieurs biosimilaires depuis (Remsima®, Inflectra®, Flixabi® et Zessly®). Les biosimilaires sont des mAbs similaires au médicament biologique de référence (même séquence d'acide aminé, etc.) mais produits par d'autres entreprises pharmaceutiques. Ainsi, ils peuvent présenter des différences mineures, comme la souche de lignée cellulaire ou les excipients de la formulation, comme présenté dans la Table 1.2. Ce traitement s'administre par voie intraveineuse, et possède une durée de demi-vie de près de 14 jours [41]. Ainsi, les patients traités avec cet anticorps en sont administrés par perfusion à intervalles de 2 à 6 semaines, puis toutes les 8 semaines après stabilisation [53].

Table 1.2. Formes d'infliximab titulaire d'une autorisation de mise sur le marché en France, adapté des travaux de thèse de Legrand. P [54]

<i>Nom commercial</i>	<i>Laboratoire titulaire de l'AMM</i>	<i>Présentation</i>	<i>Excipients</i>	<i>Lignée cellulaire</i>
Remicade®	Janssen	100mg/ lyophilisat	Saccharose, polysorbate 80, phosphate monosodique, phosphate disodique	Sp2/0
Remsima®	Celltrion Healthcare	100mg/ lyophilisat	Saccharose, polysorbate 80, phosphate monosodique monohydrate, phosphate disodique dihydrate	Sp2/0
		100mg/1mL en seringue pré-remplie	Acide acétique, acétate de sodium, trihydraté, sorbitol, polysorbate 80, eau pour préparation injectables	Sp2/0
		100mg/1mL en stylo pré-remplie	Acide acétique, acétate de sodium, trihydraté, sorbitol, polysorbate 80, eau pour préparation injectables	Sp2/0
Inflectra®	Pfizer Europe	100mg/ lyophilisat	Saccharose, polysorbate 80, phosphate monosodique monohydrate, phosphate disodique dihydrate	Sp2/0
Flixabi®	Samsung Bioepis	100mg/ lyophilisat	Saccharose, polysorbate 80, phosphate monosodique monohydrate, phosphate disodique heptahydrate	CHO
Zessly®	Sandoz GmbH	100mg/ lyophilisat	Succinate disodique hexahydraté, Acide succinique Saccharose Polysorbate 80	CHO

1.2.2.b. Mécanisme d'action

Les fonctions effectrices de l'infliximab sont celles communes aux IgG1. Dans un premier temps, le rôle de ce traitement est de cibler le TNF- α , son antigène, dans le corps du patient. En se liant à cette cytokine, sous forme soluble sTNF- α ou transmembranaire tmTNF- α , l'infliximab va ainsi inhiber son activité [55]. En se complexant à l'infliximab, le TNF- α ne sera plus reconnu par les récepteurs de l'organisme et ses mécanismes d'action, tels que la formation de granulomes, le recrutement des cellules lymphocytaires ou l'inflammation, seront interrompus (Figure 1.3, droite). L'affinité de l'infliximab avec le sTNF- α a été évaluée à $2.7 \cdot 10^{-11}$ M, et de $4.7 \cdot 10^{-10}$ M pour le tmTNF- α [48].

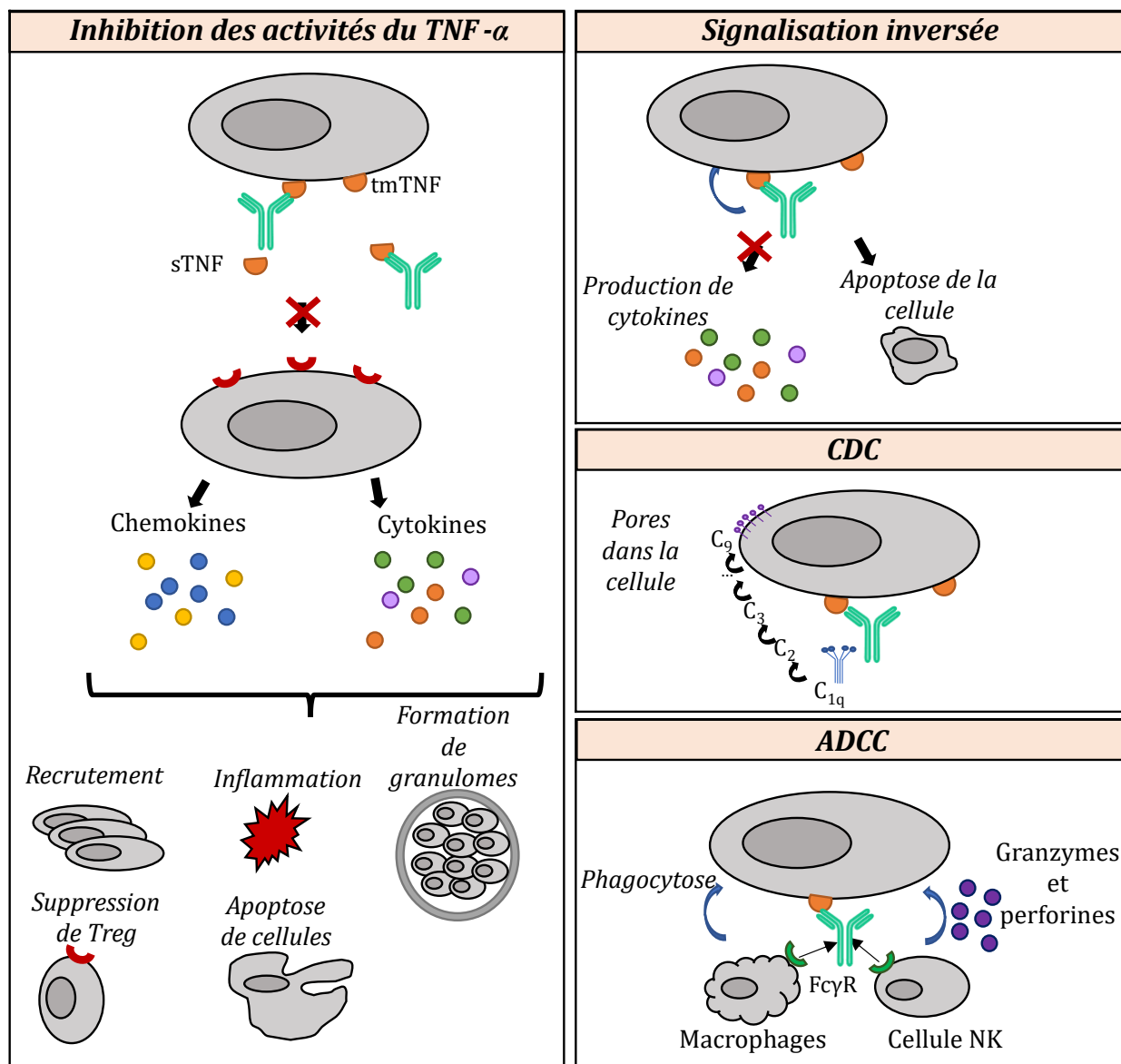


Figure 1.3. Mécanismes d'action de l'infliximab dans le système humain.

L'infliximab peut aussi effectuer ce qui est appelé le mécanisme de signalisation inversée [56]. Pour cela, l'anticorps reconnaît du tmTNF- α sur une cellule *via* sa région F_{ab}. Le tmTNF- α agit comme un ligand et initie le processus de l'apoptose de la cellule et supprime la production de cytokines (Figure 1.3) [57,58]. Les activités cytotoxiques ADCC et CDC sont également induites par l'infliximab dans l'organisme. Cet mAb se lie d'abord au tmTNF- α présent sur la cellule cible par sa région F_{ab} (Figure 1.3), puis à des récepteurs F_c γ R ou au complément C1q pour initier ces processus. L'infliximab possède une demi-vie de 14 jours, et son recyclage est réalisé par liaison avec le récepteur néonatal F_cRn.

1.2.2.c. Immunogénicité

L'immunogénicité traduit la capacité d'une substance à provoquer une réponse immunitaire spécifique. Lors d'un traitement par mAb thérapeutique, il arrive que des patients développent une réaction auto-immune. Leur organisme produit des anticorps anti-médicaments (*Anti-drug-antibody* – ADA), dirigés contre diverses séquences du mAb thérapeutique. Dans le cas particulier de l'infliximab, ces anticorps sont appelés ATI (*Antibody-to-Infliximab*). Il n'existe pas d'ATI universel, puisqu'ils sont propres à chaque individu. Il a été répertorié que ces ATI pouvaient exister sous formes de plusieurs isotypes d'immunoglobulines. Ce sont en majorité des IgG, et plus particulièrement des sous-types IgG1 et IgG4 qui ont été rapportés pour les ATI de l'infliximab [59]. Néanmoins, quelques cas minoritaires de IgM et IgE ont été observés.

Parmi ces ATI développés, les majoritaires (> 90 %) sont des anticorps neutralisants (NATI, *Neutralizing Antibody to Infliximab*). Les NATI sont dirigés contre des segments de la partie variable de l'infliximab, l'empêchant de se lier au TNF- α , et donc neutralisant son activité biologique. Les non-NATI, eux, n'impactent pas l'interaction infliximab/TNF- α , mais peuvent entraîner la formation d'agrégats propices à une élimination précipitée de l'organisme. Il s'agit néanmoins généralement des NATI qui font l'objet de suivis cliniques afin d'évaluer l'immunogénicité des patients traités par infliximab.

La valeur de la fréquence d'apparition des ATI chez les patients traités par infliximab est peu établie, avec un intervalle allant de 3 à 83 % selon les études [60,61]. Cette disparité peut être due aux différentes méthodologies analytiques employées pour leur détection et quantification. Certaines ne maintiennent pas les complexes ATI/infliximab de faibles interactions, ne permettent pas la détection des IgG4, ou sont très peu sensibles. Ces problématiques peuvent donc parfois impacter le suivi clinique des patients et limitent la prise en charge thérapeutique.

CHAPITRE 2.

COUPLAGE CE-MS/MS POUR L'ANALYSE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Préambule

L'électrophorèse capillaire (CE) couplée à la spectrométrie de masse (MS) s'est imposée comme une méthode pertinente pour la caractérisation de biomolécules. La séparation électrophorétique permet d'obtenir des informations complémentaires à celles apportées par la chromatographie liquide, aujourd'hui considérée comme la méthode de référence pour la séparation de biomolécules. La spectrométrie de masse, quant à elle, permet une identification et caractérisation sensible et sélective, apportant des informations quantitatives et structurales d'échantillons complexes. Aussi, le couplage des deux instruments est apparu totalement approprié à ce projet de doctorat, pour la multi-caractérisation d'anticorps issus de matrices biologiques.

Dans un premier temps, ce chapitre vise à présenter les principes fondamentaux de la CE et de la MS. Puis, la dernière partie de ce chapitre présente quelques applications et différentes stratégies du couplage CE-MS/MS pour la caractérisation de la structure primaire d'anticorps monoclonaux.

2.1. Électrophorèse capillaire

2.1.1. **Mode de séparation en électrophorèse capillaire**

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique de séparation d'espèces en solution. Arne Tiselius (1902-1971) a introduit le principe de l'utilisation des phénomènes électrophorétiques pour séparer des analytes. L'utilisation de la CE s'est diversifiée pour la séparation de divers composés ; les acides aminés [62], les peptides [63], les protéines entières [64], les ions inorganiques [65,66], ou encore les acides nucléiques (ADN et ARN) [67]. Il existe plusieurs modes de séparation électrophorétique en CE, qui diffèrent par la nature de l'électromigration que vont subir les analytes. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) est le mode électrophorétique le plus implémenté pour le couplage à la spectrométrie de masse.

2.1.1.a. *Électrophorèse capillaire de zone (CZE)*

L'électrophorèse capillaire de zone consiste à utiliser un capillaire, généralement en silice vierge, rempli d'un électrolyte support (*Background Electrolyte* – BGE). Après injection des analytes à l'entrée du capillaire, l'application d'un potentiel de part et d'autre de celui-ci permet la migration

des espèces présentes, selon une mobilité dépendante de leur charge et rayon hydrodynamique. La migration repose sur deux phénomènes : la mobilité électroosmotique et celle électrophorétique (Figure 2.1).

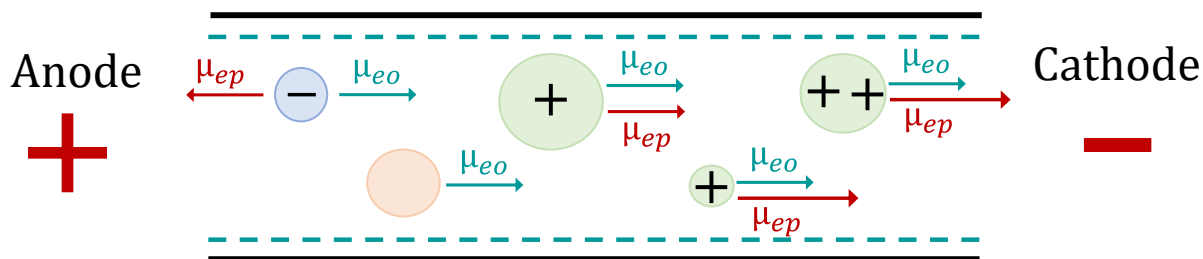


Figure 2.1. Représentation schématique d'une séparation d'analytes en électrophorèse capillaire de zone (CZE).

▪ Phénomène d'électro-osmose

Les parois du capillaire sont recouvertes de groupements silanols qui se déprotonent si le pH est supérieur à 2,5. Cette couche de charge négative va entraîner une accumulation de cations solvatés composant le BGE le long de ces parois, par liaisons électrostatiques aux silanols. Ces cations vont se mettre en mouvement lors de l'application d'un champ électrique vers la cathode, résultant en un écoulement de front plat (Figure 2.1). Ce déplacement correspond au flux électroosmotique (EOF), représenté par les flèches vertes. L'électro-osmose correspond donc à l'écoulement de l'électrolyte support contenu dans le capillaire sous l'influence du champ électrique tangentiel. La vitesse linéaire de ce flux est définie par l'équation (2.1) :

$$v_{eo} = \left(\frac{\varepsilon \xi}{4\pi\eta} \right) E = \mu_{eo} E \quad (2.1)$$

ξ : Potentiel zêta de la double couche (V)

ε : Constante diélectrique de l'électrolyte support BGE ($\text{kg}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^2\cdot\text{s}^2$)

η : Viscosité de l'électrolyte support ($\text{kg}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$),

E : Intensité du champ électrique ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$),

μ_{eo} : Mobilité électro-osmotique ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).

Dans certains cas, les parois internes du capillaire peuvent être greffées pour modifier la polarité des charges présentes à la surface. La nature du greffage va alors modifier la force ou la direction du flux électroosmotique, ou bien le supprimer. En effet, l'EOF circule dans la direction allant vers l'électrode dont la polarité est la même que les charges présentes à la surface des parois.

▪ Phénomène d'électrophorèse

L'électrophorèse, quant à elle, est la contrainte physique appliquée aux espèces chargées en solution qui leur permet de migrer sous l'application d'un champ électrique en direction de l'électrode dont la polarité est opposée. Les cations migrent vers la cathode et les anions vers l'anode, à une vitesse qui est fonction de l'intensité du champ électrique, mais aussi de la charge

et du rayon hydrodynamique de l'analyte. Les analytes vont migrer d'autant plus rapidement que leur charge est élevée et que leur rayon hydrodynamique est faible. La vitesse électrophorétique v_{ep} ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) s'exprime sous la forme

$$v_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} E = \mu_{ep} E. \quad (2.2)$$

E : Intensité du champ électrique ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$)
 μ_{ep} : Mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).
q : Charge globale de l'analyte
 η : viscosité de l'électrolyte support ($\text{kg}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
r : Rayon hydrodynamique (cm).

La migration des composés dans le capillaire dépend donc de ces deux phénomènes, et la mobilité apparente (μ_{app}) d'un analyte peut donc s'écrire sous la forme décrite par

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}. \quad (2.3)$$

2.1.1.b. Isotachophorèse (ITP)

L'isotachophorèse (ITP) est une méthode de séparation proche de la CZE. Elle consiste à injecter les analytes dans le capillaire, entre un électrolyte meneur et un électrolyte terminal positionné après l'échantillon.

Si l'on souhaite séparer des cations, la mobilité électrophorétique des analytes doit être inférieure à celle des cations composant l'électrolyte meneur, mais supérieure à celle des cations composant l'électrolyte terminal (Figure 2.2). La séparation s'effectue sous l'application d'une tension électrique. Les espèces à séparer vont migrer sous l'effet de ce champ, de sorte que les analytes se répartissent en fonction de leur mobilité électrophorétique, tout en étant maintenus entre l'électrolyte meneur et celui terminal. Après quelques instants, un état stationnaire est atteint, dans lequel les analytes sont répartis dans des zones distinctes par ordre de mobilité décroissante. Les zones contenant les analytes vont alors migrer par vitesse constante. Chaque zone possède un champ électrique spécifique [68]. La conséquence directe de cette caractéristique est que le signal correspondant à chaque analyte ne forme pas de pics, mais des plateaux successifs au niveau de la fenêtre de détection.

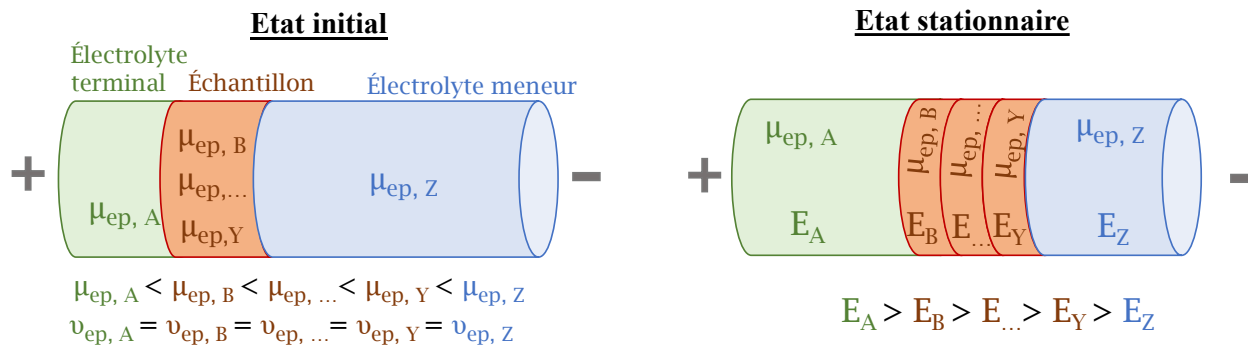


Figure 2.2. Représentation schématique d'une séparation d'analytes en isotachophorèse (ITP).

2.1.1.c. Isotachophorèse en mode transitoire (t-ITP)

L'isotachophorèse en mode transitoire est un intermédiaire entre l'ITP et la CZE. Le principe consiste à remplir initialement le capillaire avec un électrolyte support (BGE). Les analytes se trouvent dans un autre électrolyte, appelé meneur, dont la conductivité est supérieure à celle du BGE. Après injection de ces analytes à l'entrée du capillaire, le BGE est à nouveau injecté, de manière à contenir la zone d'analytes entre deux portions de BGE. Sous l'application d'une tension, les ions contenus dans l'électrolyte meneur vont migrer plus rapidement que ceux du BGE, vers la sortie du capillaire, et vont donc se heurter à la zone de BGE. Cela va mener à leur focalisation dans un volume de capillaire inférieur à celui injecté. Ainsi, cette étape permet une préconcentration des analytes dans le capillaire. Le meneur, dont la mobilité électrophorétique est élevée, est évacué du capillaire durant la première partie de la séparation, qui passe alors dans un état de CZE classique. Ainsi, l'étape de préconcentration par t-ITP permet une plus grande efficacité de pic, et l'injection d'une plus grande quantité d'analytes dans le capillaire. Sans cette étape de préconcentration, le volume d'injection doit se faire à un volume d'environ 0,4 % du volume total du capillaire, pour assurer une bonne séparation des composés. L'étape de t-ITP permet d'injecter près de 50 à 75 fois plus, soit un volume de près de 20 % de celui du capillaire, tout en maintenant les mêmes performances séparatives [69].

L'utilisation d'une t-ITP au lieu d'une CZE classique aboutit à une sensibilité beaucoup plus importante, nécessaire lors de l'analyse de composés biologiques présents en faible quantité dans des matrices complexes. Ainsi, la t-ITP fait l'objet de beaucoup d'attention et a été utilisée par différents groupes pour la séparation de peptides et protéines [70–72]. Néanmoins, le premier inconvénient associé à cette méthode de séparation est la perte de la rapidité de séparation associée à la CZE classique. En effet, l'étape de préconcentration est chronophage, menant à des temps d'analyse entre 30 minutes et une heure, selon les électrolytes meneurs et supports utilisés, la longueur du capillaire, et la tension appliquée à celui-ci. Par ailleurs, le couplage à la MS nécessite l'utilisation d'électrolytes (meneur et BGE) compatibles avec cette détection.

2.1.2. Efficacité de séparation

En ce qui concerne les performances séparatives, la CZE permet des séparations rapides, tout en maintenant des efficacités comparables à celles de la chromatographie liquide. L'équation de Van Deemter permet de modéliser l'efficacité séparative de nombreuses méthodes, dont la CE, et peut s'écrire sous la forme suivante (2.4) :

$$H = A + \frac{B}{v_x} + Cv_x \quad (2.4)$$

H : Hauteur d'un plateau théorique

v_x : Vitesse de la phase mobile (cm·s⁻¹)

La diffusion d'Eddy, représentée par le terme A, correspond à la distribution des trajectoires qu'un analyte suivra dans l'espace de séparation. Le terme B correspond à la diffusion longitudinale et le terme C est la résistance au transfert de masse. Cette résistance reflète la capacité de la phase stationnaire à s'opposer à l'entraînement des molécules d'analytes vers la sortie. C'est à partir de cette équation que l'on peut comprendre la source de la grande efficacité de la séparation électrophorétique. Les termes A et C sont, en électrophorèse capillaire, nuls, car inhérents à la phase stationnaire, qui est absente en CE. Par ailleurs, la diffusion longitudinale (terme B) est limitée grâce au front plan caractéristique de l'écoulement laminaire de l'EOF. Cette diffusion longitudinale est essentiellement due à la chaleur produite par effet Joule, sous l'effet du champ électrique, et peut être limitée par l'utilisation de capillaires de faibles diamètres [73].

2.2. [Spectrométrie de masse](#)

2.2.1. Introduction

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse permettant la détection et l'identification d'espèces ioniques par détermination de leur rapport masse/charge (m/z). Elle s'est avérée particulièrement adaptée à la caractérisation de biomolécules [74]. Un spectromètre de masse est défini comme un dispositif permettant d'obtenir un spectre de masse des ions introduits à l'entrée, et repose sur l'ionisation des molécules, suivie de leur séparation en phase gazeuse. Il est généralement constitué de 4 parties :

- Une source d'ionisation dans laquelle les composés à analyser sont ionisés et transférés en phase gazeuse ;
- Une interface qui dirige ces ions formés vers l'analyseur de masse ;
- L'analyseur de masse qui permet de séparer et différencier les ions en fonction de leur m/z ;
- Le détecteur qui assure la production de signaux électriques qui seront alors interprétés en spectre de masse.

C'est en 1912 que le premier instrument de spectrométrie de masse a été construit par J.J Thomson. Cet instrument, connu sous le nom de spectrographe parabolique, permet de déterminer les rapports m/z d'ions. Un flux de cations issu de tubes à rayons cathodiques est dévié en fonction de la masse des ions sous l'effet de champs magnétiques et électrostatiques [75]. Les spectromètres de masse n'ont cessé d'évoluer depuis, avec, par exemple, l'innovation de l'analyseur par temps de vol (*Time of flight* – TOF) qui permet de séparer des ions en fonction de leur vitesse, et donc de leur masse. Les premiers instruments TOF ont été construits dans les années 1940.

Dans le cadre de ce projet de doctorat, un spectromètre de masse hybride de type TTOF 5600® de Sciex composé d'un analyseur TOF succédant à un quadripôle a été utilisé pour le couplage CE-MS. Cette partie décrit les principales parties de ce spectromètre de masse, explicitant leur mode de fonctionnement.

2.2.2. Interfaces de couplage CE-ESI

La MS est particulièrement adaptée à l'analyse de biomolécules, car elle représente une technique sensible, robuste, et permet l'obtention d'informations structurales. Généralement, l'ionisation de composés d'un échantillon liquide s'effectue par électrospray (ESI). Le couplage CE-MS nécessite le maintien du flux continu d'analytes dans la CE, impliquant la préservation du champ électrique tout au long du capillaire. Contrairement à la CZE classique, couplée à la spectroscopie UV, l'extrémité du capillaire de séparation dans un couplage CE-MS est positionnée dans la source ESI. Il est donc nécessaire de trouver un moyen de maintenir ce champ électrique jusqu'à l'extrémité de sortie du capillaire.

La complexité de mise en œuvre du couplage CE-ESI-MS représente l'une des principales raisons de l'utilisation préférentielle de la LC-MS en tant que méthode de référence pour l'analyse de composés. Différentes interfaces ont été développées afin de permettre un couplage direct entre la CE et les instruments ESI-MS. Les premiers couplages CE-ESI-MS présentaient une sensibilité bien moindre que celle obtenue en LC-MS [76]. Ces interfaces sont nommées *sheath-liquid* (Figure 2.3.a) ou *liquid-junction* (Figures 2.3.b et 2.3.c). Dans l'interface *sheath-liquid*, le contact électrique est maintenu à la jonction du liquide additionnel (connecté à l'électrode de sortie de la CE) et du BGE en sortie du capillaire de séparation (Figure 2.3.a). Cette interface permet d'améliorer la tolérance de l'analyse MS avec certains BGE, en les diluant, et reste la plus couramment mise en œuvre [77,78]. En ce qui concerne les interfaces *liquid-junction*, leur principe consiste aussi à utiliser un liquide additionnel conducteur pour assurer le contact électrique avec le BGE du capillaire de séparation [79]. Différentes conceptions ont été développées comme celle en forme de T (Figure 2.3.b) ou celle par pression (Figure 2.3.c) qui limitent les effets de dilution

induits par l'interface *sheath-liquid*, sans pour autant les éliminer. Les designs de *liquid-junction* créent des volumes morts dans le système qui perturbent le front plat de l'EOF et entraînent un élargissement des pics.

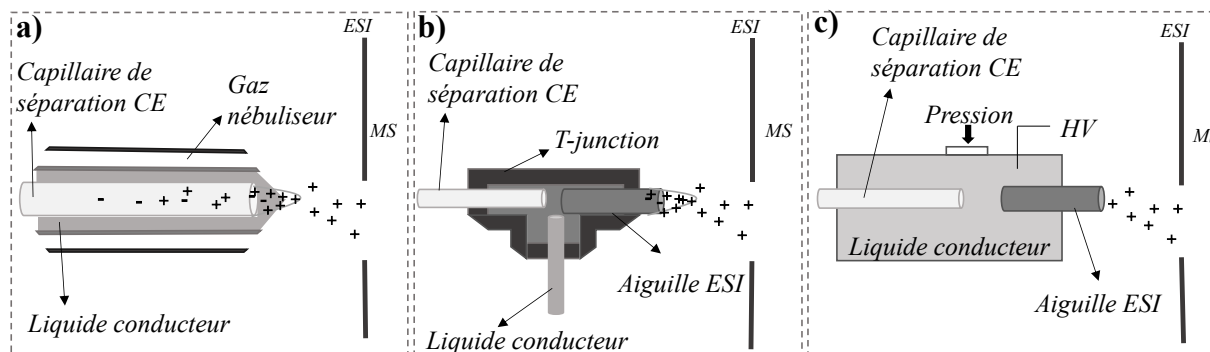


Figure 2.3. Premières interfaces développées pour le couplage CE-ESI-MS. **a.** interface de type *sheath-liquid*. **b.** interface de type *liquid-junction* par une jonction en T. **c.** interface de type *liquid-junction* par pression.

Ainsi, pour répondre aux besoins de sensibilité, les interfaces *sheathless* ont été développées, ne nécessitant pas l'utilisation d'un liquide additionnel [80,81]. Seul le BGE est ionisé dans la source, ce qui implique la nécessité d'utiliser des BGE suffisamment volatils et compatibles avec l'ionisation par ESI. Il existe différents designs de ces interfaces dites *sheathless* tels que l'utilisation d'un capillaire revêtu d'un matériau conducteur sur sa paroi externe, d'une connectique intra-capillaire conductrice ou d'un capillaire poreux [82,83].

Dans le cadre de ce doctorat, il s'agit de l'interface *sheathless* avec extrémité du capillaire poreux qui a été utilisée, dont la représentation schématique est présentée en Figure 2.4. Cette interface met en jeu deux capillaires distincts [84]. Le premier capillaire est celui de séparation, où les analytes vont migrer sous l'effet du champ électrique appliqué. Au niveau de la source ESI, est disposée l'extrémité de ce capillaire, dont les parois ont été rendues poreuses à la suite d'une attaque par acide fluorhydrique. Cette attaque permet l'élimination de la gaine en polyimide et rend la silice poreuse, qui est alors disposée dans une canule remplie du BGE, tout en maintenant son extrémité dirigée dans l'ESI. Pour fermer le circuit électrique, un deuxième capillaire, appelé de contact, est disposé pour que sa sortie se trouve dans la canule, afin de l'alimenter continuellement en BGE. Ainsi, les électrons et les petits ions présents dans le capillaire de séparation pourront migrer à travers les pores, fermant ainsi le circuit électrique de la CE [82]. La taille des pores obtenus après attaque du capillaire est suffisamment faible pour permettre aux petits ions de passer, mais pas aux analytes [85]. Ainsi, l'interface CE-ESI est communément appelée CESI (Figure 2.4).

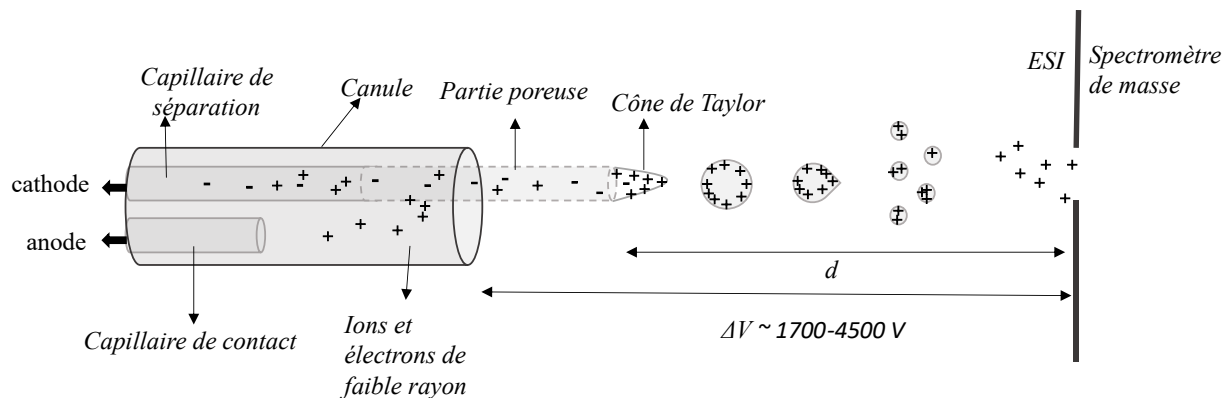


Figure 2.4. Représentation schématique de l'interface CESI.

Le couplage CESI est d'autant plus intéressant qu'il implique des nano-débits induits durant la séparation en CE par le flux EOF. Ainsi, les sources ESI adaptées à ces débits sont celles nano-ESI, dont le développement a été entrepris par Mann et Wilm [86]. La miniaturisation des sources ESI a permis de limiter les phénomènes de compétition d'ions, en diminuant la quantité de solvant introduite dans la source. Ce phénomène, également appelé suppression d'ions, est courant en ESI et consiste en une diminution du rendement d'ionisation des analytes au profit du solvant, limitant la sensibilité de l'analyse [87]. Tandis que l'ESI conventionnelle génère des gouttelettes de 1 à 2 μm de diamètre, la nano-ESI en forme de moins de 200 nm. Elle permet donc une meilleure tolérance à la contamination par des sels ou à l'utilisation de solvants aqueux [88]. Les ions produits en ESI sont ensuite guidés vers le spectromètre de masse par des cônes appelés « *skimmers* », auxquels sont appliqués des potentiels électriques, et qui séparent la source ESI du vide poussé.

2.2.3. Source d'ionisation électrospray ESI

La quête d'appareils permettant la caractérisation du rapport m/z de macromolécules a conduit au développement d'une technique majeure d'ionisation de composés en phase liquide : la source électrospray (ESI), dans les années 1960 [89]. L'ESI consiste à produire de fines gouttelettes à pression atmosphérique à partir d'un échantillon liquide. Ces gouttelettes sont chargées par l'application d'une différence de potentiel élevée ($\Delta V \sim 1500-4500 \text{ V}$) entre l'extrémité de l'émetteur et un orifice délimitant l'entrée dans la MS. Cette tension fournit un gradient électrique suffisamment élevé pour charger la surface du liquide. Dans le cas d'un couplage CE-MS en mode *sheathless*, l'émetteur correspond à l'extrémité du capillaire de séparation (Figure 2.4). À la sortie de l'émetteur, les ions de polarité opposée au champ électrique vont migrer vers l'intérieur de l'émetteur, et ceux de même polarité vont se diriger vers la contre-électrode, c'est-à-dire l'orifice de la MS. Les ions accumulés à la surface du liquide sortant de l'émetteur vont alors former

un cône de Taylor. Lorsque la charge de la solution de ce cône atteint la limite de Rayleigh, il se disperse sous forme de gouttelettes. En se dirigeant vers la contre-électrode placée à l'entrée de la MS, le solvant qui les maintient va se vaporiser sous l'effet d'un flux d'azote chauffé. Ainsi, les charges à la surface des gouttelettes vont se rapprocher et devenir instables jusqu'à ce que la limite de Rayleigh soit à nouveau atteinte. Les gouttelettes subissent alors un processus appelé fission de Coulomb, conduisant à des ions désolvatés en phase gazeuse (Figure 2.4).

La source ESI peut produire des ions positifs ou négatifs, avec, en mode positif, des ions issus de la protonation des sites basiques. Les espèces formées peuvent alors être multichargées. Pour une molécule donnée, le spectre ESI-MS est donc composé de plusieurs pics, correspondant à différents états de charge. L'ESI est très utilisée pour l'analyse de biomolécules complexes, puisqu'elle permet l'obtention d'ions intacts. Il s'agit d'une source dite « douce », formant en majorité des ions moléculaires, et est applicable pour des molécules polaires [90]. La source ESI est un outil sensible, robuste et fiable permettant d'étudier, à des quantités femto-molaires, des biomolécules non volatiles et thermolabiles qui ne peuvent pas être analysées par d'autres techniques conventionnelles. Couplée à une technique de séparation en phase liquide telle que la LC ou la CE, la source ESI peut être utilisée pour l'ionisation de petites molécules comme de macromolécules.

2.2.4. Spectromètre de masse de type Q-TOF

En sortie de la source ESI, les ions sont transmis par plusieurs quadripôles, ayant des fonctions différentes. Dans le cas du TripleTOF® 5600 utilisé dans le cadre de ce projet de doctorat, trois quadripôles se succèdent, comme représenté sur la Figure 2.5.

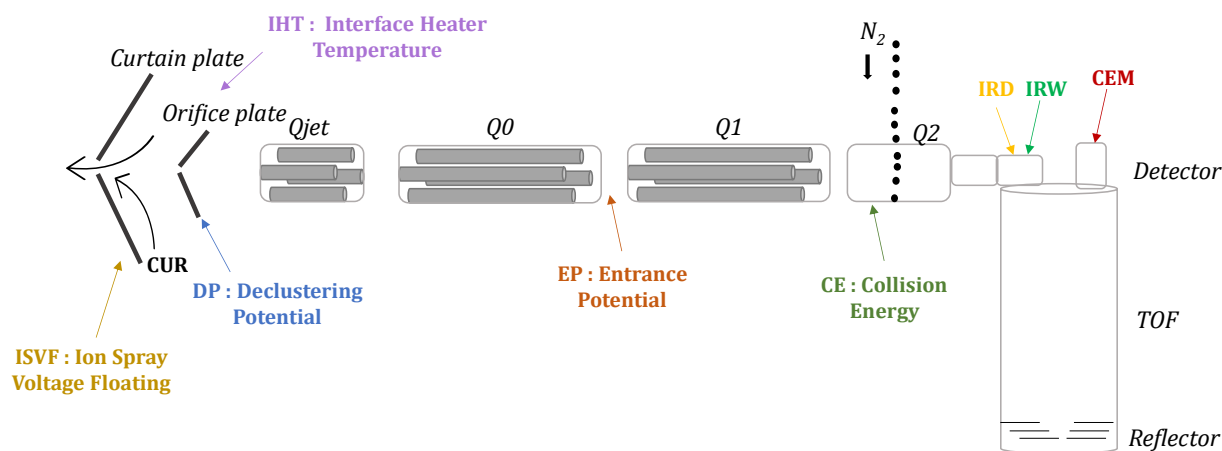


Figure 2.5. Représentation schématique du TTOF 5600.

2.2.4.a. Sélectionneurs quadripolaires

Les deux premiers quadripôles, après la *curtain plate* et l'*orifice plate*, sont le Qjet® et le Q0, servant à focaliser les ions entrants avant leur arrivée dans le Q1 (Figure 2.5). Ce Q1 va alors permettre de filtrer les ions en fonction de leur m/z . Le principe de fonctionnement est basé sur la sélectivité des ions en fonction de leur trajectoire dans le champ électrique oscillant.

Le quadripôle est constitué de quatre électrodes disposées parallèlement. Elles ont une section circulaire ou hyperbolique et sont positionnées de manière à laisser un espace pour la circulation des ions au centre (Figure 2.6.a). Un potentiel est appliqué entre ces électrodes, afin que celles opposées soient de même polarité. Sur chacune des électrodes, deux potentiels sont appliqués : un continu U (DC) et un de radiofréquence $V\cos(\omega t)$ (RF) [91]. La somme algébrique de ces deux potentiels est alors obtenue pour chaque électrode et un champ électrostatique est créé entre elles. En pénétrant dans ce champ, les ions auront une trajectoire particulière en fonction de leur masse et de leur charge. Cette trajectoire est décrite par les équations de Mathieu, dont la résolution met en évidence les potentiels U et V pour lesquels un ion de m/z va circuler au travers des électrodes. Pour qu'un ion soit détecté, il faut que sa trajectoire soit contenue entre les quatre électrodes sur toute leur longueur, afin qu'il puisse être transféré au détecteur. Une amplitude d'oscillation trop importante entraînerait sa collision avec une électrode, et donc sa perte. L'ensemble des solutions des équations de Mathieu peut être modélisé par un diagramme de stabilité, spécifique à chaque ion (Figure 2.6.b). Ce diagramme représente la tension DC en fonction de celle RF, qui sont deux paramètres directement proportionnels aux potentiels U et V pour un ion de m/z donné. Sous la ligne continue bleue, on trouve le domaine dans lequel cet ion sera contenu dans le quadripôle et dirigé correctement vers le détecteur. Le quadripôle peut être utilisé en mode sélection, ou en mode balayage.

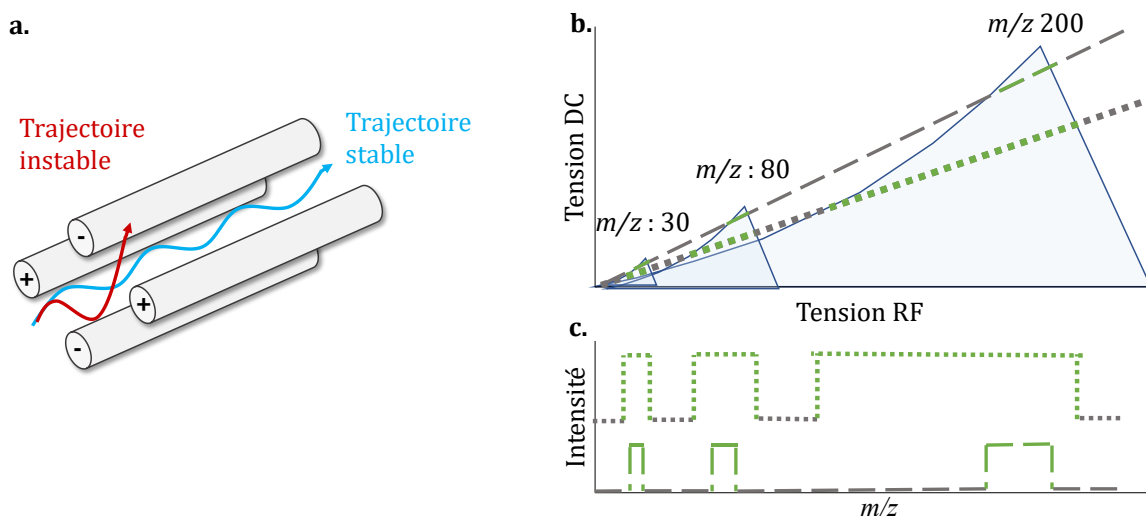


Figure 2.6. Principe de fonctionnement d'un quadripôle. **a.** Disposition et potentiel des électrodes. **b.** Zones de stabilités pour des ions de m/z différents. Mode scan : balayage de RF pour avoir DC/RF constant. **c.** Résolution et précisions de masse obtenues.

- **Mode balayage**

En mode balayage MS, le principe consiste à effectuer un balayage de U tout en gardant U/V constant. Ainsi, le quadripôle va faire passer de manière séquentielle chaque m/z vers le détecteur. On obtient une droite représentée Figure 2.6.b. Plus la pente de cette droite est faible, plus il y aura d'ions qui passeront, mais la résolution de ces ions sera d'autant plus faible. La figure 2.6.c schématise le courant d'ions mesuré par le détecteur en sortie du quadripôle pour trois ions de masse différente, selon 2 pentes de droite de stabilité. Avec une pente plus faible, les pics s'élargissent, diminuant la résolution et le centre de la position de masse diminue à une masse apparente plus faible, diminuant la précision de masse [92]. Il peut être difficile de trouver une droite suffisamment bien ajustée pour passer par toute une gamme de masse tout en restant au sommet des domaines de stabilités, afin d'optimiser la résolution et la précision de masse. Généralement, un quadripôle a une gamme de m/z allant de 15 à 2000 et une résolution estimée entre 1000 et 6000.

- **Mode sélection**

Il est également possible de configurer le quadripôle pour permettre uniquement aux ions d'un seul ratio m/z de passer à travers. Par exemple, ce mode est généralement utilisé lors d'une analyse en tandem MS/MS afin de sélectionner un ion pour le faire passer seul dans la cellule de collision et obtenir son spectre de fragmentation.

2.2.4.b. Cellule de collision

La cellule de collision se trouve au Q2, à la sortie du Q1 (Figure 2.5). Les ions ayant réussi à traverser le quadripôle Q1 peuvent, dans le cas d'une analyse en tandem (MS/MS), être fragmentés dans cette cellule. Pour le TTOF 5600®, la fragmentation s'effectue par dissociation induite par collision (*collision induced dissociation*, CID). Les ions précurseurs traversent la cellule et rencontrent un flux orthogonal de gaz inerte (ici de l'azote). Le flux d'ions précurseurs possède une certaine énergie cinétique induite à l'entrée de la cellule. Ces ions vont entrer en collision avec les molécules de gaz entraînant une rupture de certaines liaisons covalentes.

Dans le cas d'une fragmentation peptidique, l'énergie cinétique va se transformer en énergie interne au sein du peptide (vibrations et rotations). Or, ce peptide possède au moins un proton issu de l'ionisation ESI, qui, d'après Paizs *et al.* (2005), est mobile au sein des acides aminés le composant [93]. Lors de la fragmentation, ce proton va se placer sur l'azote de l'amide de la chaîne peptidique, entraînant la formation d'un dérivé d'oxalozone protoné suite à l'attaque nucléophile de l'oxygène du voisin N-terminal (Figure 2.7). L'énergie de collision peut être adaptée par variation d'énergie cinétique du gaz inerte. Avec ce mode de fragmentation, les ions formés sont appelés des ions *y* et *b*.

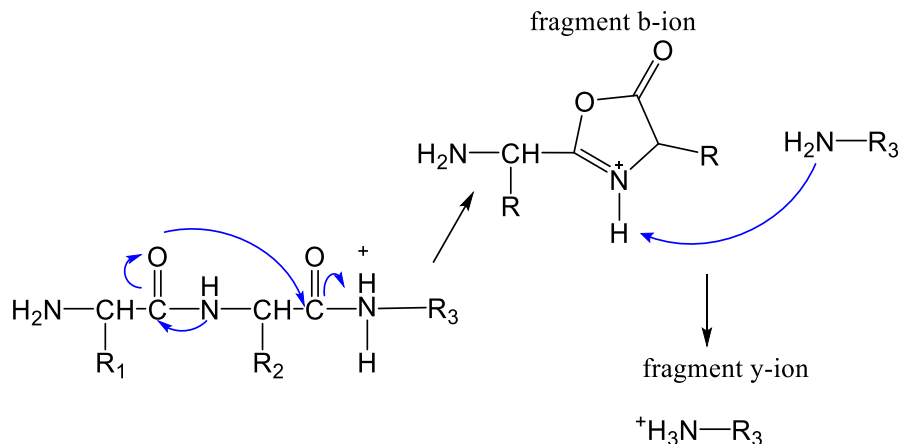


Figure 2.7. Mécanisme de dissociation des peptides par CID. Adapté de Paizs et al. (2005) [93].

2.2.4.c. Analyseur à temps de vol (TOF)

Après la cellule de collision Q2, des lentilles optiques focalisent les ions (précurseurs dans le cas d'une analyse MS et fragments pour la MS/MS) vers un collimateur, en amont de l'analyseur TOF. Son principe consiste cette fois non plus à sélectionner, mais à déterminer les rapports m/z des ions entrants. Le TOF va analyser plusieurs ions de masses différentes en même temps. Dans le collimateur, les ions sont accélérés grâce à l'application d'un champ électrique (Figure 2.8). Quand la particule chargée est accélérée dans cette zone, son énergie potentielle est transformée en énergie cinétique. Étant donné que le champ électrique est le même pour tous les ions présents dans ce collimateur, leur énergie cinétique sera différente, à cause de leur masse :

$$E_c = 0.5 m v^2 = z E \quad (2.5)$$

En sortie du collimateur, les ions entrent dans le tube de vol, où aucune perturbation électrique ou magnétique n'est induite. Ce tube est soumis à un vide très poussé (de l'ordre de 10^{-7} mbar) pour permettre un vol libre des ions. Ainsi, la vitesse, dépendant du m/z , sera différente pour chaque ion qui arrivera au détecteur à des temps définis par

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2 z E}} \quad (2.6)$$

m/z : Charge de l'ion sur sa masse (Th)

E : Différence de potentiel imposée au niveau du collimateur (V)

L : Longueur du tube de vol (m)

t : Temps de vol (s)

L'objectif de cet analyseur de masse est donc de déduire, par la mesure du temps de vol dans ce tube, la valeur des m/z des ions qui le traversent. Les ions ayant un faible m/z arriveront les premiers au détecteur. La résolution d'un analyseur TOF peut être affectée par plusieurs incertitudes [94]. La première correspond à celle sur la mesure des temps de départ et d'arrivée de l'ion. Cette incertitude est liée aux performances de la source pulsée et du détecteur. De plus, une dispersion

des temps de vol pour plusieurs ions de même m/z , peut être observée et résulte à la fois de la dispersion en énergie ΔE du collimateur, et de la position initiale des ions dans celui-ci, avant accélération.

Pour limiter cette dispersion et ainsi refocaliser les ions de même m/z , il est possible d'utiliser le mode réflectron, que possède le TTOF 5600® (Figure 2.8). Il se distingue du mode linéaire où les ions traversent directement le tube jusqu'au détecteur, par l'utilisation d'un réflecteur électrostatique. Celui-ci est composé d'une série d'électrodes annulaires qui créent un champ électrique dans un espace limité du vol. Pour deux ions de m/z identiques, mais d'énergies cinétiques légèrement différentes, l'ion ayant celle supérieure fera un chemin un peu plus long que l'autre dans le réflectron. Ainsi, le retard de l'ion d'énergie cinétique plus faible sera rattrapé avant le détecteur. Il s'agit d'un analyseur très résolutif (5000-75000) et ayant une bonne précision de mesure de masse (< 2 ppm). De plus, le TOF permet l'analyse sur une très large gamme de m/z (jusqu'à 25 000 Th). Cela explique l'intérêt de cet analyseur pour les larges biomolécules.

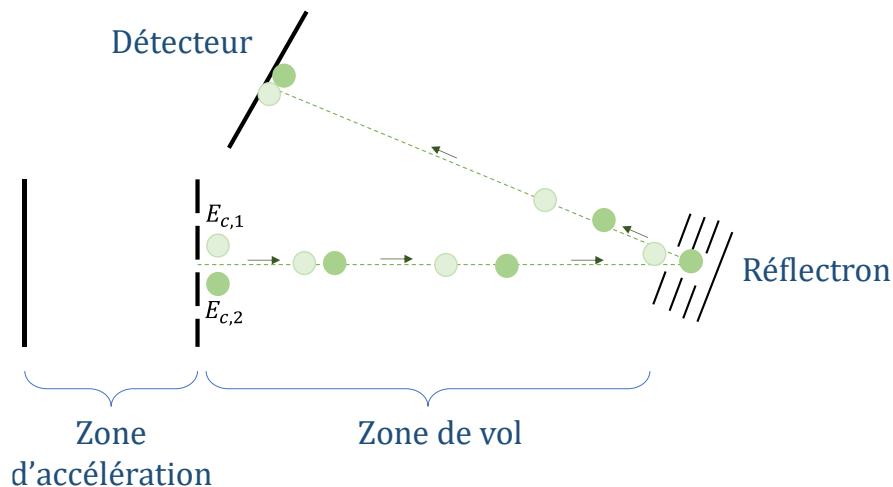


Figure 2.8. Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol avec réflectron, avec $E_{c1} < E_{c2}$, adapté des travaux de thèse de E. Wagner [95].

2.2.5. Détecteur

Le détecteur permet de convertir la mesure de m/z de l'analyseur en un signal électrique, utilisé pour obtenir un spectre de masse. Il existe deux catégories de détecteurs : le collecteur de Faraday et le multiplicateur d'électrons. Le premier étant moins sensible, il est très peu utilisé en MS. Les détecteurs multiplicateurs d'électrons sont généralement utilisés, tels que dans le TTOF5600®. Ce détecteur est constitué d'un grand nombre de micro-canaux en silice parallèles et indépendants. Une différence de potentiel est appliquée aux extrémités des canaux. Lorsqu'un ion de l'analyseur entre en contact avec la paroi d'un micro-canal, il provoque l'émission d'un autre ion. Cet ion va lui aussi provoquer l'émission d'autres électrons. Ces électrons secondaires vont ainsi de suite se multiplier, et le courant ainsi généré est mesuré. Ce détecteur permet un gain d'environ 10^4 grâce à son importante surface de canaux.

2.3. Couplage CE-MS pour la caractérisation des mAbs

2.3.1. Introduction

Le couplage MS avec la chromatographie liquide (LC-MS) est largement utilisé en raison de sa facilité de mise en œuvre et de sa robustesse. Les récents développements techniques concernant la séparation par électrophorèse capillaire (CE) et spectrométrie de masse (MS) ont également mis en évidence la CE-MS comme technique analytique puissante pour la caractérisation des biomolécules [96].

Cette partie a fait l'objet d'un chapitre de livre publié dans l'ouvrage scientifique intitulé *Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry for Proteomics and Metabolomics* (Editions Wiley, 2022), faisant un état de l'art des méthodes CE-MS utilisées pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux. Trois approches majeures peuvent être utilisées pour la caractérisation de mAbs par spectrométrie de masse. Elles sont définies par le niveau structurel de ces biomolécules lors de leur analyse. La stratégie *bottom-up* consiste en l'étude au niveau peptidique de la protéine, suite à sa digestion. L'approche *middle-up* correspond au niveau des sous-unités du mAb. Enfin, l'analyse des mAbs sous forme intacte peut être également implémentée.

Pour des raisons de clarté, seule la partie du chapitre faisant état des applications de la stratégie *bottom-up* est présentée dans ce manuscrit.

2.3.2. Caractérisation de la structure primaire des anticorps par CE-MS/MS

Publication: CE-MS methods for the characterization of monoclonal antibodies

Tessa Reinert¹, Alain Beck², Pascal Houzé³, Rabah Gahoual³, Yannis Francois¹

Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Proteomics and Metabolomics (eds. Ramautar, R. & Chen, D. D. Y.) Wiley

2022, 281–312

[10.1002/9783527833092.ch11](https://doi.org/10.1002/9783527833092.ch11)

2.3.2.a. Introduction

Among biotherapeutic products, monoclonal antibodies (mAbs) are experiencing a remarkable success in different therapeutic fields like oncology and immunological disorders. Their development is still progressing and a significant number of mAbs are currently in clinical trial, including several for the treatment of the SARS-CoV-2 [97,98]. The suitability of mAbs used as therapeutic treatments is explained by their intrinsic characteristics, namely their complete specificity for the epitope of the targeted antigen in addition to their favorable pharmacological properties. This class of biotherapeutic agents includes different formats such as mAbs, bispecific antibodies, antibody-drug conjugates (ADC), glycoengineered antibodies and antibody fragments (fusion proteins) [99].

MABs are derived from immunoglobulin G (IgG). Thereby, they represent highly complex glycoproteins composed of two heavy chains (HC) and two light chains (LC) identical respectively, linked by the intermediate of several disulfide bonds. These tetrameric molecules exhibit a molecular mass generally around 150 kDa [100]. The structure of the protein can be divided into two distinctive regions: the variable domain (F_{ab}) which is responsible for the interaction with the antigen, and the constant domain (F_c) common to every IgG, that mediates the effector functions of the mAbs [101]. A majority of the therapeutic mAbs express a similar N-glycosylation located in the HC F_c domain (Figure 2.9). However, various mAbs are exhibiting additional N-glycosylation and O-glycosylation along their peptide backbone [102,103].

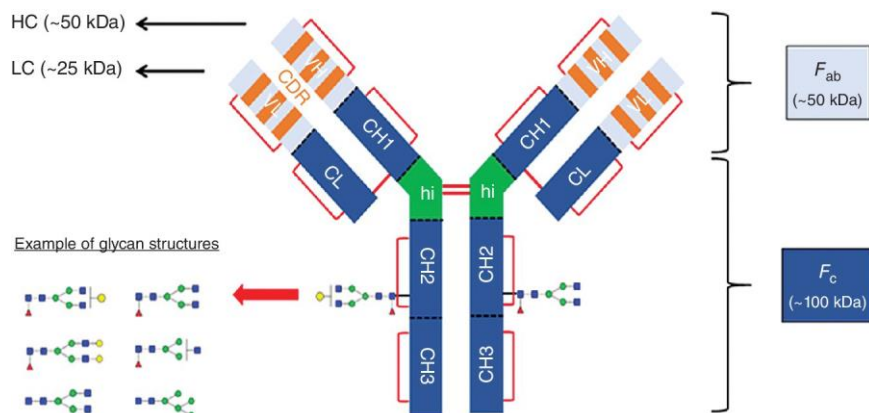


Figure 2.9. Schematic representation of the structure of a monoclonal antibody.

In addition to their extensive structure, mAbs can be submitted to a variety of micro-heterogeneities, resulting from enzymatic and chemical modifications, commonly referred to as post-translational modifications (PTMs) [104]. Due to their structural complexity and their usage as therapeutic agents, intensive research has been conducted in order to furnish analytical methodologies capable of providing a comprehensive characterization of the different facets defining the structure of mAbs [105,106]. In this context, mass spectrometry (MS) has gradually become an essential technique for the characterization of mAbs especially due to its outstanding selectivity and the possibility to obtain structural information for biomolecules [74]. Conventionally, MS instrumentation is hyphenated to liquid chromatography (LC-MS) due to its easy implementation and good robustness. However, recent technical developments regarding capillary electrophoresis (CE) hyphenation with mass spectrometry (CE-MS) have allowed CE-MS to be highlighted as a powerful analytical technique for the characterization of biomolecules [96]. Indeed, the electrophoretic migration generated in CE is particularly relevant for the separation of biomolecules like peptides, proteins, and even nucleic acids due to their chemical nature. Also, electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) is often used for the characterization of biomolecules [107]. Therefore, the low flowrate of background electrolyte (BGE) generated by the electroosmotic flow is particularly favorable to the production of a nanoESI which allows to maximize ionization efficiency [108]. As a direct consequence, a significant number of research articles describe the use of CE-MS method for the characterization of mAbs and it is recognized in the biopharmaceutical industry as a relevant technique for the analysis of this type of therapeutic protein [109,110].

The primary objective of the following chapter is to detail the implementation of CE-MS for the structural characterization of mAbs. The different analytical workflows used for the characterization of the protein are described in a compelling manner. Indeed, mAbs cannot be completely characterized using a single method because of their structural complexity. Therefore, it is necessary to apply complementary analytical methods in order to obtain information regarding

the different levels constituting the structure of the protein. Because of the absence of a stationary phase and the application of an electrophoretic migration, CE can be used for the separation of peptides as well as intact mAbs, which enables CE-MS for the analysis of mAbs at different levels of structure. [...] For each analytical strategy, rather than remaining limited to the CE-MS conditions, a particular emphasis is provided to the requirements regarding sample preparation and data treatment.

2.3.2.b. MAbs characterization approaches

Due to their nature, mAbs are complex macromolecules composed of a few hundred amino acids spatially structured in a precise manner. The mAbs structure is conventionally characterized by the intermediate of three distinctive strategies (Figure 2.10):

- The bottom-up approach considers the characterization of the mAbs at the peptide level ;
- The middle-up and middle-down analyses concern the subunits (F_{ab}, F_c, HC and LC) of the mAbs usually independently ;
- The intact protein, or top-down approach, consists of the analysis of the complete mAbs.

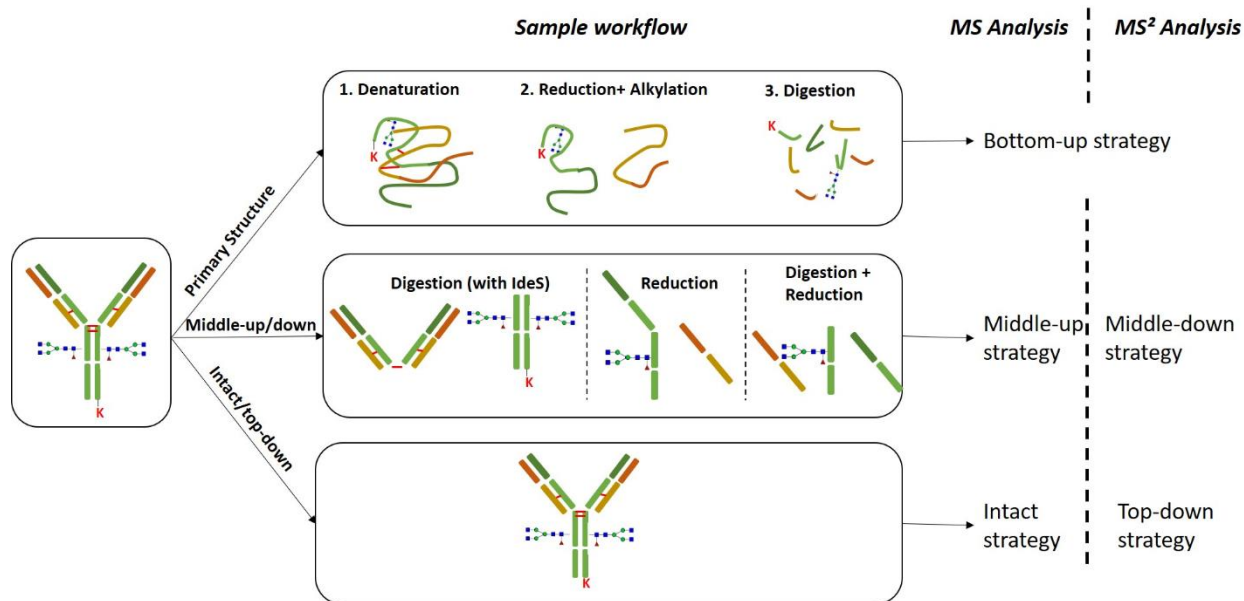


Figure 2.10. Representation of the principal analytical approach used for the characterization of mAbs. Adapted from Dadouch et al. (2021) [111].

Depending on the implemented approach, mAbs sample preparation differs drastically. Also, the CE-MS analysis conditions are partially different. This is explained because of the types of analytes (peptides, intact proteins) that are separated and characterized for each characterization approach.

The methodology referred to as the “bottom-up” strategy is directly derived from bottom-up proteomic analysis [112]. This analytical strategy consists of the proteolytic digestion of the

mAb into peptides. The peptide mixture generated is consequently separated by CZE (Capillary Zone Electrophoresis) and then ionized, most of the time with an electrospray ionization (ESI) source, before MS analysis [90]. CZE is the capillary electrophoresis technique most spread for mAb analysis when mass spectrometry is employed. Scriba *et al.* (2009) demonstrated that peptides can be efficiently separated in CZE separation mode [113]. The peptides composing the sample are then identified using MS data in order to characterize the amino acid sequencing of the protein. Note that it is possible to use tandem MS (MS/MS) for the identification of the peptides (CE-MS/MS analysis). In this case, the peptide identification is based concomitantly on the m/z ratio measured for the proteolytic peptide and on the fragments obtained from collision-induced dissociation (CID). Results obtained are compared to the theoretical value generated *in silico* from the sequence of the mAbs. This methodology, referred to as peptide fragment fingerprint (PFF) enables unambiguous identification and precise amino acid sequencing [114].

Therefore, this characterization workflow can provide an important quantity of information regarding the primary structure of the mAbs, starting with **amino acid sequence characterization**. Figure 2.11 highlights this strategy with the analysis of infliximab using CZE-MS/MS. The electropherogram obtained (Figure 2.11.a) shows the separation of several peptides, such as “DILLTQSPAILSVPGER” at the migration time of 31.5 minutes. It is possible to extract the ion corresponding to this peptide charged two times resulting in an EIC (Extracted Ion Chromatogram) (Figure 2.11.b) and the MS spectra corresponding to the spectrometer acquisition at the exact migration time (Figure 2.11.c). Finally, the MS/MS spectra are also acquired (Figure 2.11.d) and present the m/z of the ion's fragments obtained. These fragments allow for the recovery of the amino acid sequence of the peptide analyzed.

The bottom-up analysis can also be implemented for the **characterization of PTMs**. PTMs are chemical modifications that can appear on the side chain of amino acids residues [115]. Similarly to the amino acid sequence characterization, mAbs are submitted to proteolytic digestion, and the peptide mixture obtained is then analyzed by CZE-MS/MS. The occurrence of PTMs can be identified from the mass shift between the intact peptide and its modified counterpart. In the case of MS/MS analysis, the peptide backbone fragmentation generated from CID allows to attribute in a precise manner the residue concern by the PTM [116]. In addition, the level of modification can be evaluated independently for the different modified residue by measuring the ratio of MS signal intensities between the modified peptide and the unmodified equivalent [117].

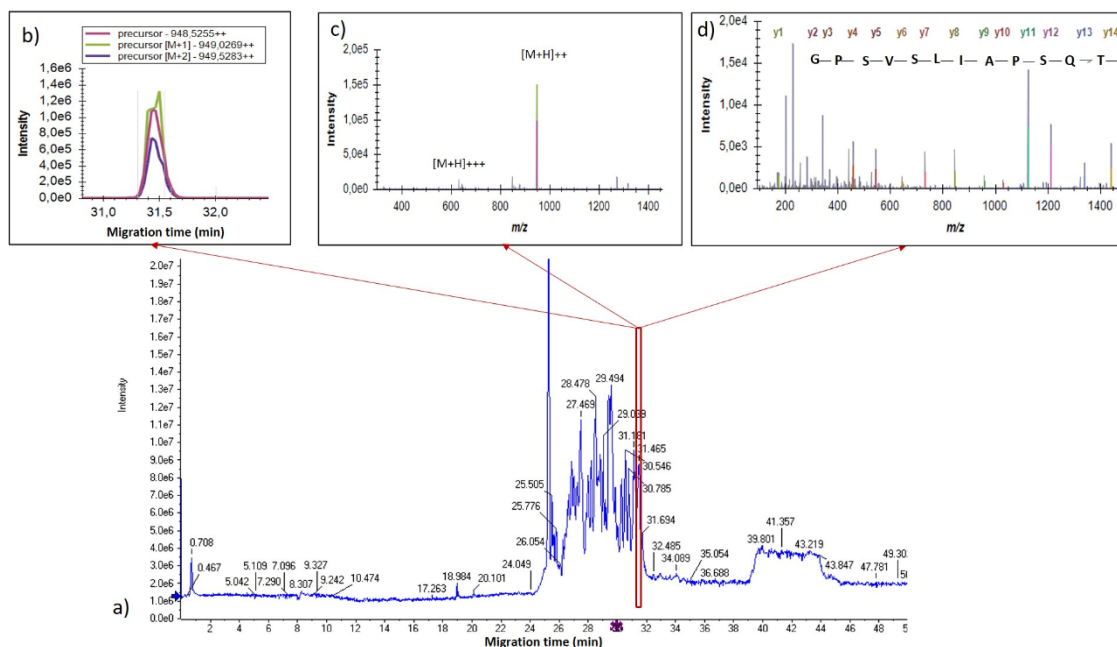


Figure 2.11. Electropherogram **a.** of Infliximab analyzed with CZE-MS/MS. **b.** EIC of the DILLTQSPAILSVSPPGER peptide at the m/z of 948.52. **c.** MS and **d.** MS/MS spectra obtained at the migration time of 57.88 min.

Finally, the bottom-up strategy can also be used to achieve the characterization of mAb **glycosylation**. Glycosylation is also a type of PTM, corresponding to the expression of complex carbohydrate linked to the peptide backbone, which is often considered independently because of its complexity. Following the proteolytic digestion, the glycosylation remains linked to the peptide. Therefore, MS/MS data obtained from the analysis of the peptide mixture enable the identification of the glycan linked to the peptide. The fragments identified from the MS/MS spectra enable to decipher the structure of the glycan moiety. As a consequence, this methodology enables to localize the residue bearing the glycosylation, to the structure of the glycan in addition to the relative abundance of each type of glycan expressed for a particular glycosylation site [118].

2.3.2.c. Applications of the bottom-up strategy in CE-MS/MS

A) ANALYTICAL WORKFLOW

■ Sample preparation

The **primary structure** is conventionally characterized using a bottom-up strategy, in order to obtain the amino acid sequence, PTMs, and glycosylation characterization. Therefore, it is necessary to perform a proteolytic digestion protocol prior to the CE-MS analysis of the peptide mixture obtained (Figure 2.10) [119]. Before digestion, the mAb sample needs to be denatured using a chaotropic reagent in order to expose the entire peptide backbone of the protein to the proteolytic enzyme, ensuring optimal digestion [120]. The most common chaotropic agent for

mAbs digestion is RapiGest SF® (sodium 3-(2-methyl_2-undecyl-1,3-dioxolan-4-yl) methoxyl)-1-propane sulfonate). It is an acid labile surfactant that maintains the activity of most common enzymes and is compatible with MS [121]. Other chaotropic agents, such as guanidine and urea, can also be used. However, they involve the addition of important concentrations of chaotropic agent, which may not be favorable to CZE-MS analysis.

Then, the mAb goes through the reduction of the disulfide bonds. Several agents can be used, such as Tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) or Tris(hydroxypropyl)phosphine (THPP). However, the most common is dithiothreitol (DTT) [122]. This step is usually followed by alkylation with iodoacetamide (IAA) to prevent the restoration of disulfide bonds by blocking the free thiols. Finally, digestion of the mAb can be performed in order to obtain peptides. A significant number of enzymes are available [123], but the most commonly used is trypsin [124]. Trypsin is a protease which can cleave bonds at the C-terminal side of the basic residues lysine (K) and arginine (R). The peptide mixture obtained can consequently be characterized using CZE-MS analysis.

Regarding the **characterization of PTMs**, previous studies have identified that the alkaline pH of the buffer usually used for trypsin digestion could induce deamidation of asparagine, which inevitably introduces a bias [125]. Recently, a few studies have been performed to limit endogenous modifications. Kori *et al.* (2016), found that working with Tris buffer and 10 % acetonitrile significantly reduce the deamidation of asparagine [126]. It is also possible to use enriched ¹⁸O water during digestion so the endogenous deamidations can be distinguished from the original ones [127,128]. With ¹⁸O labeling, deamidation occurring during trypsin digestion causes a + 2.984 Da mass shift due to the ¹⁸O incorporation on newly formed *Asp/iso-Asp* residue (+2 Da) and the deamidation (+0.984 Da). In 2019, Cao *et al.* worked at lower pH using a combination of low-pH-resistant Lys-C and modified trypsin and noted a limitation of endogenous deamidations [129]. Since a long incubation time at 37°C is usually performed for tryptic digestion and may be favorable to endogenous modifications, some studies have tried to reduce the digestion time using pressure cycling technology (PCT) assisted tryptic digestion [130]. Other procedures tried to automate trypsin digestion. For instance, micro-reactors were developed with immobilized trypsin in capillaries [131].

Like PTMs, **glycosylations** can be characterized using the analysis of proteolytic peptides in a bottom-up approach. However, for a given glycosylation site located on a specific residue, a significant number of glycan structures are expressed, exhibiting different relative abundances, which makes the analysis of glycosylation particularly complex. To address this complexity, several strategies have been developed, depending on the characterization approach used (Figure 2.12). In addition to the analysis of the peptide mixture obtained from proteolytic digestion, it is

also possible to release the glycan moiety from the peptide and label it with a fluorescent dye. Glycan release is performed using enzymatic digestion, in most cases with the peptide-N-glycosidase F (PNGase F) which is able to remove N-linked oligosaccharides [132]. Consequently, the released glycans can be labeled using a fluorescent dye to enable detection using fluorescence. The most commonly used dye is APTS (1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonic acid), which has been routinely applied in the biopharmaceutical industry which allows fluorescence detection and is compatible with MS analysis [133,134].

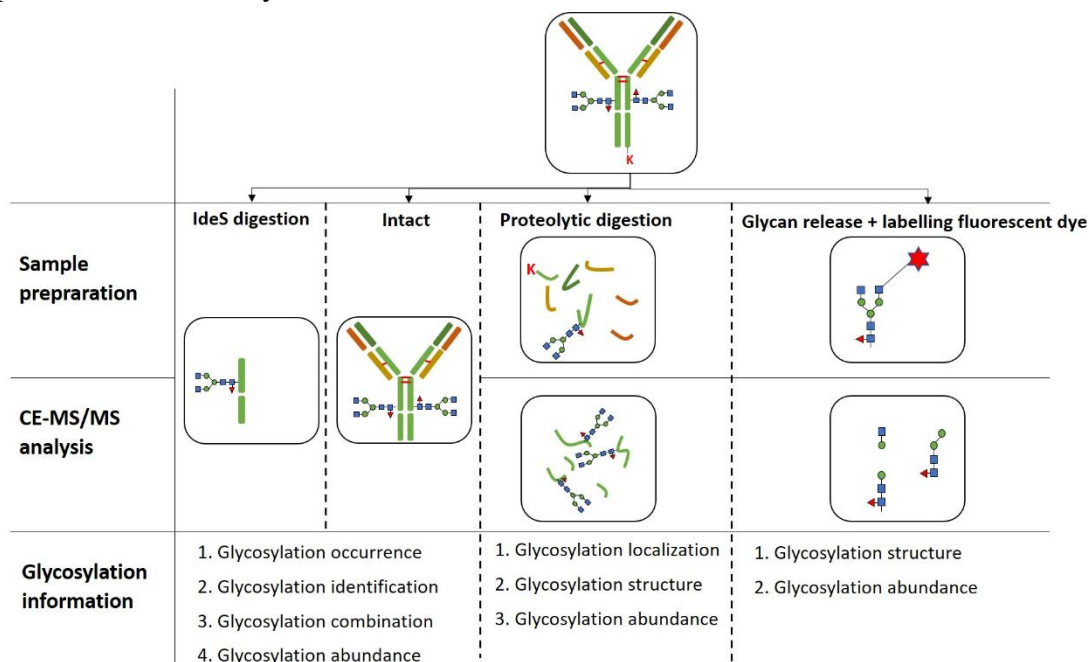


Figure 2.12. Schematic of the different analytical workflows used for the characterization of mAbs glycosylation.

▪ **CE separation considerations for peptide analysis**

CZE is adapted to the separation of peptides because, in this separation mode, peptides having different compositions in terms of amino acid residues will necessarily have different effective mobilities. The BGE used is principally composed of acetic acid or formic acid. An acidic BGE allows to quasi-systematically obtain cationic peptides and ensure maximum protonation of the silanol present on the capillary wall in order to prevent analyte adsorption. In addition, the BGE flowrate generated by the electro-osmotic flow (EOF) is favorable with hyphenation with ESI-MS. One of the main limitations of CE is sample loading capacity, which usually represents a few nanoliters. As a consequence, different methods have been developed in order to significantly increase sample volume injection while maintaining an optimal separation efficiency [135] [136]. The two main methods for sample stacking of biomolecules in CZE are transient isotachopheresis (t-ITP) and dynamic pH junction. t-ITP is a preconcentration method where the sample is solubilized in a leading electrolyte, different from the BGE. The leading electrolyte has a higher electrophoretic mobility than the BGE, and migrates faster than any analyte ion in the sample

solution [69]. It results in a staking effect of the analyte, allowing a better sample loading capacity than classic CZE. t-ITP enables the injection of sample volumes up to 25% of the capillary volume with improved separation efficiency. Dynamic pH junction has been recently used for top down and bottom-up proteomics. In pH junction preconcentration, the sample is prepared in an alkaline buffer and the BGE is acidic. When the electric field is applied, negatively charged peptides migrate toward the anode until the junction with the BGE [137]. This effect leads to the staking of the peptides which become positively charged when transitioning to the acidic BGE. Afterward, normal CZE is occurring and peptides migrate toward the ESI source [96].

B) AMINO ACID SEQUENCE CHARACTERIZATION USING CE-MS(/MS)

The analysis of proteolytic peptide mixtures can be performed using CZE-ESI-MS or CZE-MALDI-MS in order to potentially identify every peptide generated. Biacchi *et al.* (2014) performed the amino acid sequence characterization of a humanized mAb by CZE-UV/MALDI-MS. They designed an in-house coupling instrument that enables CZE separation, followed by automated fraction collection and deposition on a MALDI plate. The offline CZE-UV/MALDI-MS analysis demonstrated the possibility to obtain a sequence coverage of 92 % for HC and 100 % for LC of the considered mAb [138].

In 2006, Gennaro *et al.* presented the potential of CZE-ESI-MS for the characterization of mAbs using a Lys-C digestion. They used a CE-MS system equipped with a coaxial sheath-liquid interface in order to maintain the electric field during the separation [139]. In a similar manner, Whitmore *et al.* (2012) compared the analysis of a mAb peptide digest using sheath-liquid CZE-ESI-MS and sheathless CZE-ESI-MS. They demonstrated the possibility to obtain a complete sequence coverage of a mAb with sheathless CZE-ESI-MS [63]. Shortly afterward, Gahoual *et al.* (2013) developed a methodology implementing sheathless t-ITP CZE-ESI-MS/MS on several mAbs and demonstrated the possibility to obtain systematically 100 % sequence coverage in a single analysis. In addition, the peptides were identified based on the high-resolution MS measurements and the MS/MS spectra concomitantly in order to provide unambiguous identification [140]. Dada *et al.* (2017) evaluated several solvent mixture systems to enhance the performance of the amino acid sequence characterization of ADC samples achieved by CZE-ESI-MS [141]. Authors showed that adding *N,N*-dimethylacetamide (DMA) or *N,N*-dimethylformamide (DMF) to the solvent system improved the separation efficiency.

In addition to product characterization and control, the bottom-up approach and amino acid sequence characterization can also be of great interest for mAb biosimilarity assessment. Indeed, several patents protecting the first generation of mAbs have recently expired, giving many companies the opportunity to produce similar ones. To prevent issues originating from those new

drugs on the market, the US Food and Drug Administration (FDA) and European Medicine Agency (EMA) regulated a biosimilar as a “biological medicinal product that contains a version of the active substance of an already authorized product”. Those regulatory agencies also indicate critical quality attributes (CQAs) that must be the same for a mAb and its biosimilars [142]. Having the same amino acid sequence is one of the CQAs and can be investigated with a bottom-up strategy. Gahoual *et al.* (2014) performed a detailed biosimilarity assessment regarding amino acid sequence using sheathless t-ITP CZE-ESI-MS/MS by comparing trastuzumab and cetuximab from their respective biosimilars. They demonstrated the possibility to identify a difference of a single amino acid sequence between the innovator mAbs and the corresponding biosimilar [143].

C) PTMS CHARACTERIZATION AND RELATIVE QUANTIFICATION USING CE-MS(/MS)

As mentioned, PTMs refers to chemical modifications of amino acid side chains. There are a significant number of PTMs that usually affect specific residues which generate a mass difference between an intact peptide and its modified counterpart (Table 1.1, chapter 1). *In vivo* PTMs of protein are a common phenomenon that can have a decisive influence on the activity of a protein [144]. Thus, they can be implicated in the inhibition/activation of proteins, and they are reported to act as biochemical signal transmitters or molecular clocks [145]. PTMs can also be generated due to environmental conditions (temperature, pH). Concerning therapeutic mAbs, PTMs can occur during the production process and/or storage, for instance. PTMs like asparagine deamidation and methionine oxidation may negatively affect the biological activity or the pharmacological properties of mAbs [146]. Therefore, they require thorough characterization in order to provide identification, locate precisely the affected residues, and estimate the level of modification of the protein [147,148]. Similarly to the amino acid sequence, PTMs are usually identified by the analysis of the peptide mixture originating from the mAbs.

Gahoual *et al.* (2013) demonstrated the possibility to use the same dataset as amino acid sequence characterization from sheathless CZE-ESI-MS/MS analysis to reveal information on PTMs for several mAbs. CZE-ESI-MS/MS data allowed to identify precisely several PTMs of interest including C-terminal glutamic acid cyclization, methionine oxidation and asparagine deamidation. For each PTM, the CZE enabled the separation of the intact peptide for its modified homologous, providing optimal sensitivity, which gives the opportunity to detect PTM levels as low as 2 % [140]. In 2015, Lew *et al.* implemented an identical method to identify hotspots such as glutamic acid cyclization, methionine oxidation, asparagine deamidation, and C-terminal lysine heterogeneity using only 100 fmol of trastuzumab [149]. Later on, Gahoual *et al.* (2016) used sheathless CZE-ESI-MS/MS for the identification of asparagine deamidation and aspartic acid isomerization of different tryptic peptides from trastuzumab. Using synthetic peptides, they

demonstrate the systematic separation of the intact peptides from their modified counterparts when exhibiting Asp deamidation and/or aspartic acid isomerization due to the selectivity provided by the electrophoretic separation. The identification of the fragment ions using MS/MS data allowed to systematically point the exact residue subjected to the modification [21].

The implementation of CZE separation in conjunction with MS/MS analysis explains the outstanding level of characterization achieved regarding mAb PTMs. Indeed, since the selectivity provided by the electrophoretic separation is dependent on the charge and the size of the analytes, it involves the separation of a large number of PTMs, even when exhibiting small mass differences. Thus, this characteristic enables to characterize independently the intact peptide from the modified homologous. In the case of asparagine deamidation, for instance, the absence of separation would lead to the inability to identify the PTM due to isotopic profile overlap [150]. Also, the separation is interesting from a MS perspective because it allows the peptides to be transferred consecutively to the MS which limits the ion suppression effect and guarantees a maximized signal intensity. In the case of aspartic acid isomerization, the PTM does not involve a mass change of the residue therefore, it cannot be identified with conventional MS/MS analysis. However, the CZE separation enabled to distinguish the similar peptides having different isomers of aspartic acid, which was attributed to the hydrodynamic radius change of the peptide between the two conformations. For this particular PTM, the incorporation of CZE allowed to enrich the level of characterization achieved compared to conventional methods. As such, the relevant properties of CZE-MS(/MS) for the characterization of PTMs have been demonstrated beyond the analysis of mAbs, including for challenging PTMs like methylation and phosphorylation [151,152].

D) GLYCOSYLATION DETERMINATION USING CE-MS(/MS)

Commonly, mAbs which are for the most part IgG1 protein, incorporate at least one N-linked glycosylation positioned in the HC F_c region (Figure 2.10). Glycosylations are influencing significantly the physico-chemical properties of the mAbs and participates to the inherent heterogeneity of the protein [30,153]. As part of the primary structure of mAbs, the characterization of the glycosylation can be performed at the peptide level or on released glycans.

The proteolytic digestion of a studied mAbs generates alongside conventional peptides, glycopeptides composed of the glycan moiety still linked to the corresponding peptide. The presence of the polar glycan moiety significantly increases the hydrophilic nature of the peptide which requires dedicated methods for analysis in liquid chromatography [103]. Because the BGE is an aqueous solution, the glycopeptides migrate in a consistent manner based on their composition which prevents the introduction of biases for the glycoprofiling. Recently, a

significant number of research articles have been describing the analysis of glycopeptides using CZE-MS(/MS) in order to perform the glycoprofiling of the mAbs. In 2006, Gennaro *et al.* reported the separation and analysis of glycopeptides isolated from Lys-C digest using CZE-ESI-MS [139]. In 2014, Gahoual *et al.* developed a sheathless t-ITP CZE-ESI-MS/MS for the characterization of the primary structure of mAb. They showed the possibility to perform alongside the amino acid sequence characterization, the identification and relative quantification of the 15 most abundant N-glycans of trastuzumab. The structure of the different glycans was deduced from the MS/MS spectra obtained through CID fragmentation. CID allows only the fragmentation of the glycan moiety. This preferential fragmentation can be explained as the glycosidic linkages of glycoforms are more labile than amide bonds of peptide backbone. In addition, they demonstrated that CZE enabled to achieve partial separation of glycopeptides exhibiting a difference of one galactose [140,154].

Similarly Kammeijer *et al.* (2017) used sheathless CZE-MS for the analysis of glycopeptides and demonstrated the partial separation of glycopeptides having a sole difference of a sialic acid [155]. They also showed the separation of non-sialylated glycoforms, as shown in Figure 2.13. Also, Giorgetti *et al.* (2018) performed sheathless t-ITP-CZE-MS/MS analysis of natalizumab's peptides. The MS/MS spectra they obtained allowed to determine precisely the glycosylation structures expressed by the mAbs [156]. Based on the intensity of ions obtained, it is possible to perform relative quantitation of glycan species in a sample, also referred as glycoprofiling. In another research, they managed to obtain that information on 7 therapeutic mAbs by CZE-ESI-MS/MS illustrating the robustness of the glycoprofiling achieved using this method [157]. the information provided by the MS/MS spectra allowed to decipher the structure of the glycan in addition to enable to locate the glycosylation site.

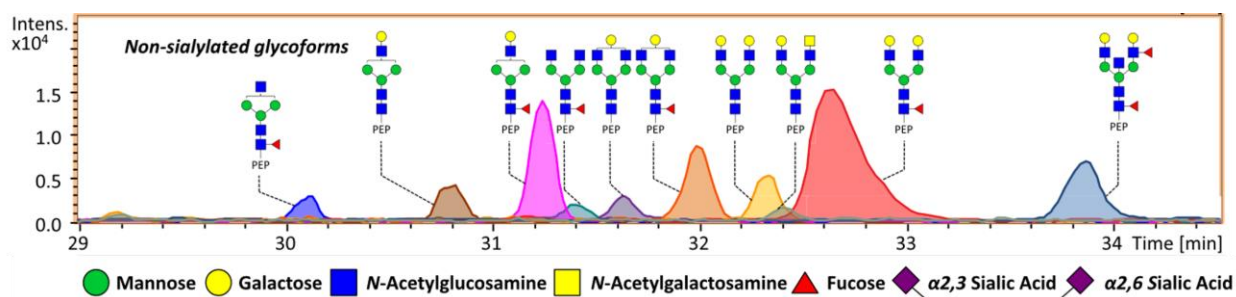


Figure 2.13. CE-ESI-MS analysis of prostate specific antigen (PSA) non-sialylated glycopeptides after a tryptic digestion. Extracted from Kammeijer *et al.* (2017) [155].

2.4. Conclusion

Comme présenté dans le chapitre de livre, le couplage CE-MS/MS suivant une stratégie *bottom-up* peut être employé pour la caractérisation de la structure primaire des anticorps. Les aspects structuraux secondaires ou tertiaires, se référant à l'agencement des séquences d'acides aminés, ou encore l'agrégation des mAbs, ne sont pas possibles suivant cette stratégie. Pour explorer ces dimensions, il est nécessaire de recourir à d'autres méthodes, basées sur des discriminations de taille, comme la chromatographie d'exclusion stérique.

Néanmoins, la caractérisation de la structure primaire des mAbs est essentielle, notamment car elle permet l'évaluation de plusieurs CQA établis par les autorités réglementaires. L'analyse peptide-centrée *bottom-up* mène à la caractérisation de la séquence d'acides aminés, la localisation et l'identification de certaines PTM, voire de quantifier leur abondance relative. Par ailleurs, l'évaluation de la biosimilarité d'anticorps monoclonaux s'effectue en partie par cette approche. Ainsi, plusieurs applications du couplage CE-MS/MS pour la caractérisation de la structure primaire d'anticorps monoclonaux ont pu être présentées dans ce chapitre. Ces applications ont été réalisées sur des mAbs issus de leur formulation, et non pas d'une matrice biologique.

Une autre information importante est que jusqu'à présent et d'après nos connaissances actuelles, la quantification des anticorps n'a pas encore été décrite avec le couplage CE-MS/MS. Or, la quantification de traitement thérapeutique est essentielle lors de suivi clinique, afin d'identifier rapidement des pertes de réponses et adapter le traitement. D'autres méthodologies analytiques sont couramment utilisées à cette fin, et sont présentées dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3.

METHODES POUR LE SUIVI QUANTITATIF DE MABS

Préambule

Une fois l'anticorps injecté dans l'organisme du patient, sa quantification est un préalable indispensable à l'évaluation de ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Les anticorps ont des demi-vies relativement longues (la médiane étant de 14 jours [158,159]) dans le système immunitaire, comparées à d'autres biomolécules thérapeutiques, mais leur clairance peut varier d'un patient à un autre. La concentration doit donc être suivie de manière routinière afin d'ajuster la dose du traitement.

La majorité des mAbs thérapeutiques est administrée par voie intraveineuse, bien que quelques-uns (adalimumab, omalizumab et palivizumab) soient administrés par voie sous-cutanée, mais diffusent pour rejoindre la circulation sanguine. En raison de leur grande taille et de leur nature hydrophile, les IgG ont une faible pénétration tissulaire, donc restent dans le plasma. Par conséquent, la quantification des mAbs thérapeutiques après leur administration est généralement réalisée à partir d'échantillons sanguins prélevés au patient. Après centrifugation du sang, on obtient le plasma qui, sans anticoagulant, mène à du sérum. Les méthodes analytiques sont alors soumises à un obstacle de taille (ou plutôt ici, de concentration) : les mAbs thérapeutiques se retrouvent en concentrations très faibles ($1-50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) parmi de nombreuses protéines, incluant notamment des IgG naturelles ($1-5 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). La présence de la matrice et de ses composés mène à des défis analytiques pour conserver une sensibilité suffisante.

De plus, les méthodes quantitatives développées dans ce contexte doivent répondre à de nombreux critères établis par les autorités en vigueur. On retrouve essentiellement l'Agence Européenne du Médicament (EMA, Europe) et Food and Drug Administration (FDA, États-Unis) qui sont deux autorités majeures du domaine pharmaceutique [160,161]. Elles ont établi des critères que les méthodes de quantification doivent valider pour garantir, entre autres, l'exactitude et la précision du résultat [162]. Ainsi, chaque nouvelle méthodologie quantitative développée doit faire l'objet d'une validation de méthode, pour être appliquée en routine.

Par ailleurs, la concentration sanguine du mAb thérapeutique n'est pas la seule mesure quantitative régulière des patients traités par cette biothérapie. Il est apparu que ces traitements peuvent générer la production d'anticorps immunogènes par l'organisme des patients, impactant l'activité thérapeutique. Ainsi, leur détection et quantification sont elles aussi extrêmement importantes pour le suivi clinique, et présentent des défis supplémentaires, discutés dans ce chapitre.

3.1. Quantification de mAbs par ELISA

3.1.1. Principe

Le dosage d'immunoabsorption enzymatique (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* – ELISA) est un test immunologique qui repose sur l'étude de l'interaction entre deux composés, dont l'un est ajouté en concentration fixe à une matrice biologique, pour définir la concentration du deuxième. Il s'agit d'un immuno-dosage rapide, sensible, facile à mettre en œuvre, sur un petit volume, sans utiliser d'étape de purification préalable de l'échantillon. Il existe de nombreux formats de ces tests ELISA, adaptés à diverses applications, qui permettent la quantification d'antigènes ou d'anticorps dans des matrices biologiques. Lors de la quantification de mAbs thérapeutiques dans du sérum, un des formats particulièrement répandus est celui schématisé sur la Figure 3.1. Il est utilisé pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques (cercles orange, Figure 3.1), tout en évaluant leur capacité à former des complexes antigène/anticorps.

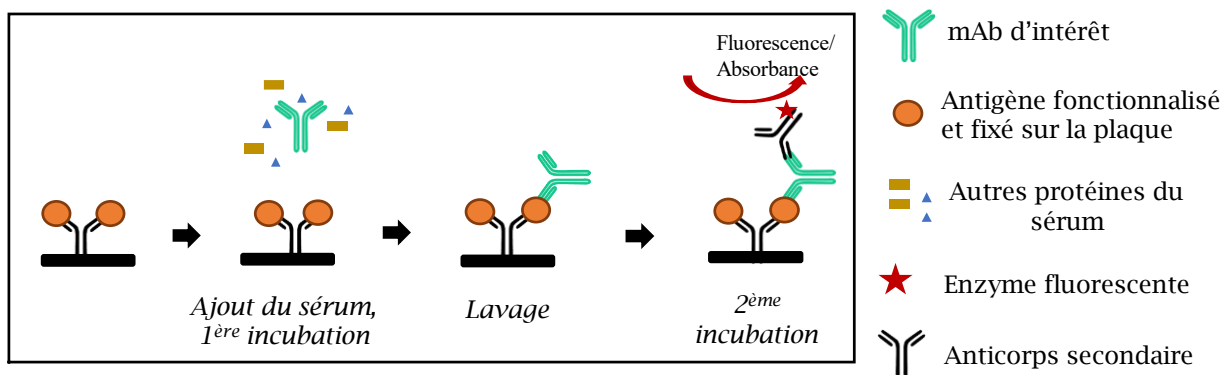


Figure 3.1. Dosage ELISA pour la quantification de mAbs dans du sérum.

La première étape consiste à revêtir une surface solide (plaque à 96-puits) avec l'antigène spécifique du mAb thérapeutique à quantifier. Puis, la matrice sérique contenant le mAb est ajoutée. Un temps d'incubation est nécessaire pour laisser la première interaction se réaliser. Si l'analyte d'intérêt est présent dans l'échantillon, il se liera spécifiquement à la surface revêtue, formant ainsi des complexes antigène-anticorps. Plusieurs lavages successifs sont alors effectués afin d'éliminer la matrice.

Enfin, un anticorps secondaire, dirigé lui aussi contre la partie CDR du mAb primaire, et préalablement conjugué à une enzyme fluorescente, est ajouté pour effectuer la deuxième interaction spécifique avec le mAb. Une enzyme couramment utilisée pour la conjugaison à ces anticorps secondaires est la peroxydase de raifort (HRP, *horseradish peroxidase*). Après élimination des anticorps secondaires non liés à l'analyte, un substrat chimique est ajouté qui est converti par l'enzyme en un produit détectable. Parmi ceux possibles, on peut retrouver le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) dont les chromophores produisent un bleu intense lors de la

dégradation enzymatique du peroxyde d'hydrogène par HRP. Enfin, l'ajout d'une solution d'acide sulfurique stoppe la réaction. Alors, le TMB va de nouveau donner un électron à HRP, et se transformer en di-imine, entraînant la coloration du mélange en jaune, absorbant à 450 nm [163]. La mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde permet de définir la concentration initiale de mAb.

3.1.2. Applications pour la quantification de mAbs thérapeutiques

Différents kits sont commercialisés, et largement implémentés en routine pour le suivi clinique de patients traités par mAbs thérapeutiques [164,165]. Les tests ELISA sont généralement très sensibles, ce qui permet de détecter et de quantifier de faibles concentrations de protéines thérapeutiques dans du sérum. Par ailleurs, leur facilité de mise en œuvre et la rapidité d'analyse les rendent particulièrement attractifs. Les différents formats existants peuvent également être appliqués à d'autres formes de biothérapies comme les ADC (*Antibody Drug Conjugates*) [166]. Différents développements ont été investigués afin de limiter le temps et le coût de ces analyses, déjà très compétitifs [167], ou encore pour augmenter la sensibilité [168].

Ces essais sont considérés comme spécifiques, puisqu'ils requièrent deux interactions antigène-anticorps (certains formats n'en nécessitent qu'une seule). Cependant, il arrive que plusieurs mAbs thérapeutiques aient la même cible antigénique, comme l'inflximab et l'adalimumab, deux agents anti-TNF- α . Il arrive parfois que certains patients nécessitent un changement thérapeutique d'un agent vers un autre. Alors, durant cette période de changement, les immunodosages ELISA ne sont pas capables de distinguer ces agents mAbs.

Malgré leurs nombreux avantages, les tests ELISA présentent également certains autres inconvénients. Ils peuvent être sensibles aux interférences induites par d'autres composés présents dans la matrice, entraînant des résultats erronés ou faussement positifs/négatifs. Or, le sérum contient de nombreuses protéines entraînant ces effets. Par exemple, les facteurs rhumatoïdes ou les anti-IgG naturellement présents dans le sang peuvent se lier à l'anticorps fixé sur la plaque et être détectés comme analyte. De plus, la stratégie nécessite une fixation préalable d'anticorps sur une surface solide, ce qui peut altérer le paratope et restreindre la première interaction entre l'antigène et l'anticorps. Les lavages successifs de ces tests peuvent également entraîner la dissociation de certaines interactions formées [59]. Afin d'assurer la reproductibilité de cette étape, certains laboratoires utilisent des programmes de lavages automatisés des plaques.

3.1.3. Cas particulier de la quantification d’anticorps anti-drug (ADA)

Les tests ELISA peuvent également être utilisés pour quantifier non pas les mAbs thérapeutiques, mais des anticorps naturels de l’organisme. Par exemple, récemment, un test ELISA pour quantifier des mAbs dirigés contre le SARS-CoV-2, un virus respiratoire, a été développé [169]. Ce test consiste à identifier la pathologie par le biais de la réponse immunitaire développée par l’organisme. Il est également décrit l’utilisation de tests ELISA pour la détection et la quantification d’anticorps anti-médicaments (ADA), dirigés contre le mAb thérapeutique, suite à une réaction immunogène d’un patient [170,171]. Cette réaction auto-immune, néfaste pour le traitement thérapeutique, doit être contrôlée. Aussi, les autorités de régulation telles que EMA et FDA indiquent la nécessité de quantifier les ADA développés. Les tests ELISA sont couramment utilisés en routine pour le suivi clinique de ces réponses. Il faut noter que cette stratégie permet la quantification d’un certain type d’ADA : les neutralisants, c’est-à-dire ceux dirigés contre le paratope de l’anticorps thérapeutique.

En plus de ceux cités, d’autres effets indésirables de ces immunodosages sont retrouvés essentiellement pour la quantification d’ADA. La présence d’antigène libre du mAb thérapeutique dans le sérum peut entraîner une compétition entre l’ADA et cet antigène. Cela est décrit dans la littérature comme *drug-target interference* [172]. Par ailleurs, certains formats ELISA ne permettent pas de détecter les ADA de type IgG4, ne possédant qu’un seul site de reconnaissance. Enfin, certains ADA ont une très faible affinité avec leur médicament cible, mais restent importants à identifier. Les lavages des ELISA ne parviennent pas, dans certains cas, à maintenir ces interactions, qui peuvent donc mener à des faux négatifs.

3.2. Quantification de mAbs par spectrométrie de masse

3.2.1. Défis de la quantification par MS

La singularité de la spectrométrie de masse réside dans sa capacité à identifier les molécules en se basant sur leur rapport masse/charge et leurs motifs de fragmentation. Durant plusieurs décennies, la MS a été essentiellement utilisée pour l'analyse chimique qualitative. Pour répondre aux besoins pressants de mesures moléculaires quantitatives, un certain nombre de laboratoires se sont concentrés sur les améliorations technologiques et méthodologiques susceptibles de faire de la MS une plateforme quantitative [173]. Celle-ci a néanmoins rencontré à ses débuts beaucoup de défis. Les calibrations linéaires obtenues par spectroscopies UV par exemple semblaient beaucoup plus attractives que celles résultant d'analyses par MS. Cela est dû à plusieurs facteurs impactant ses capacités quantitatives. Dans un premier temps, des défis instrumentaux, avec par exemple les efficacités de transmission d'ions dans le spectromètre, ou de détection, sont à considérer en MS. Dans un second temps, l'efficacité d'ionisation des analytes, leurs concentrations, la répétabilité limitée de leurs signaux, et les interférences spectrales sont autant de paramètres à évaluer pour assurer une quantification robuste.

Le choix de la technique d'ionisation, nécessaire à l'entrée de la MS est important, car elle affecte le nombre d'états de charge et les spectres MS des analytes introduits. La technique de désorption-ionisation par MALDI est intéressante, car génère peu d'états de charges, la rendant très sensible. Néanmoins, il s'agit de l'ionisation par électrospray (ESI) qui a contribué à rendre la MS attractive pour la quantification de biomolécules, car a permis son couplage à des méthodes séparatives, décomplexifiant les mélanges et limitant alors les interférences. Les méthodes de préparation d'échantillons peuvent également être implémentées, surtout dans le cas de matrices biologiques, toujours pour réduire les effets de matrices, et augmenter la spécificité de l'analyse. Il est également possible de procéder à des étapes de dilution ou de concentration des analytes, afin de se placer dans des conditions adéquates à la sensibilité de la méthode. Cependant, toutes ces étapes sont consommatrices de temps et peuvent limiter la mise en œuvre de la procédure. De plus, la préparation d'échantillon peut affecter la mesure quantitative en induisant des pertes ou altérations de l'analyte. Les sections de ce chapitre présentent les stratégies les plus implémentées pour la quantification de mAbs par MS, et décrivent comment s'affranchir des erreurs liées à la préparation et à l'analyse afin d'obtenir une quantification absolue. Par opposition à la relative, elle permet de déterminer la concentration exacte d'une molécule dans une matrice, et non pas sa proportion par rapport à un autre composé.

3.2.2. Quantification d'un mAb à partir de ses peptides

La gamme en masse limitée de certains spectromètres basse résolution, et la perte de sensibilité liée à l'obtention d'espèces multichargées lors de l'ionisation ESI de protéines entières, limitent leur quantification sous forme intacte. Aussi, il est généralement préférable de digérer les mAbs au préalable de leur analyse par MS. Les ions alors générés après ionisation ESI présentent majoritairement 2 ou 3 états de charges, qui peuvent être suivis selon différentes stratégies. Cette section décrit les principales étapes à prendre en compte lors d'une stratégie d'analyse peptidique de mAbs par MS.

3.2.2.a. Extraction et protéolyse enzymatique de l'anticorps

L'étape de préparation d'échantillon regroupe toutes les manipulations depuis la collecte de l'échantillon d'intérêt jusqu'à son injection dans l'instrument de séparation. On peut, lors d'une stratégie d'analyse MS peptidique, scinder cette étape en deux parties : la purification et la digestion. L'étape de purification permet d'éliminer la matrice biologique et tous les autres éléments qui la composent, à l'exception de l'analyte (mAb). Il existe une pléthore de méthodologies à cette fin, à commencer par les méthodes de précipitation d'IgG, très efficaces pour éliminer l'albumine, soit environ 60 % des protéines plasmatiques totales [174]. Cependant, bien que simples et abordables, elles sont consommatrices de temps (précipitation de nuit) et sont peu spécifiques. Une approche alternative consiste à effectuer une extraction ciblée du mAb en utilisant, par exemple, l'antigène cible se liant spécifiquement à la région CDR de l'anticorps. Cet antigène peut être fonctionnalisé sur une surface solide pour faciliter l'extraction [175,176].

Une fois le mAb extrait de la matrice, il peut être digéré, suivant les mêmes étapes que celles présentées dans le chapitre de livre (Section 2.4.2.c du manuscrit). Brièvement, une enzyme, telle que la trypsine, permet de le digérer en peptides par hydrolyse de liaison entre des acides aminés particuliers. Il est intéressant de rendre disponible le maximum de sites de l'anticorps en utilisant des détergents comme le RapiGest®, particulièrement utilisé avant l'analyse MS. Une fois l'anticorps complètement dénaturé, un réducteur de ponts disulfures, tel que le dithiothreitol (DTT), peut être ajouté pour dissocier les chaînes lourdes et légères du mAb. Pour éviter que ces ponts disulfures ne se reforment au cours de la digestion, il est possible d'utiliser un agent alkylant pour occuper les places de ces sulfures, tel que l'iodoacétamide (IAA). Toutes ces étapes permettent d'augmenter l'efficacité de digestion.

3.2.2.b. Acquisitions MS des peptides

Une fois le digest peptidique obtenu, il peut être décomplexifié par une méthode séparative avant d'être ionisé en ESI et analysé dans le spectromètre de masse. Si une analyse en tandem MS/MS

est utilisée, alors différentes stratégies d'acquisition de ces ions peptidiques peuvent être implémentées. Le choix de la stratégie à réaliser dépend de l'objectif de la méthode, mais aussi du spectromètre disponible. La méthode la plus utilisée pour un suivi quantitatif d'ions est appelée MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) et peut être effectuée par des triples quadripôles. L'objectif est, au cours d'un cycle de scan MS, de sélectionner un ion précurseur, de le fragmenter, et de suivre dans un second quadripôle (ou TOF par exemple) un ou plusieurs de ses fragments. Il en résulte la possibilité de suivre le signal de cette fragmentation au cours du temps, ce qui permet d'obtenir une information quantitative et fiable de la présence du composé. Cette approche nécessite de cibler les ions à suivre avant leur analyse.

D'autres stratégies permettent l'obtention des spectres MS/MS d'ions précurseurs, telles que la DDA (*Data Dependant acquisition*) ou encore la DIA (*Data Independent Acquisition*). La méthode DDA fragmente au cours d'un cycle les ions les plus intenses issus du spectre MS du scan balayage. En mode DIA, pour chaque cycle, l'instrument se concentre sur une fenêtre de masse étroite de précurseurs et acquiert des données MS/MS de tous ceux détectés dans cette fenêtre, qui est ensuite étendue à l'ensemble de la gamme de masse. Les méthodes DDA et DIA sont répandues pour la quantification d'espèces, bien que moins utilisées que la MRM [197,198]. La DDA est plus sensible que la DIA, mais présente une moins bonne précision et reproductibilité.

3.2.2.c. Sélection des peptides signatures

Après digestion peptidique du mAb thérapeutique, une multitude de peptides sont obtenus et analysés en MS. La sélection des peptides à suivre pour la quantification d'un mAb doit être menée avec précaution afin de garantir sa spécificité. Notamment, les mAbs chimériques, humains ou humanisés, présentent de fortes homologies de séquences avec les IgG naturellement présentes dans l'organisme. Étant donné le grand nombre d'IgG dans les matrices biologiques, il est nécessaire de sélectionner des peptides dont la séquence d'acides aminés est spécifique au mAb.

Afin d'assurer cette spécificité, il est possible d'utiliser plusieurs outils, tel que « Protein Prospector » (<http://prospector.ucsf.edu>) permettant la digestion *in silico* de l'anticorps, et « Protein Blast » (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) permettant de cribler les peptides générés et les comparer aux séquences peptidiques d'un organisme cible à partir d'une base de données telle que UniProtKB®. Les peptides sélectionnés doivent ensuite être étudiés pour s'assurer qu'ils ne présentent pas de PTM, qui pourraient entraîner une hétérogénéité non systématique. De préférence, les asparagines, les méthionines ou les cystéines, qui peuvent subir respectivement des déamidations, oxydations ou alkylations, sont à éviter.

3.2.2.d. Sélection de l'étalon interne

Afin d'utiliser un peptide résultant de la digestion protéolytique d'un anticorps comme indicateur de sa concentration, il est crucial que ce peptide rapporteur soit présent en concentration équimolaire par rapport au mAb d'origine. Ainsi, il faut considérer que la digestion peptidique a été complètement efficace, ce qui n'est pas toujours le cas. Par ailleurs, les pertes ou altérations du mAb durant l'étape de purification ou encore les fluctuations de l'efficacité d'ionisation du peptide sont autant de problématiques pouvant affecter l'intensité du signal m/z de l'ion considéré, et donc sa quantification. L'utilisation d'un étalon interne, introduit le plus tôt possible à l'échantillon en concentration connue, permet de normaliser la réponse du mAb à la sienne, et ainsi de déterminer la concentration absolue du mAb au départ dans sa matrice. L'étalon interne doit répondre à plusieurs critères :

- Il doit, dans un premier temps, avoir des caractéristiques physico-chimiques les plus proches du mAb à quantifier. Ainsi, lors du dosage, il pourra se comporter de manière similaire ;
- Il ne doit pas se trouver dans la matrice de départ, car sa concentration doit être connue ;
- Afin d'être identifié en spectrométrie de masse, l'étalon doit présenter un écart de masse distinguable et connu par rapport à l'analyte ($\Delta m > 3$ Da).

Des étalons marqués par isotopes (*Standard Isotope Labeled – SIL*) ont été mis au point et sont considérés comme les molécules qui imitent le mieux le comportement des analytes, tout en répondant aux critères cités précédemment. Le marquage SIL implique de substituer certains atomes courants (comme le carbone ^{12}C , l'azote ^{14}N ou l'hydrogène ^1H) par des isotopes stables (non radioactifs) plus lourds (par exemple, le carbone ^{13}C , l'azote ^{15}N ou le deutérium ^2H) d'une molécule. Cela crée des versions légèrement modifiées de la molécule d'origine, qui peuvent être détectées par MS. Ces étalons SIL existent sous de multiples formes, et peuvent être introduits à différentes étapes de la préparation d'échantillons.

▪ Peptides marqués par des isotopes stables

La stratégie AQUA (*Absolute QUAntification*) est l'une des méthodes de quantification absolue de protéines les plus utilisées [179,180]. Cette approche repose sur l'utilisation de peptides synthétiques isotopiquement marqués (SIL-peptides), ajoutés à la protéine digérée en tant qu'étalons internes. Généralement, ces peptides sont marqués ^{15}N , ^{13}C sur un acide aminé particulier. Le digest peptidique est ensuite extrait et analysé par MS. La concentration de la protéine est déterminée par le rapport des intensités d'un peptide naturel et de celui isotopiquement marqué. AQUA considère donc que la purification/extraction préalable de la protéine est totale, ainsi que le peptide sélectionné est systématiquement digéré. Cela permet de s'affranchir des erreurs liées à l'analyse, comme la suppression d'ions lors de l'ESI.

- **Polypeptide marqué**

Les QconCATs sont des protéines artificielles, consistant en la concaténation de plusieurs peptides SIL [181]. Il résulte alors une protéine recombinante marquée par des isotopes, pouvant être ajoutée à l'échantillon avant la digestion. Les peptides concaténés digérés servent de standard interne pour différentes protéines. L'un des principaux inconvénients de cette approche est que l'efficacité de la digestion des protéines peut varier de manière significative entre les QconCATs et les protéines natives en raison des différentes compositions en acides aminés. Cependant, les QconCATs peuvent être composés de peptides marqués de diverses protéines, permettant leur quantification simultanée.

- **Anticorps entier marqué**

La stratégie de quantification utilisant des étalons de protéines entières et marquées est appelée PSAQ (*Protein Standard Absolute Quantification*) et fut décrite par Brun *et al.* (2007) [182]. Ces étalons sont incontestablement les plus adaptés à la quantification absolue de protéines, mais sont onéreux, ce qui limite fortement leur utilisation. Lors d'une stratégie peptide-centrée, les suivis du mAb d'intérêt et de l'étalon interne s'effectuent sur un ou plusieurs peptides. Ainsi, il est essentiel d'anticiper les peptides générés lors de la digestion des anticorps (analytes et étalon interne), afin de s'assurer que chaque peptide de l'étalon interne présente un marquage isotopique permettant de le distinguer par MS. En particulier, pour les anticorps monoclonaux, Sigma commercialise les SILuTMMAB (*Stable-Isotope Labeled universal Monoclonal Antibody*), des anticorps entiers de type SIL. Ces mAbs sont marqués (¹⁵N, ¹³C) au niveau des lysines et des arginines des chaînes lourdes et légères, et sont donc parfaitement adaptés à une digestion tryptique, qui résultera en l'obtention de peptides possédant tous un marquage, identifiable par MS (+ 8 Da pour la lysine, et +10 Da pour l'arginine). L'ajout à la matrice de départ du mAb marqué entier permet alors de s'affranchir de toutes les étapes de manipulation d'échantillon et de l'analyse MS.

3.2.2.e. Mise en place d'une quantification par étalon interne

- **Principe de l'IDMS**

La première application de la protéolyse pour la quantification absolue d'une protéine par MS date de 1996 et a été développée par Barr *et al.* [183]. Dans cette méthode, un étalon interne marqué isotopiquement est ajouté en concentration connue à la protéine de départ. Son marquage permet de le distinguer par MS par incrément isotopique de la masse de l'étalon par rapport à celle du peptide analyte. Par produit en croix, étant donné que la concentration de l'étalon est connue, il est possible de remonter à celle du peptide analyte. Cette stratégie est nommée IDMS (*Isotopic Dilution Mass Spectrometry*).

▪ **Principe de la gamme d'étalonnage avec étalon interne**

La quantification en IDMS est très répandue, mais l'application d'un simple produit en croix pour revenir à la concentration initiale du mAb peut présenter des limites de répétabilité. De plus, il est compliqué d'estimer le domaine de linéarité entre la réponse du mAb et sa concentration. Il est donc généralement plus robuste de réaliser des gammes d'étalonnages préparées dans la matrice biologique. À cette matrice sont ajoutées des concentrations croissantes du mAb et des concentrations fixes de l'étalon interne, pour atteindre au moins cinq points de calibration (Figure 3.2). Simultanément est préparé l'échantillon contenant le mAb à quantifier, auquel est ajoutée la même concentration d'étalon interne que pour la gamme. Chacun des échantillons est alors préparé suivant la méthodologie implémentée (purification, digestion, technique séparative et analyse MS). L'intégration MS des peptides sélectionnés spécifiques au mAb et à l'étalon interne permet d'établir une relation linéaire, qui peut alors être utilisée pour déterminer la concentration du mAb de l'échantillon inconnu.

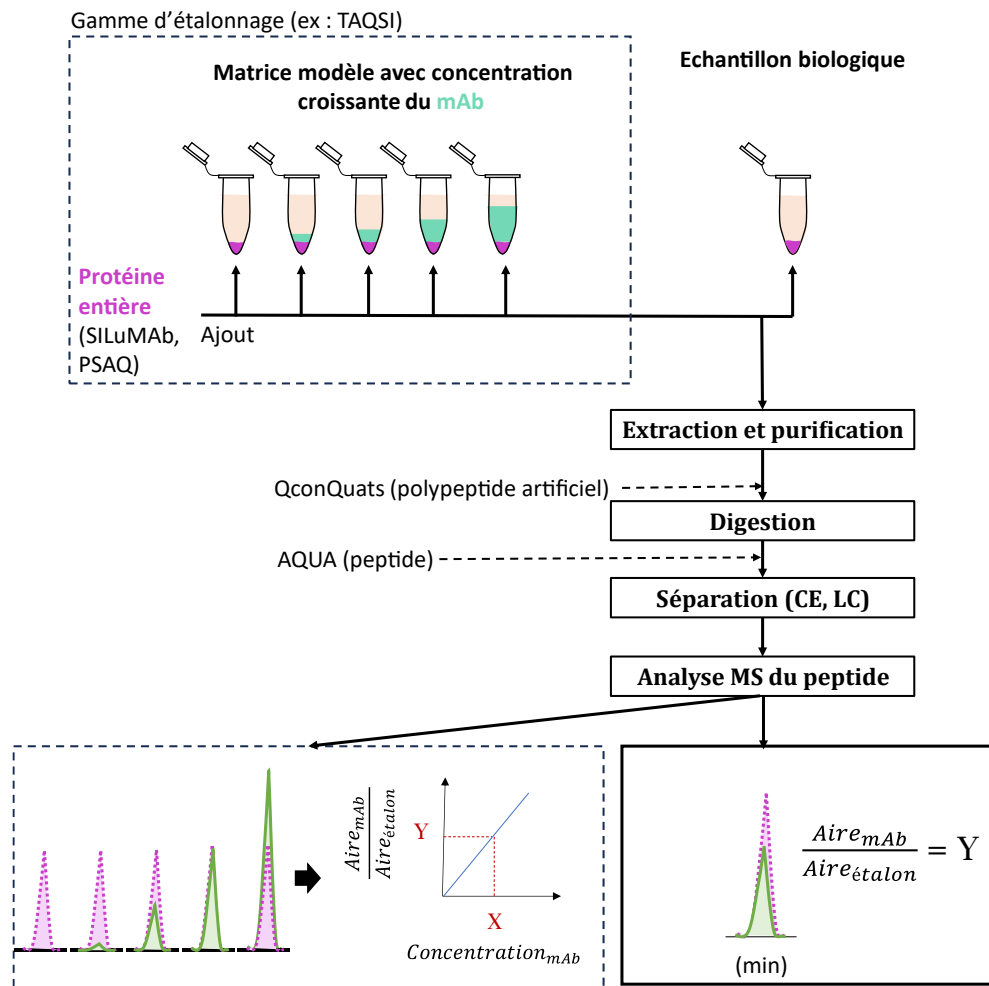


Figure 3.2. Principe de quantification d'un mAb issu d'une matrice sérique par MS, par ajout d'étalons internes. En pointillé : différentes possibilités d'étalons et de stratégies quantitatives. Adapté de Wang et al. (2016) [184].

Selon l'étalon interne choisi, la mise en place de la stratégie quantitative va différer. La Figure 3.2 présente brièvement les méthodologies possibles. En 2016, Wang *et al.*(2016) présentent la méthode TAQSI (*Targeted Absolute Quantitative proteomics SILAC internal standards*) par quantification avec une gamme d'étalonnage de protéines calibrantes intactes [184].

3.2.3. Validation d'une méthode quantitative MS

Après avoir établi les conditions de la méthode de quantification, il est indispensable de la valider afin de garantir le résultat apporté. Dans le cas des méthodes quantifiant des protéines dans des matrices biologiques, des directives sont proposées par les réglementations EMA et FDA [160,161]. Plusieurs critères doivent y être démontrés afin d'appuyer la validité de la méthode analytique pour la quantification de mAb. La validation permet de prouver la fiabilité d'une méthode analytique qui sera utilisée telle qu'elle en routine. Les points présentés dans cette partie ne constituent pas une liste exhaustive de tous les paramètres qu'il faut vérifier pour la validation d'une méthode de quantification. Il s'agit néanmoins de paramètres cruciaux, requis par les réglementations EMA et FDA.

- **Linéarité.** Ce critère doit être validé, si la réponse de la méthode est proportionnelle à la concentration du mAb. Une gamme de solutions calibrantes est réalisée dans la matrice, avec des concentrations croissantes de l'analyte sur au moins 6 points de concentration, chacun réalisé en répliques de trois, répartis sur des jours différents. Si un étalonnage interne est réalisé, il faut aussi préparer des blancs (juste matrice) et des zéros (matrice dopée à l'étalon). Le tracé de la réponse en fonction de l'analyte, doit mener à une relation linéaire (de coefficient de corrélation $r^2 > 0.99$). Le rétrocalcul de toutes les solutions calibrantes à partir de la relation linéaire établie permet de vérifier que les points sont proches de la droite de régression (Figure 3.3.a, Δ). Il faut alors que les valeurs de concentration du mAb rétrocalculées soient inférieures à 20 % de la concentration nominale.

- **Précision et justesse.** Ces deux critères sont essentiels lors d'une validation analytique, et permettent de démontrer que les résultats quantitatifs sont exacts et répétables dans le temps. Ils doivent être établis à partir de solutions appelées Contrôles de Qualité (QC). Les QC sont réalisés par dopage de la matrice avec de l'analyte et de l'étalon interne, issus de lots différents de ceux utilisés pour la gamme étalon. Généralement, les solutions QC sont réparties en 4 points de concentration de l'analyte, inclus dans la gamme étalon. Ces QC sont réalisés en répliques inter-journée (réalisés le même jour) et intra-journée (réalisés des jours différents). À partir de ces

réplicas, il est possible de calculer la précision, qui se calcule par leur coefficient de variation, devant être inférieur à 15 % pour être validée.

$$CV (\%) = 100 * \frac{\text{Ecart-type (réplicats)}}{C_{obs}} \quad (3.1)$$

Concernant la justesse, elle se détermine par la moyenne de la concentration mesurée (C_{obs}) des réplicas (inter-jours ou intra jours) et par le biais de cette valeur par rapport à la valeur nominale ($C_{théorique}$), devant être inférieure à 20 %

$$\text{Justesse}(\%) = 100 * \frac{C_{obs}}{C_{théorique}} \quad (3.2)$$

- **Effets de matrice.** L'idée est de déterminer l'impact qu'ont la matrice et ses composants sur la mesure quantitative de l'analyte. Des solutions références sont réalisées, par mesure des analytes et étalons dans un tampon pur. Parallèlement, on réalise des solutions de matrices modèles (blancs) auxquelles la purification est appliquée. Puis les analytes et étalons y sont ajoutés, avant analyse MS. Pour la même concentration d'analytes dans les solutions références ou modèles, le CV de la concentration mesurée après analyse doit être inférieur à 20 %. Généralement, l'utilisation d'étalon interne est très efficace pour la suppression des effets de matrice.

- **Stabilité.** Il est également très intéressant de s'assurer de la stabilité des analytes, surtout après leur préparation mais avant leur analyse. Si des échantillons sont préparés et stockés plusieurs heures dans l'échantillonneur automatique (*autosampler*), avant leur analyse, il faut s'assurer que ce stockage n'impacte pas la concentration mesurée. Généralement, les mesures de stabilité sont réalisées pour des stockages dans l'échantillonneur (quelques heures), à 4 °C (plusieurs jours), et pour des cycles de congélation/décongélation. Le CV est calculé entre des solutions ayant subi ces stockages et d'autres fraîchement préparées.

- **Sensibilité.** Elle permet de déterminer la concentration minimale que la méthode analytique permet de quantifier sans ambiguïté. Il existe plusieurs stratégies pour déterminer la LLOQ (*Low Limit Of Quantification*) d'une méthode. La plus simple à mettre en œuvre consiste à calculer la concentration pour laquelle le rapport entre le signal de l'analyte et le signal du bruit est égal à 10.

- **Sélectivité.** La sélectivité d'une méthode analytique caractérise sa capacité à restreindre le nombre de composés lors de l'analyse. Elle se distingue subtilement de la spécificité de la méthode, caractérisant plutôt la capacité de la méthode à mettre en évidence une espèce précise. La sélectivité est déterminée par l'utilisation de blancs, consistant en de la matrice pure modèle

(exempte des mAbs à quantifier) issue de lots différents, à laquelle la méthode analytique est appliquée. Les ions du mAb (m/z) sont extraits et caractérisés. Il faut que le signal soit à 15 % inférieur à celui de l'analyte quand il est présent à la concentration correspondant à la LOQ.

Paramètre de validation	Méthode		Critères de validation
	Echantillons à analyser	Résultat	
Linéarité	<ul style="list-style-type: none"> · A réaliser 5 fois : · Blanc (Matrice modèle) · Zéro (Matrice modèle + étalon) · 6 calibrants (Matrice modèle + étalon + mAb) 		<ul style="list-style-type: none"> - $R^2 > 0,99$ - rétrocalcul de C_{obs} par la régression doit donner des biais $< 15\%$ par rapport à $C_{théorique}$
Précision	<ul style="list-style-type: none"> · Etablissement de 4 contrôles qualités (QC) · <u>Intra-journée</u> : · 3 répliques par concentrations · <u>Inter-journée</u> : · 5 répliques par concentrations 		<ul style="list-style-type: none"> - Calcul du coefficient de variation entre les répliques (CV) - CV doit être $< 15\%$
Justesse	<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">A partir des mêmes analyses</p>		<p>Le % d'écart de C_{obs} avec $C_{théorique}$ doit être compris entre 85 et 115 %</p>
Effet de matrices	<ul style="list-style-type: none"> · 3 répliques de Référence : étalon et analyte dans tampon pur → Analyse MS · 3 répliques de Matrice modèle : → Purification → Ajout étalon et analyte → Analyse MS 	<p>Référence $C_{obs,référence}$</p> <p>Matrice modèle $C_{obs,matrice}$</p>	<p>Le CV entre $C_{obs,référence}$ et $C_{obs,matrice}$ doit être $< 15\%$</p>
Stabilité	<ul style="list-style-type: none"> · Stockage de QC après purification : · Stockage dans l'autosampler (heures) · Stockage 4°C (jours) · 3 Cycles congélation/décongélation 	<p>Analyse</p> <p>Stockage des QC → </p>	<p>Pour chaque type de stabilité évalué : Le CV des C_{obs} à différents temps de stockage doit être $< 15\%$</p>
Sélectivité	<ul style="list-style-type: none"> · Extraction, digestion et analyse de 6 blancs (matrice modèle) issus de lots différents 	<p>Extraction MS des ions signature</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Les signaux MS signatures de l'analyte doivent être $< 15\%$ de celui de la LOQ. - Les signaux MS signatures de l'étalon doivent être $< 5\%$ de celui usuel
LOQ	<ul style="list-style-type: none"> · A partir des données issues des gammes de concentrations (cf linéarité) 		<p>La LOQ est définie comme la concentration pour laquelle le rapport signal/bruit est > 10</p>

Figure 3.3. Principaux critères d'une validation de méthode quantitative.

CONCLUSION

Les traitements par agents mAbs anti-TNF- α restent les plus prescrits par les médecins, car les plus efficaces. Il persiste tout de même une nécessité à mieux comprendre le devenir de ces traitements après administration aux patients, afin de mieux appréhender leurs réponses cliniques, et ainsi adapter leur suivi. Cela met en évidence le besoin de développer des méthodes analytiques permettant de suivre des informations importantes de ces traitements post-administration. Il faut être en mesure de **quantifier ces anticorps**, d'évaluer leurs activités biologiques, **l'évolution de leur structure**, et de définir si le patient présente une perte de réponse, une **immunogénicité** ou encore des symptômes caractéristiques d'effets indésirables.

La quantification d'anticorps dans les matrices biologiques présente de réels défis pour les chimistes. Les analyses quantitatives mises en place doivent être développées méthodiquement, en prenant en compte les réglementations en vigueur ainsi que les attentes de l'analyse. Comme présenté dans ce chapitre 3, il est nécessaire de suivre la concentration de mAbs thérapeutiques et immunogènes lors d'un suivi clinique de patients. Étant donné que les décisions cliniques (dosage, changement de traitement) sont essentiellement basées sur ces suivis quantitatifs, il est primordial de garantir leur fiabilité. Aussi, il est important de tout mettre en œuvre pour limiter les biais (pertes associées au traitement de l'échantillon, effets de matrices, principe de la mesure). Par ailleurs, il apparaît important de développer des méthodes analytiques permettant la caractérisation structurale de mAbs après administration, et de corréliser ces propriétés qualitatives du traitement aux informations quantitatives.

Certaines erreurs de diagnostic peuvent découler de l'utilisation de multiples méthodes analytiques pour analyser un même échantillon. Les méthodes permettant d'obtenir **simultanément plusieurs informations** à partir d'une seule analyse présentent donc un intérêt considérable, non seulement pour leur facilité de mise en œuvre, mais également pour des raisons économiques. **L'analyse par spectrométrie de masse** est particulièrement appropriée au suivi simultané de plusieurs ions caractéristiques de différents analytes et a été largement implémentée pour la **quantification** de protéines dans des matrices biologiques. De plus, le chapitre 2 de ce manuscrit, consacré à la présentation du couplage CE-MS/MS, a démontré sa pertinence pour la **caractérisation structurale** d'anticorps monoclonaux. Ainsi, au cours de ce projet de doctorat, nous avons cherché à mettre à profit cette capacité, pour obtenir simultanément plusieurs informations d'un traitement thérapeutique, l'infliximab, à partir d'une matrice biologique.

PARTIE II : MISE EN PLACE DE LA METHODE
ANALYTIQUE

Il faut savoir que les méthodes « multi-attributs » (*Multiple Attribute Monitoring* – MAM) sont apparues récemment et sont basées sur des flux analytiques de pointe, pour suivre plusieurs CQA de biothérapies en une seule analyse. Jusqu'à récemment, les CQA étaient contrôlés à l'aide d'un panel de techniques analytiques orthogonales, comprenant des approches chromatographiques, biophysiques, et de MS. Les méthodes MAM sont apparues surtout dans une approche dite de *Quality by Design* (*QbD*) pour les entreprises pharmaceutiques. Elles permettent de suivre simultanément plusieurs critères comme les glycosylations, les déamidations, les oxydations (etc.) des mAbs développés. Elles sont essentiellement basées sur des plateformes LC-MS, au vu de la robustesse de la chromatographie liquide et de la capacité de la MS à suivre plusieurs analytes simultanément. Des études ont évalué ces approches MAM appliquées à des mAbs et ont souligné leurs avantages [185,186].

Un aspect pour le moment en cours d'exploration est l'application de ces méthodes de caractérisation aux mAbs après leur administration aux patients. Le suivi *in vivo* de plusieurs CQA permettrait de mieux comprendre le devenir de ces biomolécules dans l'organisme des patients. L'objectif de ce projet de doctorat fut d'implémenter le couplage CE-MS/MS pour la quantification et la caractérisation de plusieurs PTM d'un mAb en matrice biologique.

Bien que la quantification d'anticorps monoclonaux par LC-MS ait été largement décrite dans la littérature [187,188], le couplage CE-MS n'a pas encore été utilisé à ces fins, à notre connaissance. Néanmoins, certaines études ont pu appliquer ce couplage à la quantification de peptides [189] ou d'autres protéines [190].

Concernant la caractérisation des mAbs, comme présenté dans la partie introductive de ce manuscrit, il existe plusieurs approches MS. Au laboratoire LSMIS, l'approche *bottom-up*, centrée sur l'analyse de peptides, fut la première à être développée sur le couplage CE-ESI-MS, notamment afin de réaliser la caractérisation fine de la structure primaire de mAbs [140]. Les approches *middle-up* et *intact* ont aussi pu être expérimentées sur ce même couplage, et ont montré une séparation partielle des variants de charge et la caractérisation de certaines PTM [157]. Parmi elles, il a été possible d'identifier des N-glycosylations, et même quelques déamidations. Cependant, ces déamidations, ne modifiant la masse que de 1 Da, sont difficiles à identifier lors de l'analyse en niveau *middle-up* (25 kDa) ou *intact* (150 kDa) à cause d'une résolution et précision de masse du QTOF limitées. De plus, la localisation précise des déamidations sur la chaîne peptidique nécessite la fragmentation des précurseurs. Or, la CID n'est pas adaptée à la fragmentation de protéines entières.

Ainsi, la stratégie *bottom-up*, reconnue pour la quantification de protéines, a également pu prouver sa capacité à identifier et caractériser des PTM d'anticorps monoclonaux. Dans le cadre de ce projet, une stratégie analytique par CE-ESI-MS/MS, basée sur une approche peptide-centrée,

a été développée afin de quantifier l'infiximab issu d'une matrice biologique et de simultanément identifier ses PTM. L'approche globale implémentée est présentée Figure 4.1.

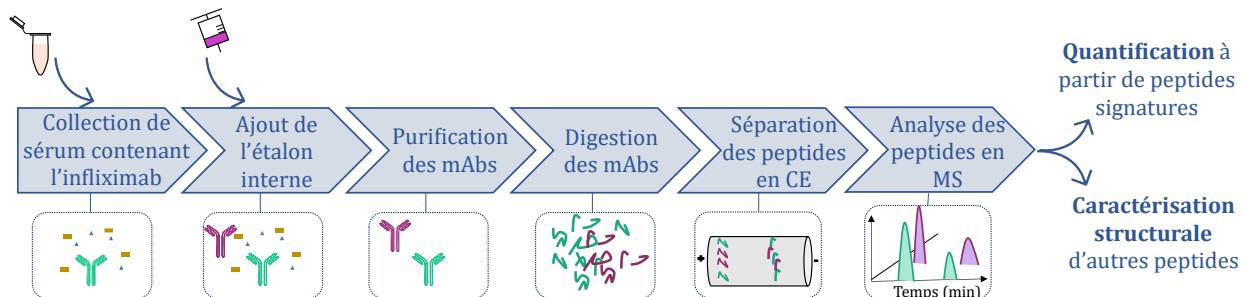


Figure 4.1. Méthodologie schématisée de l'approche de quantification et caractérisation structurale de l'infiximab mise en place.

En raison de la complexité de la matrice et de la sensibilité nécessaire aux deux objectifs, de l'ordre du $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, le développement de ce type d'analyse nécessite une attention particulière pour l'ensemble des étapes de la Figure 4.1. Ainsi, la partie II de ce manuscrit vise à présenter les développements et optimisations réalisés pour l'établissement de la méthode analytique CE-MS/MS à ces fins. Les étapes présentées sur la Figure 4.1 ont été considérées au cours de cette partie II qui est divisée en 4 chapitres :

- Le chapitre 4 présente tout d'abord l'étalon interne choisi, permettant la quantification absolue de l'infiximab dans du sérum de patient. Puis, est présentée la sélection des peptides signatures tryptiques de l'infiximab, dont le suivi des ions m/z en MS mène à sa quantification. Enfin, les sites de PTM également suivis lors de l'analyse CE-MS/MS sont proposés ;
- Dans le chapitre 5 est décrit le développement de la méthode de purification, afin d'extraire spécifiquement l'infiximab et son étalon interne de la matrice biologique. Trois grandes méthodologies ont été considérées, et leurs apports en termes de facilité de mise en œuvre, de rendement et de caractérisation des sites de PTM choisis, sont comparés ;
- Le 6^{ème} chapitre présente ensuite les conditions de l'analyse CE-MS/MS du digest peptidique de l'infiximab et de l'étalon interne. En particulier, les conditions de séparations électrophorétiques ont été brièvement optimisées par un plan d'expérience afin de sélectionner celles apportant à la fois une meilleure efficacité de pics mais aussi une résolution optimale de certains composés. Puis, les conditions de l'analyse MS sont décrites ;
- Enfin, une stratégie permettant de quantifier les PTM apparues seulement après administration du traitement monoclonal au patient, a été implémentée et est décrite dans le chapitre 7. Ce chapitre a mis en évidence des PTM artificielles induites par la préparation d'échantillon, qui ont alors été normalisées afin de ne plus les considérer.

CHAPITRE 4. SÉLECTION DES PEPTIDES À SUIVRE

Préambule

Conformément au schéma de la Figure 4.1, l'approche analytique adoptée implique la séparation électrophorétique du digest peptidique de l'infliximab et de l'étalon interne. Par suite, ces peptides sont ionisés en ESI, analysés en MS et, si une fragmentation s'effectue sur ces peptides, le spectre MS/MS résultant de ces fragments peut être obtenu. Dans le cadre de ces travaux de doctorat, il s'agit du TTOF 5600®, un spectromètre type QTOF, qui a été utilisé. Il permet l'acquisition MS et tandem MS/MS des ions issus de l'ESI à son entrée. Pour la séparation électrophorétique, il s'agit de l'instrument CESI 8000® qui a été utilisé, permettant son couplage *sheathless* à la MS.

Les deux objectifs de l'analyse sont la quantification d'infliximab et la caractérisation de certaines de ses PTM. Par conséquent, l'ensemble des acquisitions en MS et en MS/MS obtenues au cours de chaque analyse doit mener à l'obtention de ces informations. Il a été choisi de réaliser les acquisitions MS par stratégie DDA. Cela permet d'assurer une acquisition de tous les peptides issus du digest. Parmi ces peptides, il a alors fallu choisir ceux destinés à la quantification de l'anticorps, ainsi que les peptides indiquant des modifications post-traductionnelles. Puis, à partir des signaux MS de ces peptides, il sera possible d'optimiser certaines étapes cruciales de la préparation d'échantillon pour améliorer la sensibilité de l'analyse.

4.1. Quantification absolue : Sélection de l'étalon interne et des peptides signatures

4.1.1. Sélection de l'étalon interne

L'utilisation d'un étalon interne, ajouté en concentration connue dans la matrice sérique de départ, permet de remonter à la concentration de l'analyte et corrige les pertes des étapes de préparation d'échantillon et d'analyse. Pour la quantification de l'infliximab, le standard interne choisi a consisté en de l'infliximab sous forme intacte dont les lysines et arginines sont marquées par des isotopes stables lourds de carbone ^{13}C et d'azote ^{14}N . Ce standard est appelé SIL-IFX (*Stable Isotope Labeled-infliximab*). Il s'agit d'un SILuTMMAB de l'infliximab commercialisé par Sigma. Cet étalon est ajouté à la matrice sérique avant la purification. Chaque peptide du SIL-IFX obtenu par digestion tryptique (digestion choisie dans le cadre de ce projet), mènera à une différence de

masse par rapport à son homologue léger issu de l'infliximab de +8 Da (si lysine en N-terminal) ou +10 Da (si arginine en N-terminal).

4.1.2. Sélection des peptides signatures

La quantification d'infliximab (IFX) par stratégie peptide-centrée *bottom-up* implique l'utilisation du signal MS d'un peptide, qui sera proportionnel à la quantité de l'anticorps dont il est issu. La digestion tryptique fut choisie dans le cadre de ce projet doctoral, menant à l'hydrolyse des liaisons après les arginines et lysines constituant l'infliximab. Cette digestion résulte en l'obtention de 62 peptides de l'infliximab, présentés et nommés en Annexe 1. Parmi ces peptides, il a fallu sélectionner ceux à suivre pour déterminer la concentration d'infliximab. Pour que la méthode de quantification soit la plus spécifique possible, il est nécessaire de sélectionner des peptides signatures de l'infliximab dits protéotypiques.

L'infliximab étant un mAb chimérique, il possède une partie constante commune à d'autres IgG naturellement présentes dans le sang. Il n'est pas exclu, au vu de la concentration élevée de ces autres protéines par rapport aux quelques $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de l'infliximab, qu'il subsiste des interférents de ces IgG1 après purification de la matrice biologique, dont certains peptides présenteront des homologies de séquences. Ainsi, les peptides protéotypiques se trouvent sur sa partie variable, issue de séquences murines. D'autres critères ont été pris en compte lors de cette sélection de peptides, notamment un nombre d'acides aminés supérieur à 6, et la vérification qu'aucun de ces acides aminés ne sont prompts à subir des PTM. En effet, cela entraînerait une différence de migration en CE et/ou de m/z en MS du peptide.

Cette pré-sélection a résulté en l'obtention de 4 peptides candidats de l'infliximab (HC05, HC12, LC01 et LC03, présentés en Annexe 1). Afin de vérifier que ces peptides soient spécifiques à l'infliximab, une recherche blast a été réalisée, permettant le criblage complet sur la base de données Uniprot. Puis, la sélection a été de nouveau affinée en prenant en compte l'intensité du signal observé pour chacun des 4 peptides, dépendante de leur efficacité de digestion et d'ionisation. Dans le cadre d'une quantification, il est nécessaire de suivre deux peptides, l'un pour établir la concentration de l'échantillon inconnu (*Quantifier*) et un autre pour vérifier cette valeur (*Qualifier*). Pour que la méthode soit la plus sensible possible, les deux peptides présentant la plus grande intensité de signal après digestion du produit infliximab formulé, et analyse CE-MS/MS, furent choisis et sont présentés dans la Table 4.1.

Dans la suite de ce manuscrit, les valeurs indiquées de concentration d'infliximab obtenues par CE-MS, les limites de quantification des différents protocoles, ou encore les efficacités de pics

proviennent du peptide LC01, le *Quantif*. Cependant, l'analyse du HC12 a systématiquement été réalisée, afin de contrôler nos observations. Le SIL-IFX étant digéré et analysé en même temps que l'infiximab, ses peptides peuvent être suivis simultanément. Il est possible de suivre les signaux correspondants aux peptides LC01 et HC12 du SIL-IFX, présentant un incrément de 10 Da par rapport à ceux de l'infiximab (Table 4.1). La notation avec un astérisque (*) a été utilisée pour distinguer le SIL-IFX de l'IFX.

Table 4.1. Peptides choisis pour le suivi quantitatif de l'infiximab dans le sérum humain. Ions m/z des peptides chargés deux et trois fois en ESI

<i>mAb</i>	<i>Peptide</i>	<i>Nom</i>	<i>Utilisé en tant que</i>	<i>m/z pour [M+2H]²⁺</i>	<i>m/z pour [M+3H]³⁺</i>
Infiximab (IFX)	DILLTQSPAILS \underline{V} SPGER	IFX _{LC01}	<i>Quantif</i>	948,525	632,686
	TEDTGVVYY \underline{C} SR	IFX _{HC12}	<i>Qualif</i>	647.275	431.852
SIL-IFX	DILLTQSPAILS \underline{V} SPGER*	IFX* _{LC01}	<i>Etalon</i>	953,525	636,019
	TEDTGVVYY \underline{C} SR*	IFX* _{HC12}	<i>Etalon</i>	652.275	435.185

4.2. Caractérisation structurale : Sélection des sites de PTM

Conjointement à la quantification de l'anticorps, la méthode analytique cherche à caractériser, identifier et estimer le taux de modification de certains sites de PTM de l'infiximab. Le couplage CE-MS/MS peut être utilisé à ces fins, si tant est que plusieurs aspects soient respectés :

- Le **recouvrement de séquence** doit permettre de détecter convenablement les peptides ;
- Si la PTM induit une faible différence de masse ($\Delta m < 2$ Da), le profil isotopique du peptide comportant cette PTM aura un recouvrement avec celui du peptide non modifié. Il faut alors que la technique **de séparation** en amont de la MS soit capable de séparer les deux formes peptidiques afin de les distinguer. Cet aspect concerne donc particulièrement les *deaN* ou *isoD*, notamment lorsqu'ils sont fragmentés en CID (d'autres techniques de fragmentation comme l'ETD (*Electron Transfert Dissociation*) ont permis de distinguer des *isoD* [191]) ;
- Les signaux MS du peptide précurseur et de son homologue avec une PTM doivent être suffisamment intenses pour les distinguer du bruit de fond. Les PTM étant généralement de faible abondance, il faut alors une bonne **sensibilité** de la méthode pour les distinguer. De manière à s'assurer de la quantification relative de certaines PTM, il a fallu les identifier par MS et MS/MS, ce qui nécessite un signal MS de l'ion précurseur suffisant pour une stratégie Top20 DDA ($> 10^4$).

L'analyse CE-MS/MS d'un digest peptidique de l'infiximab en formulation, a pu être établie selon l'approche développée précédemment dans notre groupe [140]. Le logiciel Biotools® identifie 80 % de recouvrement de séquence en MS et 76 % en MS/MS pour de l'infiximab à 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les 20 % non observables sont dus à des peptides obtenus par digestion tryptique particulièrement

gros, dont l'ionisation est difficile et dont les m/z dépassent les limites du quadripôle. Parmi ces peptides, on retrouve un peptide de 46 acides aminés localisé sur la chaîne légère de l'anticorps (LC07) et un autre peptide composé de 58 acides aminés situé sur la chaîne lourde (HC16), dont le suivi des PTM ne peut pas être effectué.

Parmi les autres peptides de l'inflximab, nous avons sélectionné ceux présentant différents sites propices aux PTM. Il s'agit d'oxydations de méthionine (*oxiM*), de déamidations d'asparagines (*deaN*), d'isomérisations d'acides aspartiques (*isoD*) et de la N-glycosylation d'inflximab. Ces quatre types de modifications sont connus pour se produire lors de la production ou du stockage des anticorps thérapeutiques. Des études ont également montré qu'elles peuvent être responsables d'un changement de l'activité biologique de l'anticorps.

Concernant le choix de la localisation de ces PTM, c'est-à-dire les acides aminés étudiés, il s'est porté sur les acides aminés définis comme étant des *hotspots*, rapportés dans la littérature [192]. Les *hotspots* sont définis au vu de leur fréquence d'apparition ou de leur localisation. Les principaux *hotspots* de l'inflximab suivis dans le cadre de ce projet sont présentés sur la Figure 4.2. Certains sont situés sur sa partie variable, qui est sollicitée lors d'une interaction antigène-anticorps, avec notamment l'asparagine N⁵⁷ se trouvant dans la région CDR. D'autres sites suivis, tels que N³⁰⁰, D²⁸³ et M²⁵⁵, se situent sur la partie F_c au niveau de la jonction CH2-CH3, requise lors de la reconnaissance du mAb à divers récepteurs (F_cRn, F_cγRs).

À noter que les localisations des *hotspots* de l'inflximab sont connues. Par exemple, il est établi que c'est l'asparagine N³⁰⁰ qui porte la glycosylation du mAb. L'objectif ne fut pas de localiser les sites de PTM de l'anticorps, mais de quantifier leur proportion. Il a donc fallu dans un premier temps assurer la capacité de la méthode analytique à identifier et quantifier la proportion de certaines PTM de l'inflximab, connues pour présenter un niveau significatif (> 1 %). Pisupati *et al.*(2017) [193] ont décrit des niveaux de modifications de certaines *oxiM* et *deaN hotspots*, après analyse LC-MS/MS de l'inflximab pur (dans sa formulation) directement digéré sans stress préalable, dont les valeurs sont présentées sur la Figure 4.2.

Le défi analytique de la méthode CE-MS/MS mise en place est notamment la caractérisation de différents acides aminés simultanément (en une seule analyse). Les méthodes analytiques menant à plusieurs informations conjointement permettent de limiter les erreurs associées aux manipulations successives. Ainsi, les corrélations entre plusieurs informations sont d'autant plus fiables si elles sont obtenues après une seule même préparation. En particulier, l'étude des PTM, peut s'avérer difficile au vu des réactions spontanées pouvant se produire lors de la manipulation

d'échantillon, de son stockage, ou de son analyse. Par conséquent, si plusieurs PTM doivent être suivies et comparées, il est préférable de sélectionner une stratégie analytique permettant leur caractérisation simultanée. C'est pour cette raison que l'électrophorèse capillaire a été choisie en tant que technique séparative, puisqu'elle repose sur une séparation dépendante de la charge et du rayon hydrodynamique. Ainsi, les PTM induisant des différences de charges, telle que la *deaN*, et celles entraînant un changement conformationnel (glycosylations, *isoD*), peuvent être séparées par cette stratégie. De plus, le couplage MS permet d'ajouter une autre dimension à la discrimination des espèces : leur masse. Cela est bénéfique pour les *oxyM* et les glycanes que l'on cherche à identifier ne se séparant que partiellement en CE. Les peptides issus du SIL-IFX, pourront être identifiés par cette dimension massique, et non confondus à ceux de l'infliximab.

Peptides tryptiques

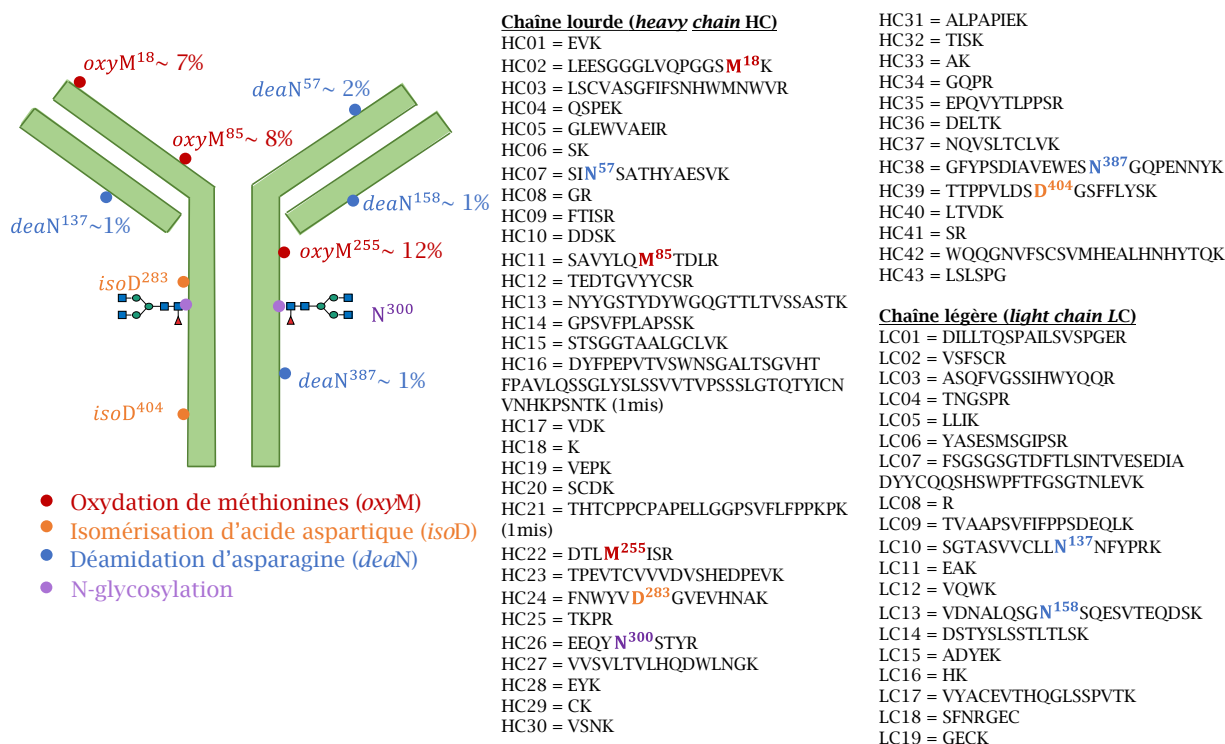


Figure 4.2. Représentation schématique de l'infliximab et localisation des hotspots sélectionnés pour le suivi structural de l'infliximab post-administration. Les % représentés à côté de certains acides aminés, correspondent aux proportions de PTM observées par Pisupati et al. (2017) de l'infliximab pur [193]. La localisation sur les peptides tryptiques des acides aminés suivis est présentée à droite.

CHAPITRE 5.

DEVELOPPEMENT DE LA METHODE DE PURIFICATION

Préambule

Les précédents travaux réalisés au laboratoire LSMIS ont établi des protocoles de digestion tryptique et d'analyse CE-MS/MS d'anticorps monoclonaux purs, préparés dans leur formulation, pour leur caractérisation structurale (étude de niveau de certaines PTM). Ces travaux ont démontré la capacité de l'analyse CE-MS/MS pour la caractérisation de multiples PTM simultanément.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, il a été nécessaire d'établir un protocole d'extraction de l'inflximab de la matrice sérique, afin de se placer dans des conditions de digest peptidique purifié des autres protéines plasmatiques. Cette extraction sérique est basée sur une purification par affinité, utilisant des billes ferromagnétiques fonctionnalisées avec l'antigène de l'inflximab, le TNF- α . Ce chapitre présente les différents protocoles ayant été considérés pour la mise en œuvre de cette purification. Les critères d'une purification adéquate se sont basés sur les objectifs de la méthode analytique, à savoir :

- **La limite de quantification obtenue (LOQ).** Cette valeur, dépendante de la sensibilité de la méthode analytique, fut comparée selon les différentes approches afin de proposer une stratégie quantitative qui soit compétitive avec les méthodes ELISA existantes. Nous avons cherché à maintenir une LOQ égale ou inférieure à $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cet aspect a été évalué par suivi des ions m/z des peptides signatures de la quantification de l'inflximab.

- Le deuxième critère qui a été considéré est l'influence du protocole de purification sur la **détermination de certaines PTM**. Les PTM pouvant être présentes en très faible abondance, il a fallu limiter les interférents pouvant impacter leur détection. En outre, la CE est une méthode séparative extrêmement dépendante de la force ionique de l'échantillon injecté. Ainsi, les effets de matrice peuvent limiter la séparation des analytes. La résolution des PTM de faibles différences de masse avec leur homologue non modifié a donc été déterminée selon les protocoles envisagés. Il s'agit essentiellement des peptides présentant une *deaN*, *isoD* ou *oxiM*, décrits dans le chapitre 4, qui ont permis de positionner les approches de purification sur la caractérisation des PTM de l'inflximab.

Les travaux de ce chapitre font l'objet d'un article en anglais en cours de finalisation. Cet article présente donc la mise en place d'un protocole d'extraction, suivi d'une digestion tryptique et d'une analyse CE-MS/MS. Ce protocole de purification-digestion-analyse a par la suite été implémenté tout au long des travaux de cette thèse.

Enhancing affinity purification of monoclonal antibodies from human serum for subsequent CE-MS analysis

Tessa Reinert, Pascal Houzé, Yannis-Nicolas Francois, Rabah Gahoual

Publication in preparation

Abstract :

Due to the separation technique employed, capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS) analysis performances are significantly influenced by the chemical composition and the complexity of the sample. In various applications, that impact has prevented the use of CE-MS for the characterization and quantification of proteins in biological samples. Here we present the development and evaluation and a sample preparation procedure, based on affinity purification, for the specific extraction of the monoclonal antibody (mAbs) infliximab from human serum in order to perform subsequent proteolytic digestion and CE-MS/MS analysis. Three distinctive sample preparation strategies were envisaged. In each case, the different steps composing the protocol were thoroughly optimized and evaluated in order to provide a sample preparation addressing the important complexity of serums samples while providing an optimal compatibility with CE-MS/MS analysis. The different sample preparation strategies were assessed concerning the possibility to achieve an appropriate absolute quantification of the mAbs using CE-MS/MS for samples mimicking patient serum samples. Also, the possibility to perform the characterization of several types of post-translational modifications (PTMs) was evaluated. The sample preparation protocols allowed the quantification of the mAbs in serums samples for concentration as low as $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (2.03 nM) using CE-MS/MS analysis, also the possibility to characterize and estimate the modification level of PTMs hotspots in a consistent manner. Results allowed to attribute the effect on the electrophoretic separation of the different steps composing sample preparation. Finally, they demonstrated that sample preparation for CE-MS/MS analysis could benefit greatly for the extended applicability of this type of analysis for complex biological matrices.

5.1. Introduction

Since their introduction in the late 1980s, monoclonal antibodies (mAbs) have experienced increasing success in the treatment of various diseases, leading to their advent in the mid-2000s [99,194]. The appeal of therapeutic mAbs can be explained by their favorable pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. In addition, their ability to target a specific epitope corresponding to the antigen represents a crucial asset for the development of this type of biomolecule for therapeutic application. Last year alone, 12 mAb-based therapeutics were approved, and 140 are currently in clinical trials, including several for the treatment of SARS-CoV-2 [97,98,195]. Because of their structural complexity and use as biopharmaceuticals, mAbs have required the development of dedicated analytical methods to provide a comprehensive structural characterization of the product. However, almost all analytical developments described in the literature have focused on the characterization of mAbs in the context of their production,

whereas methods for the analysis of mAbs in biological samples remain scarce [196,197]. Therefore, it appears essential to develop novel analytical strategies to study the outcomes of mAb after administration to patients. Bottom-up peptide-centric analysis represents a relevant methodology that offers the possibility of using mass spectrometry (MS) to obtain quantification in addition to the characterization of protein primary structure, including post-translational modifications (PTM) [116,130,198].

Currently, almost all mAb products are administered by parenteral injection into the patient's bloodstream; therefore, mAbs are present in the serum. Human serum represents an extremely complex matrix composed of a wide variety of proteins, such as albumin and immunoglobulin (IgG) [199]. The presence of a large number of proteins can interfere with the mass spectrometry (MS) analysis of mAbs, particularly because of the large difference in concentration between serum proteins and administered mAbs. Consequently, the analysis of a specific protein present in a biological sample requires proper sample preparation to remove other proteins and salts that would otherwise hamper MS analysis. Sample purification can improve the reproducibility of the method and significantly reduce interferences to increase sensitivity, particularly by removing albumin, which accounts for approximately 50 % of the total serum protein [200]. Various purification techniques, such as pellet digestion or protein precipitation, can be used to remove albumin from serum samples. However, their lack of specificity is a limitation for mAb isolation, as a large fraction of serum proteins are IgG. An alternative method to enhance the specificity of sample preparation is affinity purification [201]. This type of extraction is emerging for mAb analysis, but its implementation requires a particularly demanding setup and optimization [175,202].

Capillary zone electrophoresis hyphenated to tandem mass spectrometry (CZE-MS/MS) has been shown to be particularly suitable for the separation and characterization of peptide mixtures [141,154]. Indeed, the electrokinetic separation provided by CZE allows the separation of a large number of peptides in the same experiment based on their chemical nature. In addition, the mobility mechanism of CZE enabled baseline separation of peptides exhibiting faint PTM from their unmodified counterparts. For instance, the systematic separation of modified peptides carrying asparagine deamidation and/or aspartate isomerization could be demonstrated regardless of the peptide sequence, even though they imply a mass shift of + 0.98 Da and no mass difference, respectively. This feature is a powerful asset of CE, as a lack of separation prior to MS analysis would result in overlapping isotopic profiles of peptides, preventing clear identification [21]. The diversification of CE-MS applications has also been supported by technical improvements in coupling interfaces, which have enhanced sensitivity [203–205]. As a result, CZE-MS has been found to be particularly relevant for the characterization of biomolecules [108,139,206]. CE separation is particularly sensitive to sample composition due to the limited capillary volume

available and the phenomenon of electrophoresis. Samples may exhibit significant electrical conductivities relative to the background electrolyte (BGE) due to the presence of high concentrations of salts and/or organic solvents. Therefore, the sample composition can disrupt the homogeneity of the electric field, resulting in reduced separation efficiency and compromised reproducibility. To characterize and quantify mAbs in biological samples using CZE-MS/MS, it is necessary to develop a sample preparation method that allows relevant affinity extraction and purification of proteins to ensure optimal compatibility with CZE electrophoretic separation.

In the present work, we describe the development of a selective purification method adapted for the analysis of the active fraction of infliximab (IFX) in human serum using CZE-MS/MS analysis. IFX is a chimeric mAb targeting tumor necrosis factor (TNF- α), which is used as a therapeutic treatment mainly for Crohn's disease and rheumatoid arthritis [207,208]. The affinity purification of IFX was based on the implementation of ferromagnetic beads incorporating immobilized TNF- α , which were prepared in-house. Consequently, isolated IFX was released and subjected to trypsin digestion, followed by bottom-up analysis using CE-MS instrumentation. Different strategies were compared regarding IFX release from functionalized beads and buffer exchange to perform proteolytic digestion and CZE separation. The sequential steps of the different sample preparation protocols were systematically investigated to determine their impact on the extraction yield, IFX recovery, and the ability to maintain optimal efficiency of CZE separation.

5.2. Materials and methods

- **Chemicals.** The chemicals used were of high-purity grade and purchased from Merck Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) unless stated otherwise. The water used to prepare the buffers and sample solutions was obtained using an ELGA Purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). Infliximab (IFX) samples were EMA/FDA-approved formulations (Remicade®) purchased from the manufacturer (Merck Sharp and Dohme). Stable-isotope-labeled infliximab (SIL-IFX) internal standard was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). RapiGest SF surfactant was purchased from Waters (Milford, MA). Streptavidin M-280 Dynabeads™ were obtained from Fisher Scientific Invitrogen (Carlsbad, CA) and biotinylated TNF- α from Biotechne (Rennes, France). Sequencing grade modified Trypsin was purchased from Promega (Madison, WI, USA). (PBS) tablets used for reconstitution in water were purchased from Gibco Fisher. Blank sera extracted and purified from the total blood were provided by the French Institution of Blood (Paris, France).

- **Reference and serum samples.** IFX stock solutions at a concentration of $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ were prepared after reconstitution in Milli-Q H_2O and directly stored at -20°C until use. Two kinds of samples were prepared : IFX spiked references samples and IFX spiked serum standard.

The reference samples were prepared by introducing IFX stock solution to ammonium bicarbonate buffer (50 mM, pH 8) to a final volume of 100 μL and concentration of $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

The standard serum samples were prepared by introducing IFX stock solution to model blank serum (initially free of IFX) to a final volume of 100 μL and concentration of $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

- **Affinity Purification of IFX from serum samples.** The standard serum samples were purified to specifically extract IFX. First, 217 μL of streptavidin M-280 DynabeadsTM ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was incubated with biotinylated TNF- α (148 μL , $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS) at room temperature for 1 hour. Excess biotinylated TNF- α was removed by three consecutive washing steps using 500 μL PBS solution. Subsequently, the 100 μL standard serum sample were added to the TNF- α -functionalized beads. The mixture was incubated at RT for 1 hour under mild agitation. Then the serum was removed, and the magnetic beads were washed twice using 500 μL of PBS.

- **IFX release from the magnetic beads and buffer exchange.**

- A. *Acidic dissociation followed by membrane filtration*

The citrate buffer (pH 3.0) was prepared by mixing 70 μL of sodium citrate dihydrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) 100 mM with 930 μL of citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 109 mM. After washing with PBS, IFX captured on the TNF- α magnetic beads were dissociated by the addition of 50 μL citrate buffer. The mixture was left at RT for 10 min, and the supernatant was collected. Another 50 μL of citrate buffer was added to the magnetic beads and incubated at RT for 10 min, followed by supernatant collection. The supernatants were pooled, and the pH of the solution was neutralized by the addition of NaOH 1M. Consequently, buffer exchange was performed using an Amicon[©] centrifugal membrane filter provided by Merck Millipore (Molsheim, France). The filter was conditioned with 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.0). The sample was then subjected to 2 consecutive centrifugation cycles. For each centrifugation cycle, the filter was filled with 50 mM ammonium bicarbonate, and centrifugation was performed for 10 min using an Eppendorf 5424[®] centrifuge system. Finally, the sample was collected in a new tube and adjusted to a final volume of 70 μL using the ammonium bicarbonate buffer.

- B. *Organic solvent dissociation followed by evaporation*

IFX dissociation from TNF- α magnetic beads was alternatively achieved by addition of 50 μL of MeOH/ H_2O /FA: 48.5/48.5/3 (v/v/v) solution to the sample, which was left at 20°C for 10 min. The supernatant was collected, and the operation was repeated once. Both supernatants were then

pooled and dried for 2h using a miVac DNA concentrator system (Genevac, NY, USA) at a temperature of 35°C. The samples were finally reconstituted with 70 µL of 50 mM ammonium bicarbonate.

▪ **Proteolytic digestion of the IgG samples.** The IFX samples (references or after purification of serums) are all in ammonium bicarbonate 50 mM, pH 8. Prior to sample digestion, 4 µL of SIL-IFX stock solution at a concentration of 0.25 µg·µL⁻¹ was added to all IFX samples.

Proteolytic digestion of IFX and SIL-IFX obtained by affinity purification from serum samples was achieved following a workflow derived from a commonly used protocol for the digestion of mAbs in solution into peptides [119]. Briefly, mAbs were denatured using 5 µL of RapiGest SF™ 0.1% and incubated at 80°C for 10 min. After cooling to RT (Room Temperature), 10 µL of 50 mM dithiothreitol were added to the mixture, and the sample was incubated at 80°C for 20 min. Then, 10 µL of 50 mM iodoacetamide was added, and the sample was incubated at RT in the dark for 20 min. 1 µL of trypsin at 0.25 µg·µL⁻¹ was added to the sample and left at RT for 2h. Trypsin (1 µL) was again added, and the sample was incubated at 37°C overnight. Next, 1 µL FA (98 %) was added. The peptide digests were dried. Finally, the sample was reconstituted in 5 µL 100 mM ammonium acetate at pH4.

▪ **Capillary zone electrophoresis – tandem mass spectrometry for peptide analysis.** Analysis of the IFX peptide digests was performed on a CESI8000® Capillary Electrophoresis system (Sciex separations, Darmstadt, Germany) coupled by the intermediate of a sheathless CE-ESI-MS interface to a Sciex TripleTOF 5600 mass spectrometer (Darmstadt, Germany) operated by Analyst® software (Sciex, Darmstadt, Germany). The separation was performed using a homemade bare-fused silica capillary (total length 100 cm; 30 µm i.d.) having a characteristic porous tip of 2 cm on the outlet end positioned inside the ESI source, and a second capillary (total length 80 cm; 50 µm i.d.) filled during the experiments with background electrolyte (BGE), consisting of 10 % acetic acid to maintain electrical connectivity between CE electrodes. 68 nL of peptide digest was injected hydrodynamically, and a 23 kV electric field was applied, leading peptides to migrate toward the ESI source. ESI source parameters were set as follows: ESI voltage -1.5 kV while gas supplies (GS1 and GS2) were deactivated, source heating temperature 100 °C, and curtain gas value 2. Experiments were performed in Top20 information-dependent acquisition (IDA, Sciex), and accumulation time was 250 ms for MS scans and 100 ms for MS/MS scans, leading to a total duty cycle of 1.9 s. The mass/charge (*m/z*) range was 100–2000 in MS and 50–2000 in MS/MS. Data were obtained as .wiff and the ratio of IFX over its internal standard SIL-IFX was calculated using Skyline software developed by the University of Washington (Seattle, WA, USA) [209].

▪ **Parameters studied to assess eligible IFX purification.**

A. *Process Efficiency*

The efficiency of the sample preparation workflow was estimated for each protocol using equation (5.1). It corresponded to the complete recovery of IFX, from its extraction by affinity beads prior to digestion (Figure 5.1). Briefly, the infliximab (IFX) mass spectrometry signal was monitored by the intermediate of the peptide IFX_{LC01} (sequence DILLTQSPAILSVPGER) which was beforehand selected because it was specific to IFX and had the highest ionization efficiency. The same peptide was considered for SIL-IFX, however, including (¹³C₆; ¹⁵N₄) labeling for the arginine residue, and referred to as IFX*_{LC01}. The *m/z* ions of the twice charged peptides (*m/z* : 948,525 for IFX_{LC01}, and *m/z* : 953,525 for IFX*_{LC01}) were monitored and systematically identified using MS/MS spectra from the characterization of *y* and *b*-ions corresponding to CID fragmentation of the peptide (Table 5.S1). The integration of these ions with time enabled us to define the ratio of IFX_{LC01} over IFX*_{LC01}. To estimate the process efficiency of a workflow, this ratio was calculated for a serum standard sample and for a reference sample (no serum matrix).

$$\text{Process Efficiency (\%)} = 100 \frac{\left(\frac{\text{Area IFX}}{\text{Area SIL-IFX}} \right)_{\text{serum}}}{\left(\frac{\text{Area IFX}}{\text{Area SIL-IFX}} \right)_{\text{reference}}} \quad (5.1)$$

Where *Area*_{IFX} and *Area*_{SIL-IFX} represent the peak areas corresponding to IFX_{LC01} and IFX*_{LC01}.

Further considerations of the performance of individual steps of IFX purification were performed by calculating the extraction recovery yield or filtration recovery yield (Figure 5.1).

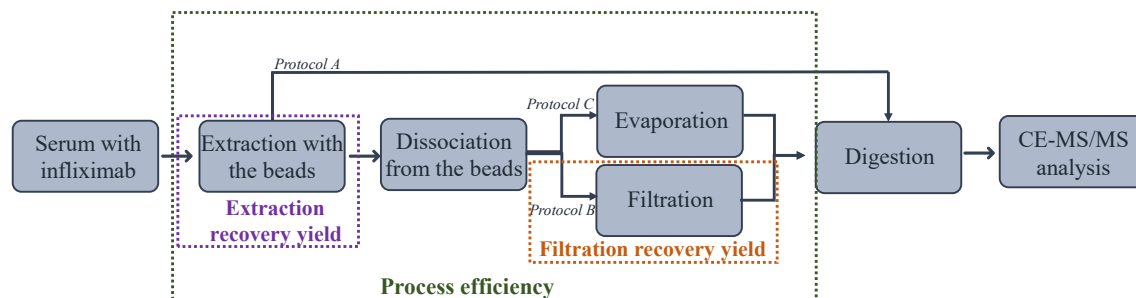


Figure 5.1: Representation of the different parameters considered to evaluate the protocols of sample preparation prior CE-MS/MS analysis of peptide digest of infliximab on the analytical workflow.

B. *Limit of Detection and Quantification*

The LOD and LOQ were calculated by monitoring the IFX_{LC01} peptide signal. The LOD and LOQ were assessed when intensity of signal/noise (S/N) reached 3 and 10 respectively.

C. Electrophoretic resolution

The impact of the workflow on the electrophoretic separation was evaluated through the determination of the resolution between unmodified peptides and the same ones presenting a deamidation (*deaN*) or isomerization (*isoD*). The m/z ions of twice charged peptides with or without a *deaN* or *isoD* were extracted and monitored. The resolution was calculated as follows

$$\text{Resolution} = \frac{(MT_2 - MT_1)}{\omega_1 + \omega_2} \times 2 \quad (5.2)$$

With MT_1 and MT_2 corresponding to the migration times of the unmodified peptide and modified one, and ω_1 and ω_2 the width of their signals.

- **Size exclusion chromatography – multi-angle light scattering analysis.** Size exclusion liquid chromatography analyses were performed using a Prominence HPLC system equipped with a SIL-10A UV absorbance detector, a RID-20A refractive index detector (Shimadzu, Marne-la-Vallée, France) and a miniDAWN Treos II multi-angle light scattering (MALS) detector acquired from Wyatt Technology (Santa Barbara, USA). Two distinctive softwares were used to pilot the SEC-UV-MALS-RI instrument: LC Solution (Shimadzu corporation) for the HPLC-UV-RI part and Astra version v7.2 (Wyatt technology, Santa Barbara, USA) for the MALS detector. SEC separations were realized using a Biozen SEC3 column (300×4.6 mm; 1.8 μm) provided by Phenomenex (Le Pecq, France) using a mobile phase constituted of 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) and 300 mM NaCl. Flow rate was 200 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and injection volume was 20 μL . UV detection was performed at a wavelength of 280 nm. MALS detector was equipped with a 658 nm laser, and measurements were performed simultaneously at 3 different angles (49°, 90° and 131°). IFX at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in H_2O milliQ or in 50 mM citrate buffer was injected for the analyses.

- **Dynamic light scattering analysis.** Dynamic light scattering (DLS) analysis was performed on a Zetasizer (Malvern Panalytical, Malvern, UK), using 2 angles (13° and 173°) monitored by the Zetasizer software. 400 μL of sample was analyzed. Measurements were realized at a temperature of 25°C in triplicate. IFX at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in H_2O milli-Q or in 50 mM citrate buffer was injected for the analyses.

5.3. Results and discussion

The reported therapeutic range for IFX (infliximab) indicates that serum concentrations after administration should fall within the range of 1 to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Affinity purification is necessary to isolate low concentrations of IFX from a complex mixture composed of 1-5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

of a wide variety of natural IgGs [210]. Consequently, a peptide-centric analytical strategy, derived from bottom-up proteomic analysis, was adopted, as it maintains optimal sensitivity, especially considering the low-level quantification targeted.

In addition, it allowed the simultaneous characterization of the primary structure of IFX with respect to the occurrence of PTMs. Thus, tryptic digestion of purified IFX was performed as the final sample preparation step prior to CE-MS/MS analysis. Different sample preparation methods were applied to the preparation of IFX-spiked serum to evaluate the impact of various approaches regarding MS signal intensity, signal-to-noise ratio, extraction yield, in addition to PTM identification and modification level estimation. The goal was to determine the most appropriate conditions to maximize the efficiency of the process to achieve optimal sensitivity while maintaining the selectivity and efficiency of the electrophoretic separation. Concerning asparagine deamidation (*deaN*) and aspartate isomerization (*isoD*), separation is mandatory for adequate identification, as they will show isotopic overlap with their unmodified counterparts in MS. Therefore, the peptide resolution was evaluated for each protocol. For analyte pre-concentration in CE, the transient isotachopheresis mode was performed, using ammonium acetate 100 mM as the leading electrolyte and acetic acid as the background electrolyte (BGE) [143]. Under these conditions, the migration time of the peptides depends on the duration of the ITP, which in turn depends on the conductivity difference between the two electrolytes. For the same CE conditions (applied voltage, leading electrolyte, and injection volume), the resolution between identical peptides should be similar. We evaluated whether the different sample preparation methods proposed here slightly modified the ionic strength or conductivity of the sample, thus affecting the resolution between the PTM.

To support the analysis of IFX in human serum by CE-MS/MS, different sample preparation methods, shown in Figure 5.2, were investigated. In the workflow referred to as protocol A, the extracted IFX was not released from the magnetic beads, and therefore proteolytic digestion was performed *in situ*, while still immobilized on the affinity purification media. This approach has the advantage of reducing the number of sequential sample preparation steps and of easily placing the beads in a buffer compatible with digestion. In the other two workflows, IFX was removed from the purification beads prior to digestion by acid dissociation followed by buffer exchange through membrane filtration in the case of protocol B or by solvent evaporation for protocol C (Figure 5.2). Release of extracted IFX from the beads could potentially facilitate trypsin access to the mAbs, which could be beneficial for maximizing digestion yield. However, for both protocols, the solutions used to dissociate the IFX-immobilized/TNF- α interaction had to be removed because of their incompatibility with trypsin digestion.

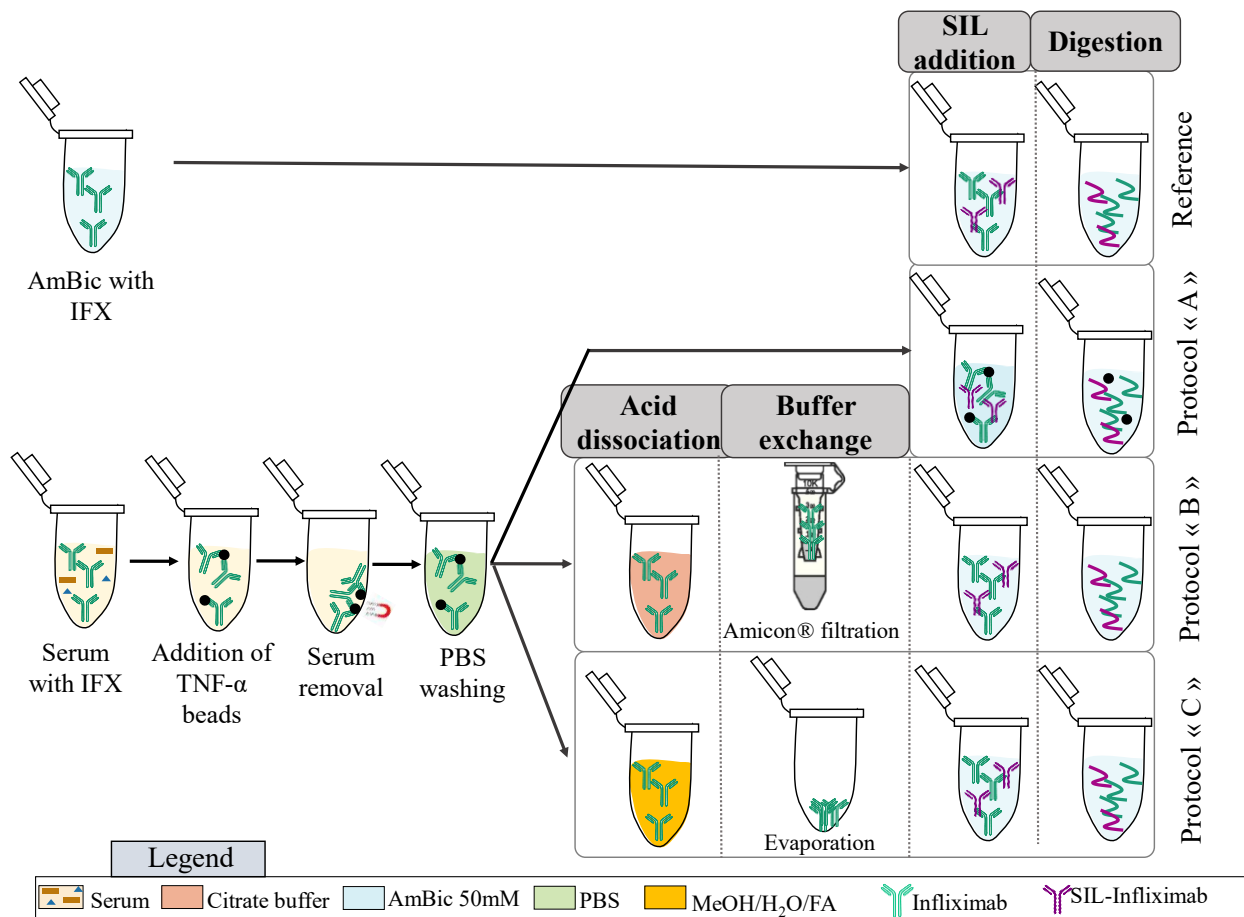


Figure 5.2. Sample preparation workflows considered for IFX quantification and characterization in serum using CE-MS/MS analysis include direct digestion of IFX immobilized on beads (protocol A), acidic dissociation followed by centrifugal membrane filtration (protocol B) or organic solvent dissociation and solvent evaporation (protocol C). The SIL-IFX internal standard was added before digestion to provide CE-MS/MS signal normalization. Reference samples consisted of H₂O solutions spiked with IFX and SIL-IFX.

5.3.1. Direct digestion of mAbs immobilized on beads (Protocol A)

▪ Quantification

The IFX-spiked serums were subjected to affinity purification using TNF- α -functionalized magnetic beads. Then the beads were transferred to ammonium bicarbonate for digestion (Figure 5.2). The process efficiency of this sample preparation procedure was determined at $62 \pm 17 \%$ (see material and method).

CE-MS/MS data also allowed the estimation of a LOQ of $1.2 \pm 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and a LOD of $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, using the thresholds of $S/N > 10$ and 3, respectively (Table 5.1). Therefore, the method should be acceptable for the quantification of IFX in most patient serum samples (typically between $0.5\text{-}25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Table 5.1. Comparison of the three strategies on their process efficiency, their repeatability, their detection, and quantification limits, and their PTM visibility for spiked serum with Infliximab at ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

	Protocol A	Protocol B	Protocol C
Process efficiency	$62 \pm 17 \%$	$19 \pm 22 \%$	$58 \pm 24 \%$
LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.8	0.1 ± 0.02
LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.2 ± 0.6	2.8 ± 2.5	0.2 ± 0.1

In addition, the recovery yield of bead-based IFX extraction from serum was evaluated by quantifying residual IFX using a commercial ELISA assay. Indeed, the residual IFX in the post-extraction "waste" was quantified after extraction in serum at different initial concentrations of IFX (Figure 5.S1). The ELISA assays showed almost complete extraction of IFX from serum at lower concentrations ($> 95\%$). However, remaining IFX levels were significant for serums spiked at $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicating a lower extraction yield at the highest level of concentration ($80 \pm 5 \%$). The decrease in IFX extraction yield was attributed to the capacity of the TNF- α immobilized on the ferromagnetic beads reaching its limit. Similar effects were observed for the other protocols because the affinity extraction conditions were the same (Figure 5.2). This effect should not affect the performance of the absolute quantification because of the incorporation of the SIL-IFX internal standard and because the IFX concentration allows a satisfactory MS signal sensitivity at higher concentrations.

- **PTM characterization**

CE-MS/MS data were investigated to characterize PTM hotspots concomitantly with IFX quantification. The results demonstrated the possibility of using the developed analytical strategy to characterize asparagine deamidation (*deaN*), methionine oxidation (*oxiM*), and aspartate isomerization (*isoD*). As compiled in Table 5.2, the intensity of the MS signal corresponding to the intact peptide and its modified counterpart can be used to independently determine the level of modification for different PTMs. However, the analysis of IFX from protocol A resulted in a non-systematic characterization of the PTM level for each replicate considered (Table 5.2). Figure 5.3 illustrates the electrophoretic separation observed for an IFX-specific peptide described to potentially exhibit an asparagine modification (*deaN*⁵⁷). Indeed, the asparagine located on the amino acid sequence SINSATHYAESVK is normally deamidated at 10 % and is interesting to monitor because of its CDR position [211]. For the reference product corresponding to IFX submitted only to the digestion process (Figure 5.3, A), the electropherograms showed the good separation of both peptide forms, highlighting the capacity of CZE conditions to achieve baseline separation due to the presence of the modification. In contrast, in serum samples containing IFX prepared using protocol A (Figure 5.3, B), the peptides showed partial co-migration with other analytes presenting the same *m/z*. The presence of interfering compounds can induce ion

competition in the electrospray ionization source, preventing the detection of lowly abundant ions. In addition, several PTMs were difficult to quantify after protocol A, due to a significant background signal. Protocol A involved the proteolytic digestion realized directly on the ferromagnetic beads (Figure 5.2). Therefore, digests not only contained peptides originating from the mAb of interest, but also from TNF- α and streptavidin immobilized on the surface of the beads. CZE-MS/MS electropherograms of samples obtained using protocol A showed 20 and 75-fold greater signal intensities for peptides corresponding to TNF- α and streptavidin, respectively, compared to the other protocols. Thus, this observation was also advocating for the existence of ion competition effect, which significantly hinders CE-MS/MS analysis due to the sample preparation protocol. Nevertheless, it is important to note for peptides that CE-MS/MS analysis was not impacted by the presence of concomitant interferences, the modification levels obtained were similar to the reference samples, emphasizing that the extraction protocol does not induce artifactual PTMs.

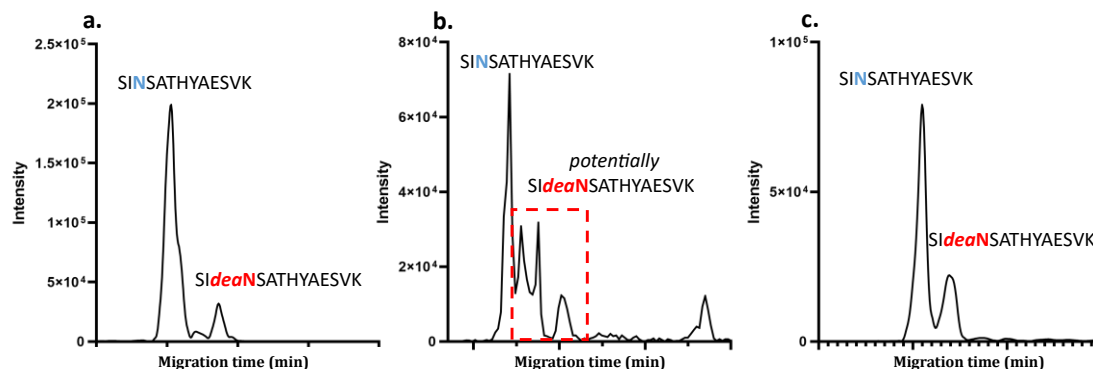


Figure 5.3. Extracted Ion Electropherogram (EIE) of the m/z corresponding to peptide SINSATHYAESVK ($m/z = 703.85; 2+$) for **a.** digestion of IFX marketed formulation without prior extraction (reference); **b.** direct digestion of IFX immobilized on beads (protocol A) and **c.** Extraction of IFX using $H_2O/MeOH$ dissociation and buffer exchange (protocol C) from spiked serum samples.

The resolution between the peptide forms for *deaN* and *isoD* was investigated as an indicator of separation efficiency (Table 5.2). Results showed that protocol A provided a resolution systematically superior to 1.1 for the considered PTMs. However, high values of standard deviations could be observed, which was explained by the poor repeatability of the transient isotachopheresis (t-ITP) preconcentration step performed at the beginning of the CZE-MS/MS analysis. The variability regarding t-ITP was the consequence of significant differences in ionic strength among the replicates which impacted the conductivity of the leading electrolyte (LE) composing the sample, resulting in a lower apparent mobility of the LE (Figure 5.S2). Thus, the application of protocol A may not completely remove ions from the treated serum or the washing buffer solution. The application of t-ITP generates a stacking effect of the sample content because of mobility differences between the BGE and the LE. For that reason, samples which contained a

LE demonstrating a higher apparent mobility provided a more efficient t-ITP pre-concentration. In addition, as mentioned previously, the digestion generated significantly more complex samples due to the presence of TNF- α and streptavidin in important quantities. That complexity influenced the ionic strength of the sample and contributed to the variability of t-ITP pre-concentration.

Table 5.2. PTM observed, resolution between modified and unmodified counterparts, and percentage of modified peptides estimated according to the protocol of sample preparation ($n = 5$ for each protocol). The number of samples that succeeded in obtaining the level of PTM is presented in the row “repeatability of the separation” after 5 replicate samples. The other samples led to insufficient separation to collect this information. When none of the five replicates allows PTM characterization, the cells are noted as “HC” stands for Heavy Chain and “LC” for Light Chain.

		<i>dea</i> N ⁵⁷ (HC)	<i>dea</i> N ³⁸⁷ (HC)	<i>dea</i> N ¹³⁷ (LC)	<i>dea</i> N ¹⁵⁸ (LC)	<i>oxi</i> M ¹⁸ (HC)	<i>oxi</i> M ²⁵⁵ (HC)	<i>oxi</i> M ⁸⁵ (LC)	<i>iso</i> D ⁴⁰⁴ (HC)	<i>iso</i> D ²⁸³ (HC)
Reference	Modification level (%)	11 \pm 3 %	69 \pm 5 %	17 \pm 5 %	15 \pm 5 %	7 \pm 4 %	10 \pm 6 %	5 \pm 4 %	2 \pm 1 %	4 \pm 1 %
	Identification repeatability	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	Resolution between ions	1.8 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2	n.d.	n.d.	n.d.	1.2 \pm 0.3	1.4 \pm 0.2
Protocol A	Modification level (%)	21 \pm 14 %	62 \pm 8 %	13 \pm 4 %	15 \pm 4 %	12 \pm 3 %	n.d.	n.d.	3 \pm 4 %	3 \pm 1 %
	Identification repeatability	3/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	4/5	3/5	4/5
	Resolution between ions	1.6 \pm 0.7	1.3 \pm 0.6	1.1 \pm 0.3	1.7 \pm 0.5	n.d.	n.d.	n.d.	1.1 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3
Protocol B	Modification level (%)	15 \pm 8 %	71 \pm 16 %	26 \pm 12 %	20 \pm 3 %	10 \pm 4 %	9 \pm 4 %	9 \pm 5 %	5 \pm 5 %	4 \pm 2 %
	Identification repeatability	5/5	3/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5
	Resolution between ions	1.3 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4	0.8 \pm 0.3	1.4 \pm 0.5	n.d.	n.d.	n.d.	0.9 \pm 0.2	1.4 \pm 0.4
Protocol C	Modification level (%)	8 \pm 1 %	56 \pm 2 %	14 \pm 2 %	11 \pm 2 %	4 \pm 2 %	8 \pm 4 %	7 \pm 3 %	2 \pm 1 %	3 \pm 2 %
	Identification repeatability	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Resolution between ions	1.5 \pm 0.4	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.4 \pm 0.3	n.d.	n.d.	n.d.	1.0 \pm 0.1	4.4 \pm 0.4

The development and implementation of sample preparation of protocol A allowed for the successful isolation and digestion of IFX from serum samples. Consequently, CE-MS/MS experiments demonstrated the possibility, using the sample preparation, of achieving IFX absolute quantification in this type of biological matrix over a concentration range corresponding to the levels commonly observed in treated patients. From an experimental point of view, performing proteolytic digestion directly on the ferromagnetic beads represented an interesting alternative to

reduce the number of consecutive steps required to perform the protocol and limit analyte loss. However, on-beads digestion proved to generate peptide mixtures composed of high concentrations of interferent compounds and unstable ionic strength, which dramatically hindered the characterization of PTMs. Therefore, to prevent this ion competition risk and the presence of interference, one solution is to dissociate the analyte of interest from the beads and from all other proteins that compose them. Acid dissociation is known to be effective for separating mAbs from antigens [212]. The optimal pH for such an operation is around 3, which is not suitable for further tryptic digestion due to irreversible inhibition of the digestion enzyme. Buffer exchange was therefore mandatory prior to digestion. Two buffer exchange pathways were conducted and compared to estimate the best pathway for the subsequent CE-MS/MS analysis. The first step involved citrate dissociation and filtration (Protocol B, Figure 5.2). The second pathway tested was an organic dissociation and evaporation step (Protocol C, Figure 5.2).

5.3.2.a. Citrate dissociation and filtration buffer exchange (Protocol B)

Citrate dissociation (pH~3-4) is widely used for mAb elution because of its efficiency [213,214]. Its low pH and ionic strength allow dissociation of the interaction of mAbs with their antigens but may alter the conformation of biomolecules. Citrate is a low-volatile solvent, and a filtration procedure was used for the buffer exchange step with ammonium bicarbonate. The filtration step was optimized by changing specific parameters, such as the membrane cut-off size, first considering their effect on the recovery yield of intact IFX in water. After filtration optimization, an evaluation of its applicability and repeatability to intact IFX in citrate buffer was performed.

▪ **Filtration optimization in water buffer**

Four different filter cutoffs (100 kDa, 50 kDa, 10 kDa, and 3 kDa) were tested and the recovery yield of each filtration was calculated. The results show that the average recovery yield ranged from 0 % to 45 % depending on the filter used. The 100 kDa filter did not provide good recovery of the mAb introduced into the filter, as illustrated in Figure 5.4. This observation may be due to the relatively large porosity of the filter, which is not able to retain fully denatured mAbs. For the following experiments, a 10 kDa filter size was used, as it enabled maximum recovery yield. Centrifugation parameters, such as rotational speed and temperature, were also studied to obtain the best yield (Figure 5.S3). No significant difference was observed for the rotational speed at 20 000 rcf or 14 000 rcf. Nonetheless, better repeatability between replicates was noted for the lower speed, which may have limited the formation of aggregates. Two temperatures were used during centrifugation: 4°C or 20°C. The results did not show any preferential conditions; therefore, 20°C was chosen for subsequent measurements.

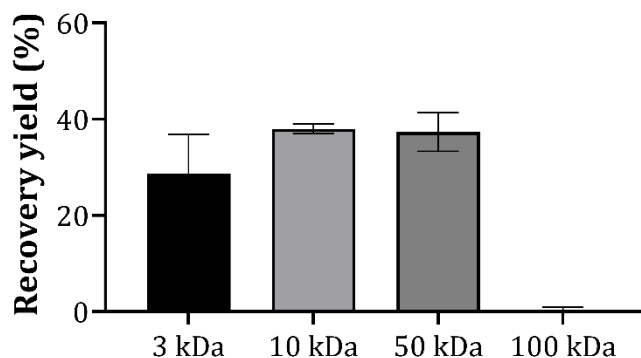


Figure 5.4. Filter size effect on the recovery yield of the filtration step. Error bars represent the standard deviation among triplicates.

▪ Filtration recovery in citrate buffer

The recovery yield of the filtration step is compared in Figure 5.5 for infliximab (IFX) initially diluted in H₂O MilliQ or in citrate buffer and shows a decrease in the second condition. The low pH of the buffer can alter the conformation of the mAb, potentially leading to protein denaturation and the formation of aggregates that are more susceptible to adsorption on the filter material [215]. Citrate has been described to induce greater aggregation than other acidic buffers [216]. Denaturation was studied using a DLS instrument. The size distribution by volume of IFX in water was found at 9.4 ± 0.4 nm whereas in citrate buffer, its size distribution was of 11.4 ± 0.5 nm. This shift is consistent with the aggregation theory.

SEC-UV-MALS-RI analysis was also performed for infliximab at $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ diluted in citrate buffer or in water. For IFX injected in water, the MALS detector determined a molar mass of 150 kDa, corresponding to the monomeric structure (Figure 5.S4). However, no elution was observed after the injection of IFX in citrate buffer, probably because this buffer modifies its structure, making it more susceptible to adsorption in the SEC column. These results suggest that IFX aggregates as well as denatures in citrate buffer, leading to an overall charge prone to adsorption on the filter walls during the concentration step.

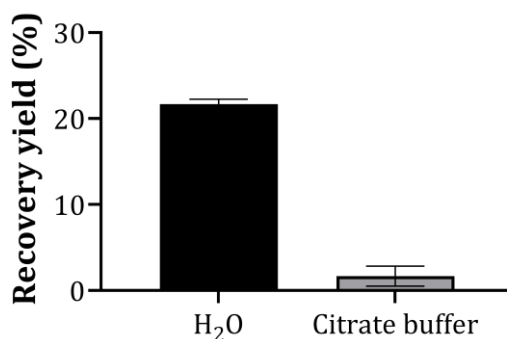


Figure 5.5. Yield of the filtration when infliximab is introduced in the filter in H₂O or in citrate buffer. Error bars represent the standard deviation among triplicates.

To prevent such aggregation, we studied the effect of adding a surfactant to the citrate sample after pH neutralization with PBS. The result presented in Figure 5.6 shows that the addition of a surfactant (RapiGest®) prior to filtration increases the recovery yield. These results are consistent with the hypothesis of mAb aggregation in citrate buffer. The recovery yield can be restored using the RapiGest® surfactant.

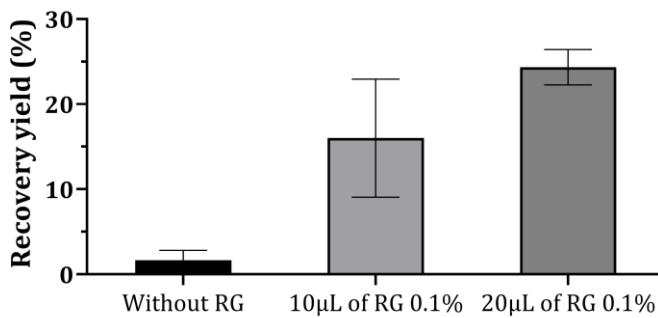


Figure 5.6. Performance of the filtration of infliximab diluted in citrate buffer with or without addition of a surfactant (RapiGest). Error bars represent the standard deviation among triplicates.

▪ Final results of protocol B

Protocol B with optimized conditions for the filtration step (filter cutoff, centrifugation speed, temperature, and addition of 20 µL of RG 0.1%) was used, resulting in an overall process efficiency of 19 ± 22 % (Table 5.1). This poor efficiency is due to the loss of mAbs during the extraction step (recovery yield of ~ 80 % for $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ IFX-spiked serum), in addition to the loss from the filtration step (recovery yield of ~ 25 %), resulting in a much higher LOD and LOQ than for the other two protocols (Table 5.1). Because the calculated LOQ was found to be $2.8 \pm 2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the sensitivity will be greatly impacted using this workflow.

In addition, several well-defined PTMs in the reference sample were not identified after protocol B (Table 5.2). The low recovery yield made it difficult to detect PTMs at low levels and resulted in a consistently higher percentage level than the reference. It is difficult to determine whether this overestimation is due to artifactual PTM arising during acid dissociation or to low signal intensity altering signal integration.

5.3.2.b. $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{FA}$ dissociation and evaporation (Protocol C)

The filtration of the analyte solution had poor repeatability and recovery yield. An alternative is the evaporation of the solvent. However, because citrate buffer is not volatile, an alternative acid dissociation involving an organic solvent was tested.

The corresponding strategy is represented by “Protocol C” in Figure 5.2, with a process efficiency of 58 ± 16 %. Since this value is similar to that of protocol A, we can assume that the

loss of mAb is mainly due to the extraction step, and not to the acid dissociation or the evaporation steps. Here, the LOQ of the strategy was evaluated to be at $0.2 \pm 0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, which is the lowest of the three protocols. Therefore, the workflow proposed here would be suitable for mAbs quantification from human serum in a concentration range comparable to that offered by ELISA.

In addition, the samples extracted using protocol C were successfully structurally characterized. All monitored PTMs were observed in all five replicates, with levels similar to those obtained for the reference, indicating that the purification protocol does not induce artifactual PTMs (Table 5.2). The high characterization of PTM obtained with this protocol is also evidenced by the similar EIE of the SINSATHYAESVK peptide with that of the reference (Figure 5.3.C), the modified and unmodified peptides were distinct from the background. The results highlighted that the resolution of *deaN* and *isoD* from their unmodified counterparts was always greater than 1, which is sufficient to correctly identify these PTM. As the resolution was similar to that obtained for the reference sample, this shows that this protocol does not affect CE separation.

5.4. Conclusion

Sample preparation prior to the analysis of minor compounds in complex matrices remains a challenge for analytical chemists. Often, compromises must be made between the straightforwardness and selectivity of the workflow. The follow-up of mAbs in patient serum is particularly important for clinical treatment. Because they are surrounded by numerous other proteins in the serum, specific extraction is required to achieve maximum sensitivity. This article presents how this purification of mAbs in serum can be managed using a bottom-up strategy. The process efficiency of the analytical procedure directly affects the LOQ of the method. In the study of mAbs used for the treatment of various diseases, these administered biomolecules are usually found at a concentration of a few $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, surrounded by many other proteins. Therefore, the lower the LOQ of the analytical workflow, the better is the study of infliximab in the serum. Among the three protocols elaborated in this study, Protocol C appeared to be the most appropriate for this purpose.

Particularly, PTM are interesting for the investigation of antibodies that have been administered to patients in order to assess the structural changes that they undergo in the patients' blood. Nevertheless, their characterization is difficult because PTM are present in low proportions. Therefore, their identification relies on the selectivity and sensitivity of analytical methods. Capillary electrophoresis is often chosen as a separation technique for PTM analysis of peptides, as its high efficacy and separation principle lead to sufficient separation of PTM, such as *deaN* and *isoD*. This article shows that sample preparation of the monoclonal antibody can greatly affect this characterization and provides insight into the issues that can arise in the development of the

method. Because the process efficiency of sample preparation is directly correlated with sensitivity, it must be closely monitored. Here, we highlight the losses encountered during mAb membrane filtration. Although each compound may lead to a different recovery yield in this step, the experimenter should evaluate the losses. As demonstrated, protocol B did not successfully identify all PTM from all replicates, even though the experiments were initially performed at 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of infliximab in serum, which is a high level for patients treated with this biomolecule. Undoubtedly, the identification of PTM decreases with increasing concentration. Another important parameter for PTM characterization is the sensitivity of the method. As illustrated by protocol A of our study, which showed the highest process efficiency, poor characterization of PTM was obtained because of the remaining interfering compounds in the sample, which altered the ITP duration and induced ion competition in the ESI source. This resulted in a decrease in resolution and sensitivity, respectively.

5.5. Supporting Information

Table 5.S1. Major information of the two peptides observed

<i>Sequence</i>	<i>Peptide mass (Da)</i>	<i>Charge state</i>	<i>m/z</i>	<i>Collision Energy (eV)</i>	<i>y-ion fragments observed</i>	
DILLTQSPAILSVPGER	1895.03	2+	948.52	10	361.18 458.23 545.26 644.33	731.36 844.45 957.53 1125.62
DILLTQSPAILSVPGER	1905.03	2+	953.52	10	371.18 468.23 555.26 654.33	741.36 854.45 967.53 1135.62

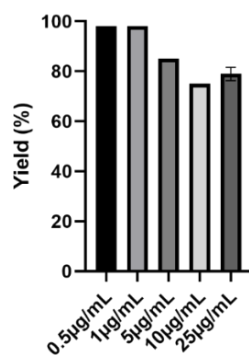


Figure 5.S1: Yield calculated for the extraction step of infliximab with the beads.

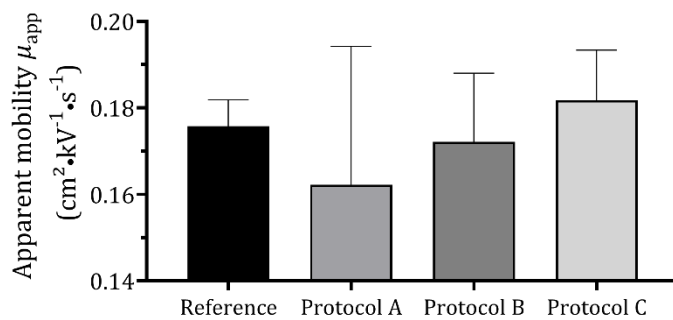


Figure 5.S2. Apparent mobility of the leading electrolyte (LE) observed from CE-MS/MS experiments for the different sample preparation procedure developed in capillary electrophoresis separation. Injection volume = 68nL, Voltage applied on the capillary = 23kV, capillary length = 100 cm

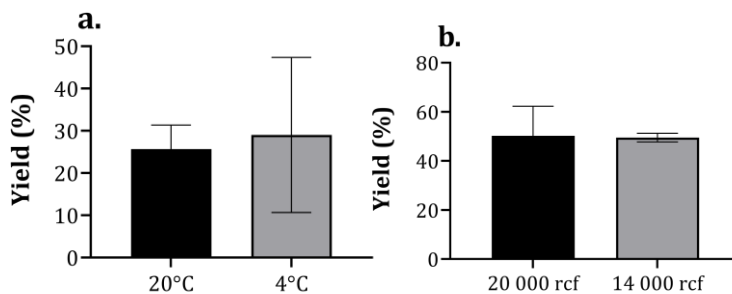


Figure 5.S3. A : Yield for centrifugation temperature at 20°C or 4°C. B : Yield for centrifugation speed at 20000rcf or 14000rcf.

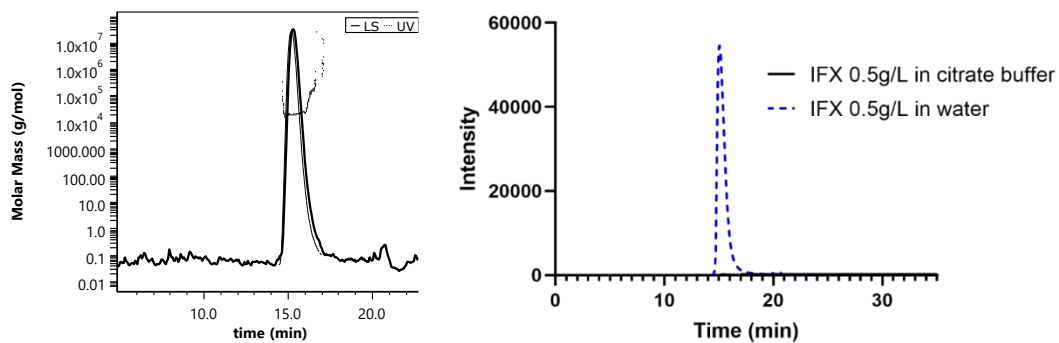


Figure 5.S4. Left : MALS and UV detection of infliximab at 25µg·mL⁻¹ in water buffer analyzed by SEC. Right: Chromatogram of infliximab at 0.5g/L in citrate buffer (black line) or in water (blue dotted line).

CHAPITRE 6. ANALYSE CESI-MS/MS DES PEPTIDES

Préambule

Le chapitre 5 précédent a donc permis d'établir une stratégie de purification de l'inflximab (IFX) et du SIL-IFX de sérum, qui, suivie d'une digestion tryptique et d'une analyse CE-MS/MS, permet de suivre tous les peptides sélectionnés dans le chapitre 4. Parmi eux, on retrouve les peptides signatures de la concentration du mAb, et d'autres peptides porteurs d'acides aminés *hotspots*, susceptibles de subir des PTM. Afin de renforcer la performance de l'analyse, la séparation électrophorétique a également été optimisée. Cette optimisation s'est consacrée à l'obtention des deux objectifs majeurs. Puis, sont décrits les paramètres de MS utilisés dans le cadre de ce manuscrit.

6.1. Optimisation de la séparation électrophorétique

Les séparations peptidiques du digest d'inflximab ont été réalisées sur un système d'électrophorèse capillaire CESI8000® (Sciex separations, Darmstadt, Allemagne), couplé à un spectromètre de masse par une interface *sheathless*. Les peptides obtenus après purification et digestion de l'inflximab issu de sérum modèle, suivant le protocole décrit précédemment (protocole C, Figure 5.1) sont repris dans 5 μL d'une solution d'acétate d'ammonium à 100 mM, pH 4. Puis, cette solution est injectée hydro-dynamiquement dans le capillaire de séparation, préalablement rempli d'acide acétique à 10 % (pH 2,2) en tant qu'électrolyte support. Afin de garantir une sensibilité optimale, l'étape de préconcentration par isotachophorèse transitoire (t-ITP) est effectuée.

L'ITP préconcentre les analytes avant leur séparation CZE qui se produit seulement quand l'électrolyte meneur est sorti du capillaire. Il est donc nécessaire de moduler la durée de l'ITP, pour que les peptides aient le temps de se séparer avant leur arrivée en sortie de capillaire. Cette durée, affectant la résolution et l'efficacité des pics, dépend de la longueur et du diamètre du capillaire, de la conductivité des électrolytes choisis, mais aussi du volume d'injection (V_{inj}) et de la tension appliquée de part et d'autre du capillaire. Dans le cadre de ce projet, la longueur du capillaire fut fixée à 1 m, et le diamètre interne à 30 μm . Ce faible diamètre est nécessaire afin de maintenir un nano-débit, augmentant la sensibilité de l'analyse par MS, et permet, de plus, de limiter l'effet Joule pouvant se produire après application de la tension. Comme décrit précédemment, la purification a été optimisée afin de limiter les sels résiduels, pouvant augmenter

la conductivité de l'électrolyte meneur, de manière incontrôlée. Après reprise des peptides dans la solution d'acétate d'ammonium 100 mM, la conductivité de la solution est d'environ 310 mS·m⁻¹, tandis que celle de l'électrolyte support (BGE) est de 160 mS·m⁻¹.

Les deux autres paramètres optimisés pour assurer une bonne efficacité de séparation furent la tension du champ électrique et le volume d'injection. Pour cela, un plan d'expériences complet de deux paramètres à trois et quatre niveaux respectivement a été effectué (Table 6.1). De l'inflximab, dopé à 25 µg·mL⁻¹ dans du sérum modèle sain, a été analysé en CE-ESI-MS/MS suivant les différents essais décrits par la Table 6.1 :

Table 6.1. Plan d'expériences utilisé pour l'optimisation de la tension appliquée (62 nL, 68 nL, 82 nL) et du volume d'injection (15 kV, 20 kV, 23 kV, 25 kV)

Essais	Volume d'injection (nL)	Tension appliquée (kV)
1	62	15
2	62	20
3	62	23
4	62	25
5	68	15
6	68	20
7	68	23
8	68	25
9	82	15
10	82	20
11	82	23
12	82	25

Les deux paramètres étudiés ont tous deux un impact sur l'efficacité et la résolution de la séparation électrophorétique. Ainsi, il faut établir l'influence de ces interactions, plutôt que d'étudier leurs effets individuellement. Le plan d'expériences permet de visualiser ces interactions, afin de facilement sélectionner les conditions optimales selon nos critères. La première réponse que nous avons considérée est l'efficacité du pic correspondant au peptide *Quantifier* LC01 (IFX_{LC01}). Plus cette efficacité sera élevée, plus le sera également la sensibilité de la méthode CE-MS/MS pour la quantification. Les autres réponses considérées de ce plan d'expérience furent les résolutions des 6 résidus sélectionnés présentant une *dean* ou *isoD*, avec leur homologue non modifié. La Figure 6.1 représente l'évolution de l'efficacité de IFX_{LC01}, de la durée de l'ITP et de la résolution des 6 PTM suivies en fonction du V_{inj} et de la tension appliquée au capillaire. Pour chaque essai, l'efficacité (N) du peptide IFX_{LC01} a été évaluée suivant :

$$N = \frac{\mu_{app}V}{2D_m} = 16\left(\frac{MT_{LC01}}{\omega_{LC01}}\right)^2 \quad (6.1)$$

μ_{app} : mobilité apparente de l'analyte (cm²·V⁻¹·s⁻¹)
V : potentiel appliqué au capillaire (V)
D_m : coefficient de diffusion (m²·s⁻¹)
MT_{LC01} : temps de migration du peptide LC01 (min)
 ω_{LC01} : largeur de son signal (min)

La Figure 6.1.a. présente l'évolution de N en fonction des deux facteurs. Tout d'abord, une augmentation significative de l'efficacité du pic IFX_{LC01} est observée avec l'incrément de V_{inj}. Plus celui-ci sera grand, plus il y aura une grande quantité d'électrolyte meneur dans le capillaire, permettant aux peptides de se concentrer davantage, ce qui se traduit par une meilleure efficacité de pic. On observe d'ailleurs que le temps total de l'ITP augmente avec le volume injecté (Figure 6.1.b).

La tension appliquée au capillaire de séparation lors de l'analyse affecte également l'efficacité du peptide IFX_{LC01} de l'infliximab (Table 4.1). Comme présenté Figure 6.1.a, pour des tensions appliquées de 15 kV à 23 kV, on observe une augmentation graduelle de N. Cela peut s'expliquer par l'équation (6.1), qui relie l'efficacité du pic à la tension de manière proportionnelle. Néanmoins, au-delà d'une tension de 23 kV, un effet antagoniste perturbe le système : l'effet Joule. En effet, l'augmentation de la tension produit un gradient de température sur la section radiale du capillaire. Or, la température est inversement proportionnelle à la viscosité du BGE, ce qui affecte le front d'écoulement plat caractéristique de la CZE. Une viscosité plus faible implique également une conductivité plus grande du BGE. Les analytes ne sont alors plus soumis à la même mobilité osmotique au sein d'une même section de capillaire. Les expériences ont permis d'établir qu'une tension de 20 kV et un V_{inj} de 82 nL permettent une efficacité de IFX_{LC01} maximale.

En parallèle, l'objectif étant de caractériser des déamidations d'asparagines (*deaN*) et isomérisations d'aspartates (*isoD*), les résolutions des 4 *deaN* et 2 *isoD* avec leurs homologues intacts furent elles aussi calculées. On peut établir la résolution entre deux pics (1 et 2) après séparation par CE suivant l'équation

$$R_{1-2} = 2 \frac{MT_2 - MT_1}{\omega_1 + \omega_2} = \frac{\sqrt{N} \mu_{ep2} - \mu_{ep1}}{4 (\mu_{eo} + \mu_{ep})} \quad (6.2)$$

MT_{1 ou 2} Temps de migration des peptides 1 ou 2 (min)

ω_{1 ou 2} Largeur du pic 1 ou 2 (min)

Les figures 6.1.c-h. illustrent l'évolution de la résolution entre les peptides présentant les PTM suivies. Le pic n°1 correspond au peptide non modifié, et le n°2 celui présentant une déamidation ou une isomérisation. La résolution semble être quasi systématiquement meilleure dans le cas d'un V_{inj} de 68 nL. Là encore, des effets opposés vont avoir lieu quant au volume d'injection sur la résolution entre les peptides. D'un côté, plus celui-ci est grand, meilleure sera l'efficacité. La résolution entre deux pics étant proportionnelle à cette efficacité N d'après l'équation (6.2), elle sera donc améliorée. D'un autre côté, plus le volume injecté est important, plus la durée de l'ITP est longue (Figure 6.1.b), et donc le volume de capillaire disponible pour la séparation CZE est réduit, ce qui diminue la résolution. Ainsi, un compromis est nécessaire par rapport au volume d'injection. Il a été possible d'observer des résolutions au moins supérieures à 1 pour un V_{inj} 68

nL et des tensions de 20 à 23 kV (Figure 6.1). En conséquence, afin de combiner une bonne efficacité de pic de IFX_{LC01} et une bonne résolution des peptides, les conditions choisies pour la méthode analytique furent un V_{inj} de 68 nL, correspondant à 9.6 % du volume total du capillaire, et une tension de 23 kV appliquée au capillaire pour la séparation.

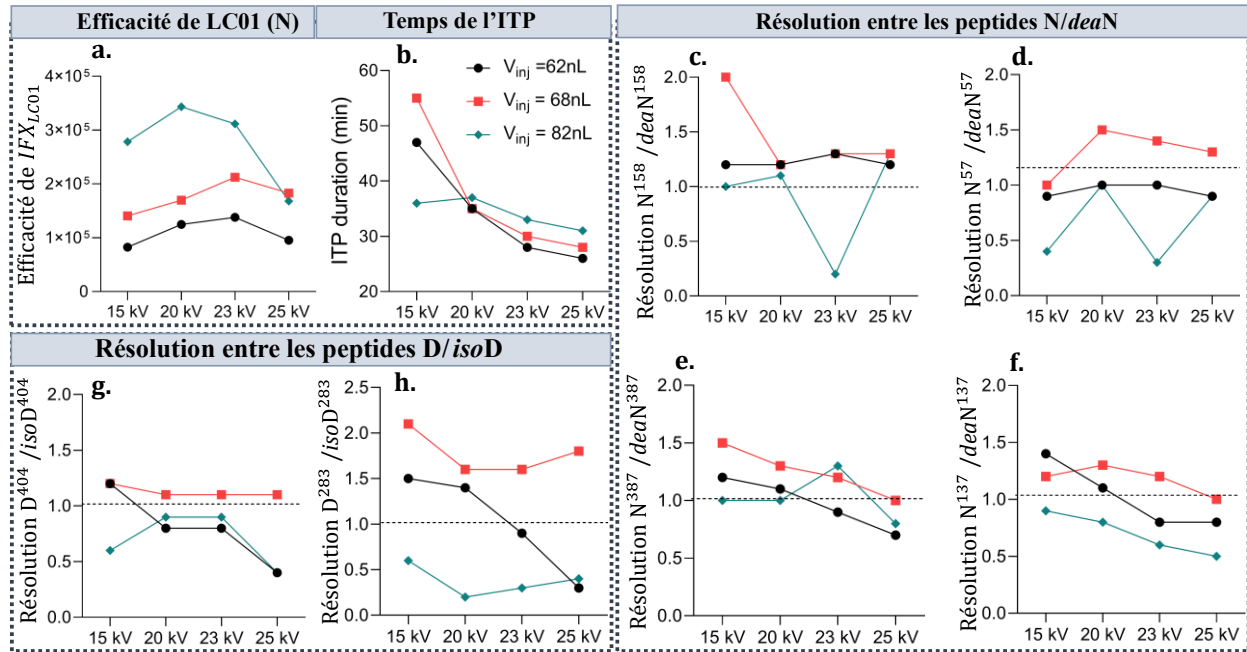


Figure 6.1. Evolution de l'efficacité du signal de LC01, de la durée de l'ITP et de la résolution des 4 deaN et 2 isoD suivies, selon le V_{inj} et la tension appliquée au capillaire. V_{inj} = 62 nL (points noirs), V_{inj} = 68 nL (carrés rouges) et V_{inj} = 82 nL (losanges bleus).

6.2. Analyse par spectrométrie de masse

L'objectif de la méthode CE-ESI-MS/MS est de pouvoir suivre de nombreux peptides issus du digest d'inflximab et de SIL-IFX. Les acquisitions MS et MS/MS se sont basées sur une stratégie DDA Top20, sur le TTOF 5600® de Sciex. Les paramètres du spectromètre pour la méthode d'acquisition du digest peptidique des mAbs sont présentés dans la Table 6.2. Lors d'un cycle d'acquisition, un balayage MS des ions entrants est réalisé dans le premier quadripôle du spectromètre et le TOF permet de les analyser. Puis, s'ensuivent 20 acquisitions MS/MS des 20 ions les plus intenses obtenus dans le balayage MS. Pour cela, les ions précurseurs sont sélectionnés dans le premier quadripôle Q1, fragmentés en CID dans la cellule de collision, et les ions fragments sont analysés par le TOF. La méthode développée mène à l'obtention d'un recouvrement de séquences de près de 80 % pour l'inflximab et le SIL-IFX.

Table 6.2. Paramètres de l'acquisition MS et MS/MS des peptides séparés en CE.

<i>Paramètre</i>	<i>Valeur</i>
Potential à la source ESI (ISVF)	1500-1900 V
Température de la source (IHT)	100°C
Gaz Rideau (CUR)	2 psi
Temps d'accumulation	Scan MS
	Scan MS/MS
Temps de cycle	250 msec
Energie de collision	80 msec
Gamme de masse (m/z) en MS	1,9 sec
Gamme de masse (m/z) en MS/MS	10 eV
	100 – 2000
	< 1250

6.2.1. Quantification absolue par MS

La stratégie de quantification absolue par MS utilisée est celle nommée PSAQ, et repose sur l'ajout du SIL-IFX intact au sérum de départ, contenant l'infliximab à quantifier. Lors de l'analyse CE-MS/MS du digest peptidique de ces mAbs, il est possible de tracer un électrophérogramme, sommant les ions acquis par le spectromètre de masse en fonction du temps. La Figure 6.2.a présente un électrophérogramme issu de l'analyse CE-MS/MS de ce digest. À 43,4 min, le spectre MS acquis indique la présence des peptides LC01 de l'infliximab (IFX_{LC01}, léger) et du SIL-IFX (IFX*_{LC01}, lourd), comme représenté en Figure 6.2.b. On observe les ions m/z correspondant aux deux peptides chargés 2 fois, ainsi que leur co-migration attendue. Il est alors possible d'extraire de l'électrophérogramme les ions m/z caractéristiques de ces peptides en fonction du temps, pour obtenir un EIE (*Extracted Ion Electropherogram*), comme représenté Figure 6.2.c. Dans le cadre de ce doctorat, les EIE ont systématiquement été réalisés par extraction de l'ion précurseur mono-isotopique et des deux premiers isotopes du massif isotopique, dont la moyenne des signaux a permis d'établir l'aire sous le pic. Par intégration de l'aire sous ces pics, utilisant le logiciel Skyline®, il est alors possible d'établir le rapport IFX_{LC01}/ IFX*_{LC01} de ces aires de l'échantillon.

Parallèlement, une gamme d'étalonnage en matrice sérique modèle, dopée à des concentrations fixes de SIL-IFX et croissantes d'infliximab, est effectuée. Cette gamme permet l'établissement d'une relation linéaire entre le rapport IFX_{LC01}/ IFX*_{LC01} de la réponse MS des deux mAbs et la concentration en infliximab.

De plus, les peptides IFX_{LC01} et IFX*_{LC01}, très intenses, sont systématiquement sélectionnés dans le Top20 DDA lorsqu'ils sont présents dans le scan MS au vu de leur grande efficacité de digestion et d'ionisation, et sont donc fragmentés. Aussi, une confirmation d'au moins 5 fragments y des spectres MS/MS issus de leur fragmentation CID a pu être effectuée avant attribution d'un signal (Figure 6.2.d).

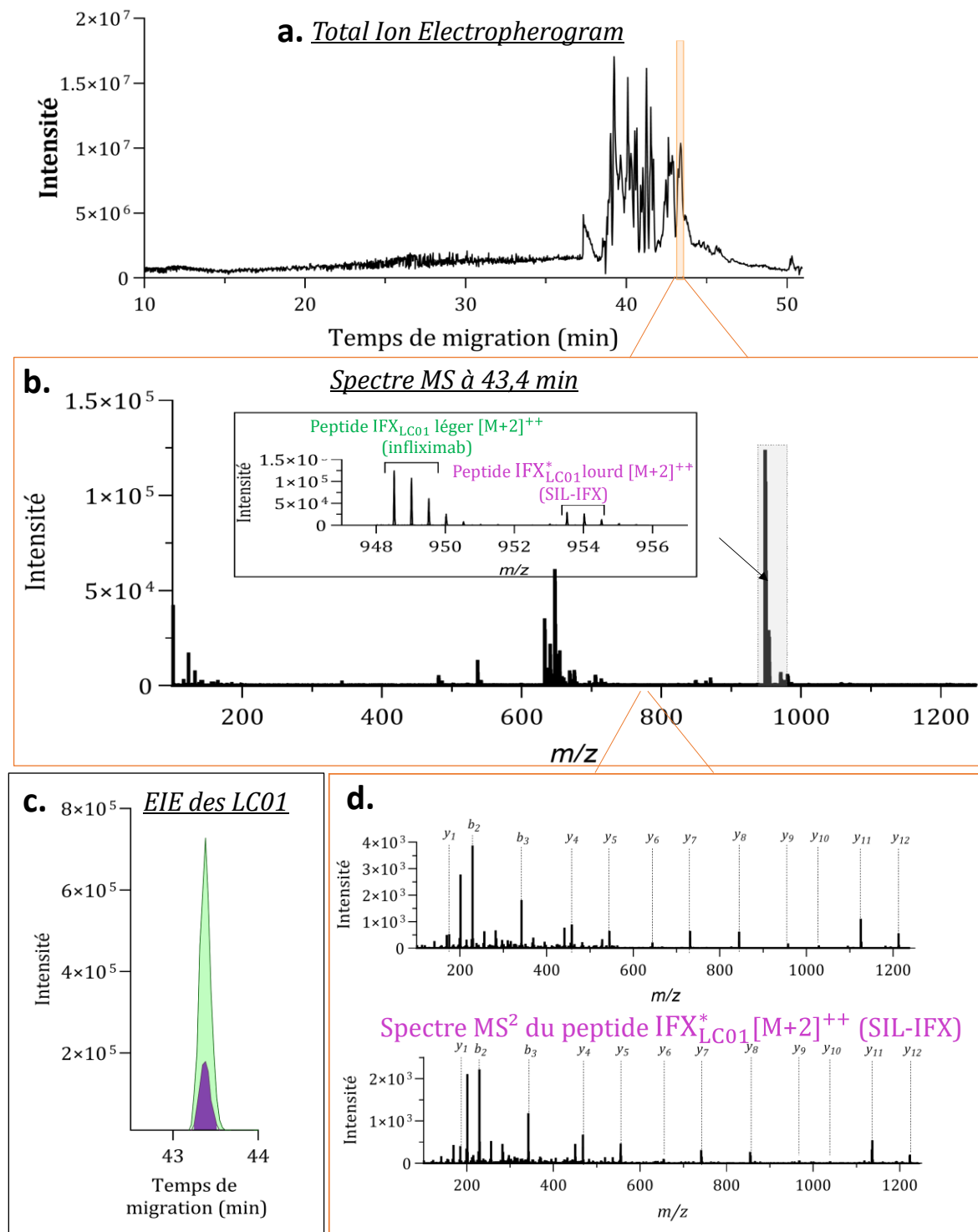


Figure 6.2. Stratégie d'acquisition MS implémentée pour la quantification d'infliximab par bottom-up. Identification et intégration des signaux des peptides LC01 de l'infliximab (peptide léger) et du SIL-IFX (peptide lourd). **a.** Electrophérogramme entier issu de l'analyse CE-MS/MS d'infliximab et de SIL-IFX après digestion peptidique. **b.** Spectre MS contenant les ions m/z des peptides LC01 (légers et lourds). **c.** Extraction des ions m/z de LC01 de l'électrophérogramme. **d.** Spectres MS/MS obtenus après fragmentation CID des peptides LC01 (légers et lourds).

6.2.2. Quantification relative des PTM

À partir du même électrophérogramme CE-MS/MS obtenu après analyse du digest peptidique, d'autres ions peuvent être extraits pour établir la quantification relative de PTM de certains sites de l'infliximab. Pour cela, sont extraits de l'électrophérogramme les EIE des peptides chargés 2 fois, comportant un acide aminé *hotspot* non modifié et de leur homologue présentant une PTM. Les aires de ces signaux sont intégrées, et la proportion relative du peptide modifié par rapport à celui intact est déterminée. Cette quantification apporte une information relative, de la proportion d'une espèce par rapport à une autre, au moment de l'analyse CE-MS/MS. Cette quantification relative peut être réalisée pour chaque acide aminé, sous couvert d'avoir une sensibilité suffisante.

Néanmoins, il est possible que ces proportions relatives de PTM de l'infliximab évoluent lors de son extraction du sérum, de sa digestion tryptique, ou bien même lors de son analyse CE-MS/MS. Ce qui nous intéresse particulièrement dans le cadre de ce projet, c'est de déterminer les PTM survenues sur l'infliximab lors de sa circulation dans l'organisme des patients. Il est donc important de limiter ou supprimer les PTM dites endogènes, induites par notre stratégie analytique. Ces travaux font l'objet du chapitre 7.

CHAPITRE 7.

MISE EN PLACE D’UNE STRATEGIE DE NORMALISATION POUR LA CARACTERISATION DES PTM

7.1. Quantification relative brute des PTM après analyse CE-MS/MS

7.1.1. Glycosylations

L’analyse CE-MS/MS de l’infliximab issu de sérum a permis d’extraire le peptide porteur de l’asparagine N³⁰⁰, site de glycosylation de l’infliximab (peptide HC26). Les formes glycaniques majoritaires des IgG sont connues, ainsi que leurs compositions en oligosaccharides et leurs masses (Cf. Annexe 2). L’extraction des 6 glycopeptides majoritaires de l’infliximab (25 µg·mL⁻¹) mène à l’obtention de la Figure 7.1.a. On observe une séparation partielle des différents glycans, avec une majorité de G0F. Ici, les autres glycopeptides, plus minoritaires, que présentent les IgG, peuvent également être suivis, mais résultent systématiquement en un signal trop peu intense pour être extrait du bruit de fond.

Les spectres MS/MS de la fragmentation CID de deux de ces glycopeptides, G0F et G2F, sont présentés Figures 7.1.b et 7.1.c. Les fragments caractéristiques d’une fragmentation CID d’un glycopeptide [156] ont été identifiés. Cette fragmentation ne mène pas à la dissociation du peptide porteur mais à celle des oligosaccharides, dont les liaisons absorbent mieux l’énergie communiquée que la chaîne peptidique [217].

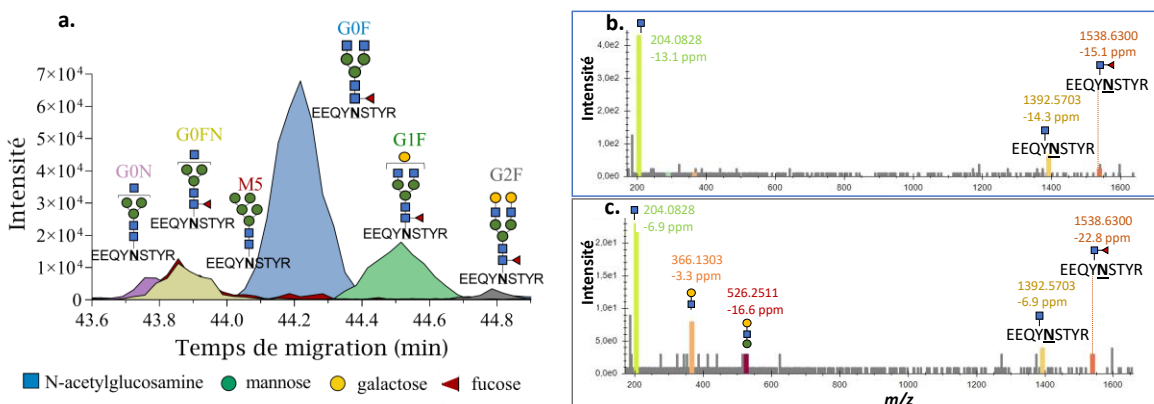


Figure 7.1. Spectres MS (EIE) et MS/MS des glycopeptides de l’infliximab après analyse CE-MS/MS du digest peptidique. **a.** EIE des principaux glycopeptides de l’infliximab ; G0F, G1F, G2F, G0FN, G0N et M5, dont les compositions oligo-sacchariques sont représentées au-dessus des signaux MS. Les ions extraits correspondent aux glycopeptides chargés 2 fois. Les spectres MS/MS des glycopeptides **b.** G0F et **c.** G2F sont présentés à droite.

7.1.2. Autres PTM

À partir des mêmes données CE-MS/MS que pour l'obtention des EIE des glycanes, les EIE correspondants aux autres peptides avec ou sans PTM peuvent également être extraits (Figure 7.2).

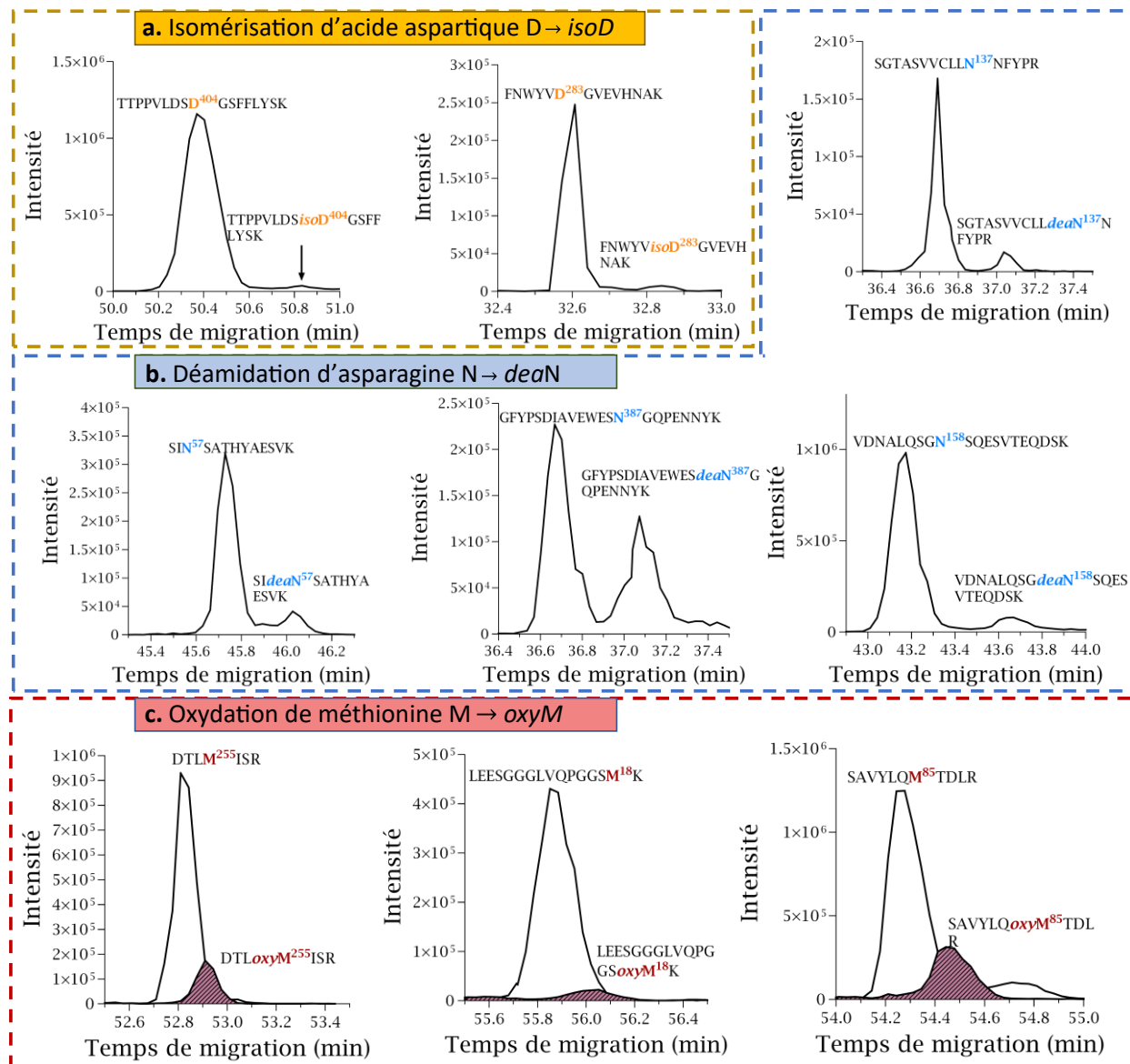


Figure 7.2. EIE des peptides avec ou sans PTM des acides aminés hotspots de l'infliximab après analyse CE-MS/MS du digest peptidique.

Dans le cas des isomérisations et déamidations, une bonne séparation électrophorétique a pu être observée avec une résolution systématiquement supérieure à 1 (Figure 7.2.a et b). La confirmation des peptides avec et sans PTM est réalisée systématiquement par caractérisation des spectres MS/MS (Annexe 3). Concernant les isomérisations, la modification ne présente pas de différence de charge ou de masse sur le peptide, conduisant à des spectres MS et MS/MS identiques au peptide

de référence. Néanmoins, des travaux précédents ont démontré grâce à des peptides synthétiques que les peptides présentant une *isoD* migrent systématiquement plus lentement en CZE que les peptides non modifiés [21] comme le montre la Figure 7.2.a. Les oxydations, quant à elles, co-migrent avec leur équivalent non modifié (Figure 7.2.c). Cette PTM induisant 16 Da de différence, il n'y a aucun recouvrement isotopique des peptides en spectrométrie de masse, ce qui permet une parfaite identification des deux formes peptidiques par l'intermédiaire des données MS/MS.

L'intégration des aires sous les pics permet d'établir la proportion relative de ces 9 PTM par rapport à leurs homologues non modifiés. La Figure 7.3 présente les proportions moyennes obtenues après analyse d'infliximab (IFX) dopé dans du sérum et extrait selon le protocole C établi dans le chapitre 5 (digestion n°1, barres noires). Les barres hachurées correspondent à ces mêmes proportions observées pour le SIL-IFX, introduit dans le même échantillon que l'infliximab. On observe des proportions très similaires entre l'IFX et le SIL-IFX. Cependant, la méthionine M⁸⁵ présente un niveau d'oxydation plus élevé pour l'infliximab que le SIL-IFX. Cette disparité n'a pas été expliquée, mais les données MS² ont confirmé l'identification des peptides. Il est possible de suggérer que les lots d'infliximab et de SIL-IFX utilisés lors de ces premières analyses aient subi des conditions de stockage différentes, n'ayant impacté que cet acide aminé.

Par ailleurs, des niveaux de PTM très différents d'un acide aminé à un autre sont observés. À titre d'exemple, suite à la digestion n°1, on constate que près de la moitié de l'asparagine N³⁸⁷ a subi une déamidation, alors que seulement 10 % de l'asparagine N¹⁵⁸ a subi cette modification. Ceci souligne une prédisposition à la modification qui varie en fonction de la position spécifique de l'acide aminé. En particulier, l'asparagine N³⁸⁷ précède une glycine, un acide aminé ne possédant pas de chaîne latérale. Or, lors d'une réaction de déamidation, la formation de l'intermédiaire de réaction succinimide nécessite une conformation particulière de l'asparagine. L'acide aminé précédant cette asparagine peut, par sa chaîne latérale, limiter la formation du succinimide par gêne stérique [218].

Il est également possible de noter que les proportions de PTM obtenues par analyse CE-MS/MS (Figure 7.3, barres noires) sont nettement plus élevées que celles de la littérature [193] (Figure 7.3, barres mauves). Il a été identifié que notre étape de digestion induisait des PTM endogènes sur certains acides aminés de l'infliximab. Cette étape de digestion, décrite au chapitre 5, comprend deux conditions expérimentales connues pour induire des *oxiM* et *deaN*: un pH 8 basique et une température élevée de 80°C [104].

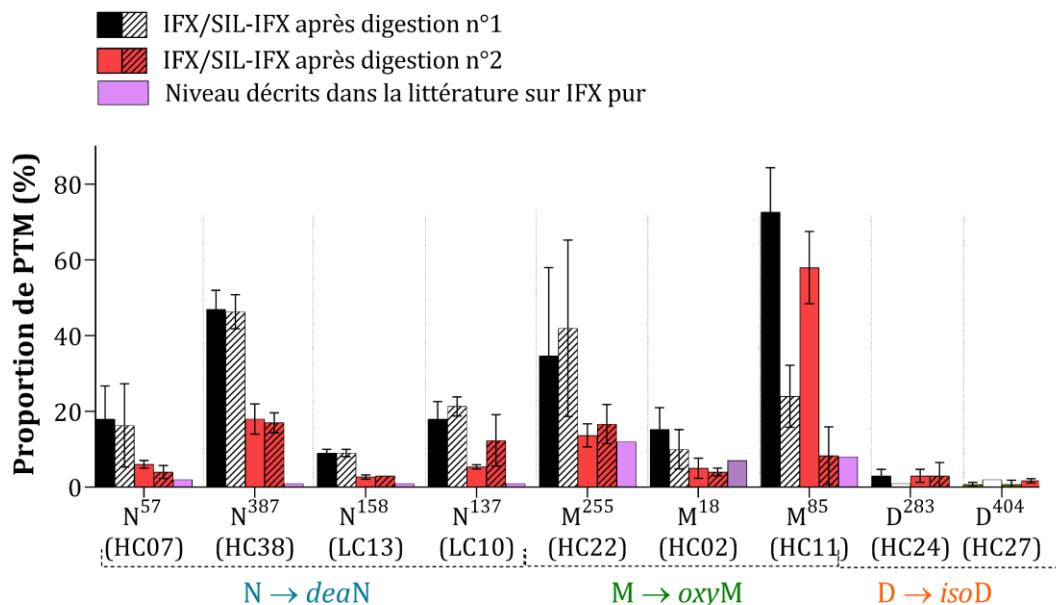


Figure 7.3. Proportions relatives des 9 PTM observées par CE-MS/MS pour l'infliximab (barres pleines) ou le SIL-IFX (barres hachurées) issus de sérums, selon deux protocoles de digestions peptidiques. Digestion pH 8 (barres noires) ou pH 6 (barres rouges). Les barres d'erreurs représentent les écarts types associés aux triplicatas d'analyse. Proportions obtenues par Pisupati et al. (2017) après analyse LC-MS d'infliximab pur (barres mauves).

Afin d'identifier l'origine de ces PTM artificielles, le même protocole a été réalisé sur d'autres sérums dopés en infliximab et SIL-IFX, mais cette fois la digestion fut réalisée à pH 6, et les étapes nécessitant une température de 80°C furent réalisées à 40°C. Les proportions de PTM obtenues sont présentées sur la Figure 7.3, digestion n°2, barres rouges. On observe des niveaux de PTM nettement plus faibles et répétables après cette digestion n°2 que ceux obtenus pour la n°1. Ces résultats illustrent que la température et/ou le pH basique favorisent les *deaN* et *oxyM*, mais ne semblent pas affecter la proportion d'*isoD*. En particulier, une étude a démontré qu'un pH 8 favorise la catalyse de la réaction de déamidation d'asparagine par le bicarbonate d'ammonium [219]. Cependant, il est à noter que la digestion par la trypsine atteint une efficacité maximale à ce même pH 8 [220], assurant une sensibilité de la méthode pour la quantification d'infliximab. En effet, pour que la trypsine hydrolyse les liaisons N-C après les arginines et lysines, il faut que l'acide aspartique se trouvant au fond de sa poche (région où s'effectue la triade catalytique) soit chargé négativement (pKa 3,7). À partir du signal du LC01 de l'infliximab pour ces analyses, il a été calculé des LOQ ($S/N > 10$) de $0,25 \pm 0,07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour la digestion à pH 8 (n°1) et de $1,04 \pm 0,08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour celle à pH 6 (n°2). Ainsi, la digestion n°1, bien qu'elle induise des PTM artificielles, permet une meilleure sensibilité de la méthode, et a donc été gardée tout au long de ce manuscrit.

Dans la littérature, différentes stratégies ont été employées ces dernières années afin de limiter les PTM artificielles [126,221], ou pour les identifier [127,128,222], tout en conservant une

efficacité de digestion optimale. Ces méthodes sont coûteuses ou nécessitent des manipulations supplémentaires de l'échantillon. C'est alors qu'il a été envisagé d'établir une méthode de normalisation, utilisant le SIL-IFX introduit en début d'analyse, comme marqueur de ces modifications artéfactuelles. Cette méthode de normalisation fait l'objet de la section suivante.

7.2. Mise en place d'une stratégie de normalisation

7.2.1. Principe de l'approche

L'objectif a été de mettre en place une approche pour déterminer les PTM de l'infliximab apparues lors de sa résidence dans la circulation sanguine d'un patient, et uniquement lors de cette étape. Les PTM endogènes peuvent être produites lors de la préparation d'échantillon, de l'analyse CE-MS/MS des peptides, mais aussi lors de la production de l'infliximab. Ainsi, la proportion de PTM endogènes de chaque site étudié doit être déduite et supprimée de la proportion relative finale obtenue en CE-MS/MS. Le principe est similaire à celui d'une normalisation dans le cas d'une quantification absolue d'un analyte, c'est-à-dire que l'on va comparer la réponse de l'étalon interne (ici le SIL-IFX) à celle attendue, et ainsi établir l'erreur due à la préparation d'échantillon. Puis, la réponse de l'analyte peut être corrigée selon ce même biais expérimental. Néanmoins, par rapport à cette stratégie bien établie, nous sommes confrontés à plusieurs problématiques supplémentaires.

Considérons un acide aminé de l'infliximab, dont notre objectif est de calculer la proportion d'une PTM induite sur ce site lors de l'administration de l'infliximab à un patient. Après collecte du sérum, ajout du SIL-IFX, préparation de l'échantillon et analyse CE-MS/MS, il va être possible de déterminer la proportion relative L_p^{IFX} de ce site de l'infliximab présentant cette PTM. De manière similaire, L_p^{SIL} , correspond à la proportion relative de cette PTM pour le SIL-IFX (Figure 7.4).

- Le premier aspect à prendre en considération est que la production du SIL-IFX est beaucoup moins contrôlée que celle de l'anticorps thérapeutique infliximab. Ainsi, comme présenté Figure 7.4 aux étapes (1) et (3) il a été considéré que la proportion de PTM de l'acide aminé étudié (représenté par les points rouges) peut être différente entre le SIL-IFX ($f_{\text{prod}}^{\text{SIL}}$) et l'infliximab ($f_{\text{prod}}^{\text{IFX}}$) juste après leur production ;

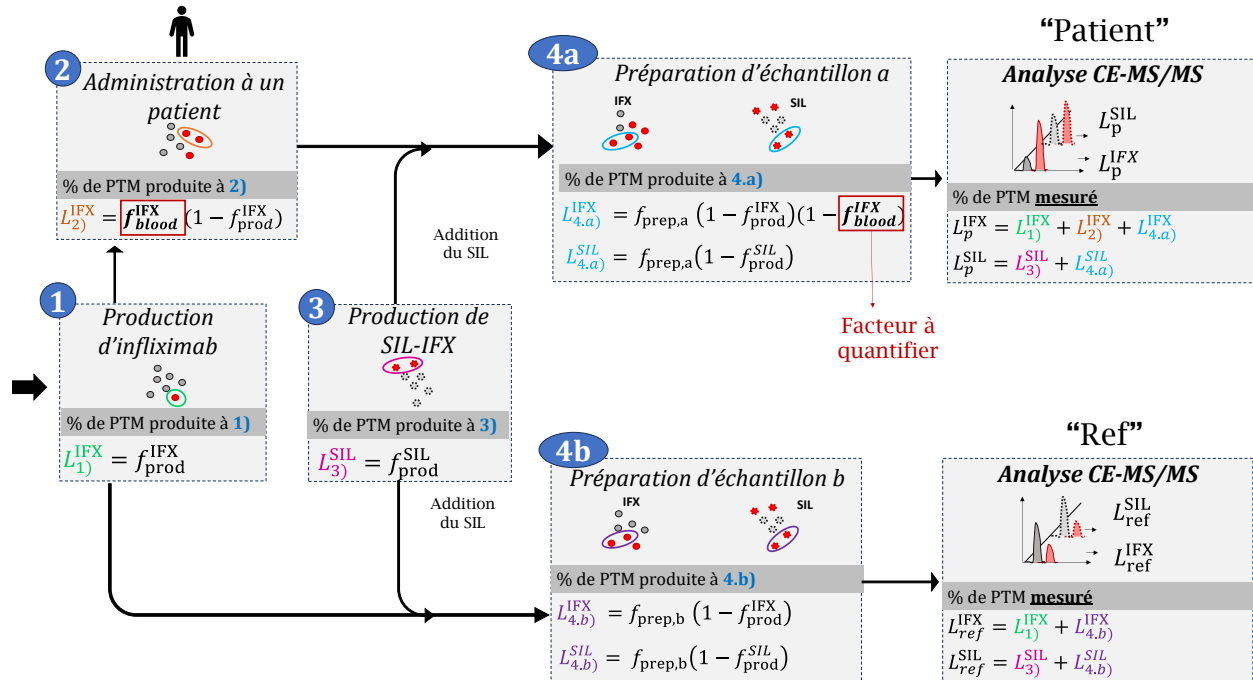


Figure 7.4. Stratégie de normalisation implémentée pour la détermination des proportions de PTM apparues seulement lors de l'administration de l'infliximab aux patients, f_{blood}^{IFX} .

Le deuxième aspect particulièrement important est que, contrairement à une analyse quantitative absolue, nous cherchons à déterminer ici une proportion relative. Or, l'abondance d'une modification induite lors d'une étape dépend forcément de la quantité de l'acide aminé non modifié issu de l'étape précédente.

Par exemple : prenons deux patients A et B, auxquels est administrée une dose identique d'infliximab. Puis, quelques jours après administration, leur sérum est collecté et analysé. L'objectif est de définir à quelle proportion une PTM est survenue sur un acide aminé spécifique durant l'administration. Supposons que l'organisme du patient A ait modifié 50 % ($= f_{bloodA}^{IFX}$) de cet acide aminé de tout l'infliximab administré, et le patient B seulement 2 % ($= f_{bloodB}^{IFX}$). Les sérums sont collectés et manipulés en même temps. Supposons maintenant que la préparation d'échantillon induise 50 % (il s'agit d'un cas extrême) de PTM endogènes ($f_{prep,a}$) sur ce même acide aminé. Alors, 50 % de tous les sites non modifiés le seront après cette étape. Pour le patient A, il s'agira de 25 % de nouveaux sites modifiés lors de la préparation d'échantillon. Pour le patient B, ce sera 49 %. Ainsi, pour une même manipulation, un taux de PTM endogène différent aura été produit. Tout cela explique pourquoi chaque étape induisant potentiellement des PTM est dépendante des précédentes. Comme représenté dans la Figure 7.4, le pourcentage total de PTM apparu sur l'acide aminé lors de chaque étape est présenté dans les cases grises. Ce pourcentage dépend du facteur de modification f de l'étape, ainsi que de ce qui n'a pas été modifié ($1-f$) des étapes précédentes ;

▪ Le troisième aspect que la stratégie de normalisation doit considérer est que pour l'inflximab et le SIL-IFX présents dans un même échantillon, l'impact de la préparation d'échantillon va être identique. Ainsi, le facteur de PTM induit par la préparation d'échantillon est identique pour les deux mAbs d'un même échantillon (f_{prep}).

L'objectif de cette normalisation est de déterminer le facteur de modification que l'organisme du patient a eu sur un acide aminé spécifique de l'inflximab administré (f_{blood}^{IFX}). Ce facteur apparaît dans la Figure 7.4 en étape (2) lors de l'administration de l'inflximab au patient et réapparaît en (4a). Après analyse CE-MS/MS, les proportions L_p^{IFX} et L_p^{SIL} sont obtenues, et correspondent à la somme des proportions de la PTM induites à chaque étape, ce pour l'inflximab et le SIL. On obtient alors le système d'équations suivant

$$\begin{aligned} L_p^{IFX} &= f_{prod}^{IFX} + f_{blood}^{IFX}(1 - f_{prod}^{IFX}) + f_{prep,a}^{IFX}(1 - f_{prod}^{IFX})(1 - f_{blood}^{IFX}) \\ L_p^{SIL} &= f_{prod}^{SIL} + f_{prep,a}^{SIL}(1 - f_{prod}^{SIL}) \end{aligned} \quad (7.1)$$

Avec f_y^x le facteur de modification de l'acide aminé concerné appartenant à l'anticorps x (SIL-IFX ou inflximab) à l'étape y (production, administration, manipulation, analyse).

Néanmoins, ce système de deux équations (7.1) possède trois, donc trop d'inconnues (f_{prod}^{IFX} , f_{prod}^{SIL} , et $f_{prep,a}$) pour être capable d'extraire f_{blood}^{IFX} . Pour cette raison, il a été nécessaire d'introduire deux autres équations à ce système, issues d'un échantillon de référence (cf. « ref » de la Figure 7.4). Cet échantillon est préparé en même temps que le sérum *patient*, et consiste en du sérum sain, dopé avec du SIL et de l'inflximab, purifiés et analysés selon le même protocole. Les analyses CE-MS/MS permettent d'obtenir L_{ref}^{IFX} et L_{ref}^{SIL} que l'on peut écrire selon le système 7.2. Afin de renforcer la justesse du calcul, il a été pris en compte que deux échantillons, bien que préparés simultanément, pouvaient présenter un f_{prep} différent (a et b).

$$\begin{aligned} L_{ref}^{IFX} &= f_{prod}^{IFX} + f_{prep,b}(1 - f_{prod}^{IFX}) \\ L_{ref}^{SIL} &= f_{prod}^{SIL} + f_{prep,b}(1 - f_{prod}^{SIL}) \end{aligned} \quad (7.2)$$

Ainsi, les systèmes d'équations (7.1) et (7.2) mènent à 4 inconnues (f_{prod}^{IFX} , f_{prod}^{SIL} , $f_{prep,a}$ et $f_{prep,b}$) pour 4 équations, permettant d'isoler f_{blood}^{IFX} en fonction des données connues par CE-MS/MS :

$$f_{blood}^{IFX} = \frac{L_p^{IFX} - L_{ref}^{IFX} - L_p^{SIL} + L_{ref}^{IFX} L_p^{SIL} + L_{ref}^{SIL} - L_p^{IFX} L_{ref}^{SIL}}{1 - L_{ref}^{IFX} - L_p^{SIL} + L_{ref}^{IFX} L_p^{SIL}} \quad (7.3)$$

Cette méthode de normalisation permet donc de quantifier la fraction de PTM que l’organisme d’un patient a entraînée sur un site de l’inflximab. L’équation (7.3) peut être appliquée à tous les acides aminés et tous types de PTM de l’anticorps.

Une hypothèse amenée ici est que l’inflximab utilisé est toujours issu du même lot, ou du moins qu’il présente la même proportion de PTM après sa production pour l’échantillon d’intérêt *patient* comme pour la référence *ref*. Comme l’inflximab est utilisé en tant que traitement, sa production reste contrôlée et les PTM faisant partie des critères d’attributs de qualité réglementés par l’EMA ou FDA sont vérifiés. De plus, il s’agit à chaque fois du même produit d’inflximab, le Remicade® qui a été utilisé pour ces analyses.

7.2.2. Application de la normalisation

Cette stratégie de normalisation peut donc être appliquée à tout sérum issu de patient traité avec de l’inflximab (*patient*), si tant est qu’un sérum modèle dopé avec de l’inflximab et du SIL-IFX soit lui aussi analysé par CE-MS/MS (*ref*). La moyenne des proportions L_{ref}^{IFX} et L_{ref}^{SIL} obtenues en CE-MS/MS après analyse de 30 sérums références a été calculée pour chacune des PTM *hotspot*. Ces valeurs sont présentées dans la Table 7.1, et montrent des niveaux de PTM L_{ref}^{IFX} et L_{ref}^{SIL} répétables pour *deaN* et *isoD* étudiées (écarts-types < 5 %). Par contre, une très grande dispersion a été observée pour les *oxiM*. En effet, les écarts-types des 30 répliques sont très élevés (écarts-types > 20 %), soulignant que la préparation d’échantillons/analyse induit aléatoirement des oxydations. Ces données moyennes de L_{ref}^{IFX} et L_{ref}^{SIL} ont été implémentées, par suite, systématiquement dans l’équation (7.3) dans le reste du manuscrit, sauf indication contraire.

Table 7.1. Proportions relatives brutes après analyse CE-MS/MS (L_{ref}^{IFX} et L_{ref}^{SIL}) moyennes des PTM de l’inflximab et de SIL-inflximab dopés dans des sérums sains (n=30, réalisés sur des jours différents). Erreur calculée par l’écart-type des répliques.

Type de PTM	Déamidations d’asparagines (<i>deaN</i>)				Oxydations de méthionines (<i>oxiM</i>)			Isomérisations d’aspartates (<i>isoD</i>)	
	<i>deaN</i> ⁵⁷	<i>deaN</i> ³⁸⁷	<i>deaN</i> ¹⁵⁸	<i>deaN</i> ¹³⁷	<i>oxiM</i> ²⁵⁵	<i>oxiM</i> ¹⁸	<i>oxiM</i> ⁸⁵	<i>isoD</i> ²⁸³	<i>isoD</i> ⁴⁰⁴
Peptide associé	(HC07)	(HC38)	(LC13)	(HC10)	(HC22)	(HC02)	(HC11)	(HC24)	(HC27)
L_{ref}^{IFX}	8 ± 4 %	49 ± 5 %	10 ± 3 %	16 ± 3 %	40 ± 29 %	22 ± 19 %	28 ± 25 %	4 ± 3 %	2 ± 1 %
L_{ref}^{SIL}	7 ± 3 %	48 ± 5 %	11 ± 2 %	16 ± 3 %	53 ± 28 %	30 ± 24 %	56 ± 27 %	3 ± 2 %	4 ± 1 %

Aux données de la Figure 7.3, présentant les proportions finales CE-MS/MS des PTM de l'infliximab et SIL-IFX après digestion n°1 ou celle n°2, ont été calculées les valeurs f_{blood}^{IFX} de ces PTM. Pour chacun de ces sérums, les niveaux de PTM obtenus ont été définis en tant que L_p^{IFX} et L_p^{SIL} , comme présenté en Figure 7.5. Les valeurs L_{ref}^{IFX} et L_{ref}^{SIL} moyens de la Table 7.1 ont été incorporées dans l'équation (7.3). Cette équation doit mener à une valeur f_{blood}^{IFX} proche de zéro, car l'infliximab analysé n'a jamais été administré à un patient (Figure 7.5, process du haut).

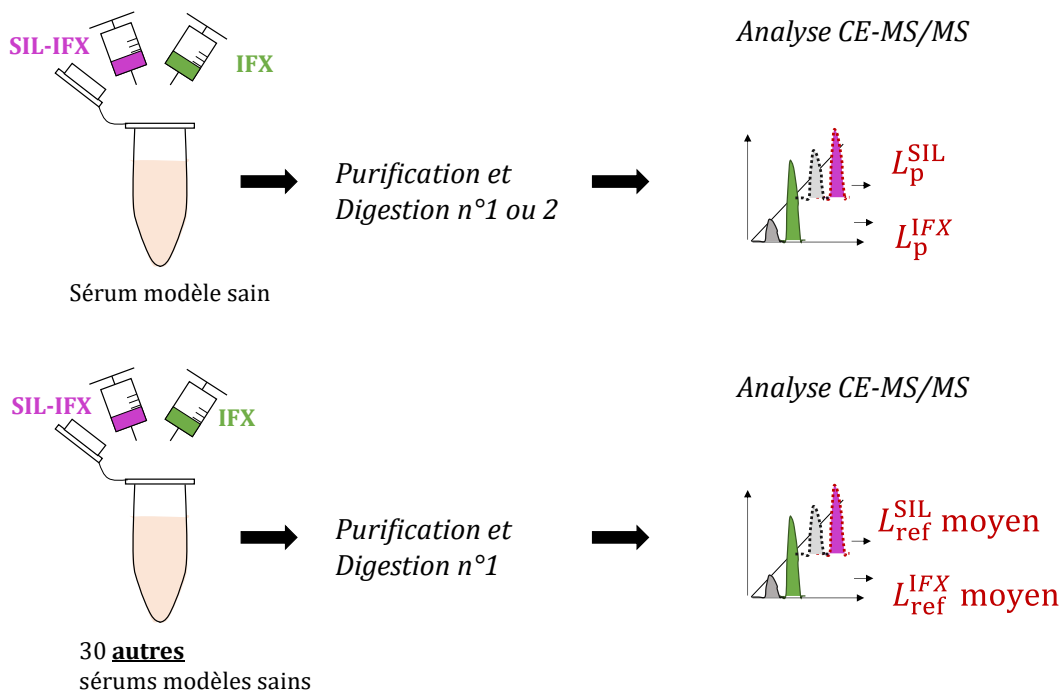


Figure 7.5. Stratégie de normalisation appliquée aux sérums modèles dopés avec de l'infliximab et du SIL.

Nous avons montré dans la Figure 7.3 que les proportions des données CE-MS/MS des 9 PTM étaient plus élevées après la digestion n°1 que la n°2. L'objectif ici est de confirmer que les PTM artéfactuelles induites par la préparation d'échantillon et l'analyse peuvent être éliminées par l'équation (7.3). La Figure 7.6 montre les valeurs de f_{blood}^{IFX} obtenues pour chaque PTM, pour l'infliximab dopé dans du sérum sain, purifié, et digéré selon la digestion n°1 ou n°2 avant analyse CE-MS/MS. Il est possible d'observer qu'en moyenne ces f_{blood}^{IFX} sont inférieures à $\pm 10\%$, et très similaires entre les deux digestions. Ainsi, bien que ces protocoles de digestion aient des impacts distincts sur le niveau de PTM artificielles d'après les données CE-MS/MS brutes (Figure 7.3), on observe que la normalisation a permis une correction satisfaisante. Étant donné que l'infliximab n'a pas été administré à un patient, on trouve des niveaux de f_{blood}^{IFX} proches de zéro.

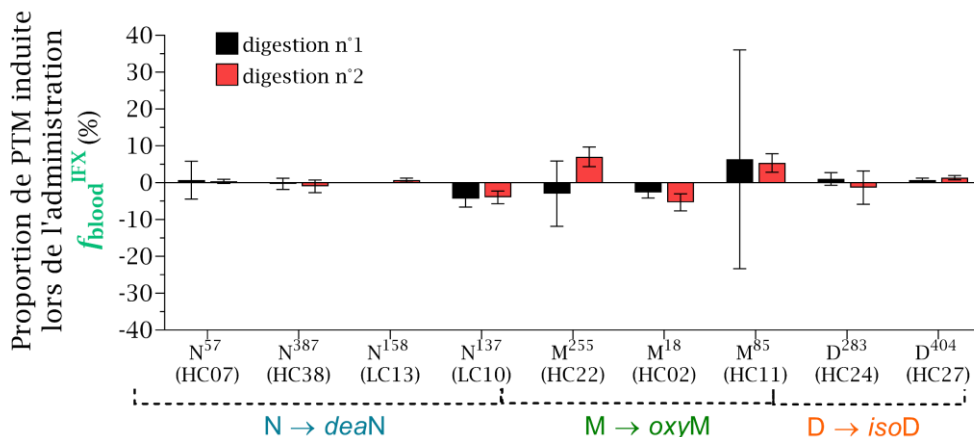


Figure 7.6. Proportions normalisées f_{blood}^{IFX} des 9 PTM pour l'infliximab ou le SIL-IFX issus de sérums dopés modèles, selon deux protocoles de digestions peptidique. Digestion n°1 : pH 8 barres noires et digestion n°2 : pH 6 barres rouges. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types des triplicatas.

Le site M⁸⁵ a résulté en une grande variabilité des réplicas (CV > 20%), probablement à cause de la différence de proportion relative de son oxydation selon l'infliximab ou le SIL-IFX (Figure 7.3). Ces problématiques ne se retrouvent pas dans le cas des autres sites. Malgré tout, les résultats soulignent la capacité de la stratégie de normalisation pour opérer une correction des PTM endogènes adaptée, quelle que soit la variabilité de ces modifications. Par ailleurs, il est possible de l'implémenter également aux profils de glycosylations, ce qui a été réalisé dans le chapitre suivant.

CONCLUSION

La préparation d'échantillon et les paramètres d'analyse sont essentiels à l'obtention d'une méthode sensible et performante. Les travaux de cette partie II du manuscrit se sont centrés sur l'optimisation des conditions de purification, de séparation électrophorétique, d'acquisition MS et de traitement de données menant à la quantification et la caractérisation de PTM de l'infliximab issu de sérum. Le protocole mène à une LOQ de 0,22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, adéquate à la quantification d'infliximab dans du sérum.

Le développement de la méthode fut également optimisé pour permettre la caractérisation et quantification de certaines PTM de l'infliximab. La purification du mAb de la matrice et la séparation CE peuvent altérer cette caractérisation. Aussi, ces étapes ont été considérées avec attention afin d'obtenir une méthode sensible, spécifique et sélective de la caractérisation structurale d'infliximab. Le développement d'une stratégie innovante permet de s'affranchir des PTM endogènes de l'analyse pour quantifier uniquement celles apparues lorsque l'infliximab est en circulation dans l'organisme du patient.

PARTIE III : APPLICATION DE LA STRATEGIE CE-
MS/MS POUR LA QUANTIFICATION ET
CARACTERISATION STRUCTURALE DE
L’INFLIXIMAB APRES ADMINISTRATION

Cette partie III est divisée en deux chapitres, portant sur l’application de la méthode analytique CE-MS/MS développée dans la partie II, à des sérums contenant de l’infliximab. Dans le chapitre 8, est tout d’abord présentée l’évaluation et la validation de la méthode de quantification de l’infliximab par CE-MS/MS dans des sérums modèles, suivant les réglementations décrites par les autorités FDA et EMA. Puis, la procédure analytique a été appliquée à des sérums de patients atteints de la maladie de Crohn et traités avec de l’infliximab. La concentration de l’anticorps ainsi que les proportions de certaines de ses PTM, apparues lors du temps de résidence du traitement dans le corps, ont alors pu être déterminées.

Le chapitre 9, quant à lui, est dédié à l’étude de l’évolution structurale de l’infliximab selon sa formulation. Pour cela, une stratégie *in vitro* a été mise en place pour mimer l’évolution de certaines PTM post-administration. Cette cinétique de dégradation a été comparée selon le produit original et des biosimilaires de l’infliximab.

CHAPITRE 8.

QUANTIFICATION ET CARACTERISATION STRUCTURALE SIMULTANEE D’INFLIXIMAB *IN VIVO*

Préambule

Depuis quelques années, l’étude des PTM *in vivo* des mAbs thérapeutiques après administration fait l’objet d’une attention croissante. Cela est dû au fait que certaines PTM peuvent diminuer l’activité biologique, impacter la pharmacocinétique ou augmenter l’immunogénicité du médicament. Ainsi, récemment, des études se sont intéressées aux modifications post-administration du trastuzumab [223], ou d’autres mAbs de type IgG1 [15,16]. Elles ont pu identifier des PTM survenant lors de leur circulation sanguine.

L’objectif de ce chapitre fut d’identifier si l’inflximab est également soumis à des PTM post-administration, notamment sur certains acides aminés *hotspots* de sa séquence. De plus, afin de mieux comprendre les conséquences biologiques des PTM d’un mAb thérapeutique, il faut également contrôler sa biodisponibilité, c’est-à-dire la fraction du traitement encore active et dirigée contre l’antigène. En particulier ce double suivi, permettrait d’identifier si l’évolution de certaines PTM post-administration est liée à la dégradation de l’anticorps ou bien à la clairance (élimination du système) sélective du mAb non modifié. La caractérisation simultanée des PTM et de la concentration d’inflximab actif à partir de sérum permettrait donc de mieux appréhender le devenir de cette thérapie.

La méthode analytique CE-MS/MS développée a pu être appliquée pour des analyses *in vivo* de sérums de patients atteints de la maladie de Crohn et traités par inflximab. Au préalable, la quantification a été validée suivant les réglementations instaurées par l’EMA. Cette validation, basée sur l’analyse de sérums modèles sains dopés par des concentrations connues d’inflximab et du SIL-IFX, a permis de prouver l’exactitude des résultats quantitatifs, et la caractérisation simultanée des PTM.

Ces travaux ont fait l’objet d’une publication dans la revue à comité de lecture *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

Publication: Simultaneous quantification and structural characterization of monoclonal antibodies after administration using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry

Tessa Reinert, Rabah Gahoual, Nathalie Mignet, Alexandre Kulus, Matthieu Allez, Pascal Houzé, Yannis-Nicolas Francois

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

2023, 233, 115446.
10.1016/j.jpba.2023.115446

Abstract:

Monoclonal antibodies (mAbs) are demonstrating major success in various therapeutic areas such as oncology and the treatment of immune disorders. Over the past two decades, novel analytical methodologies allowed to address the challenges of mAbs characterization in the context of their production. However, after administration only their quantification is performed and insights regarding their structural evolution remain limited. For instance, clinical practice has recently highlighted significant inter-patient differences in mAb clearance and unexpected clinical responses, without providing alternative interpretations. Here, we report the development of a novel analytical strategy based on capillary zone electrophoresis coupled to tandem mass spectrometry (CE-MS/MS) for the simultaneous absolute quantification and structural characterization of infliximab (IFX) in human serum. CE-MS/MS quantification was validated over the range 0.4-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ corresponding to the IFX therapeutic window and achieved a LOQ of 0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1.5 nM) while demonstrating outstanding specificity compared to the ELISA assay. CE-MS/MS allowed structural characterization and estimation of the relative abundance of the six major N-glycosylations expressed by IFX. In addition, the results allowed characterization and determination of the level of modification of post-translational modifications (PTMs) hotspots including deamidation of 4 asparagine and isomerization of 2 aspartate. Concerning N-glycosylation and PTMs, a new normalization strategy was developed to measure the variation of modification levels that occur strictly during the residence time of IFX in the patient's system, overcoming artefactual modifications induced by sample treatment and/or storage. The CE-MS/MS methodology was applied to the analysis of samples from patients with Crohn's disease. The data identified a gradual deamidation of a particular asparagine residue located in the complementary determining region that correlated with IFX residence time, while the evolution of IFX concentration showed significant variability among patients.

8.1. Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) and their derivatives, such as fusion proteins or antibody-drug conjugates, have been very successful as therapeutic treatments and have contributed significantly to the emergence of the biopharmaceutical industry. Their field of application was initially focused

on oncology, but therapeutic mAbs have also proven to be particularly relevant for the treatment of various types of immune disorders. For instance, Crohn's disease is an inflammatory bowel disease resulting from overexpression of the tumor necrosis factor (TNF- α), a pro-inflammatory cytokine of the immune system [224–227]. In order to reduce inflammation and limit the manifestation of clinical symptoms in patients, several mAbs have been successfully used as therapeutic treatments [228,229], of which infliximab (IFX) is currently the most widely used [207,230,231]. IFX is a chimeric immunoglobulin G (IgG1) containing a murine variable region, with a molecular mass of 147 kDa [52]. IFX inhibits TNF- α activity by direct interaction, or by triggering antibody-dependent cellular cytotoxicity and complement dependent cytotoxicity [3,6,232].

As the introduction of IFX for the treatment of Crohn's disease is relatively recent, knowledge about the evolution of mAbs after their administration to patients remains relatively limited. Thus, clinical practice suggests that patients may respond differently to treatment in several aspects [164,165]. After administration of an equivalent dose, some patients have shown significantly higher clearance, resulting in IFX concentration $< 1.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 14 days, while in a small proportion of the treated population, the mAbs can be detected in the serum several months after administration [233]. Similarly, approximately 1/3 of patients failed to show any clinical improvement and some populations exhibited a loss of clinical response over time that remains unexplained to date [165,234]. Previous *in vitro* studies have shown that post-translational modifications (PTMs) can affect the biological activity of mAbs [12]. In the case of therapeutic mAbs, asparagine deamidation [235], aspartate isomerization and N-glycosylation [236,237] have been identified as hotspots with respect to their impact on mAb bioactivity. PTMs located in CDR parts of mAbs may potentially affect their antigen binding affinity [18,238], whereas modifications localized in F_c parts could affect their cytotoxic activity [28,147] or serum half-life time [26,29]. Therefore, it might be suggested that poor clinical response could potentially be triggered by certain PTMs occurring *in vivo*. *In vivo* PTMs of mAbs was observed after administration to monkeys [16], but it remained unclear whether they could be responsible for loss of response. Currently, clinical follow-up of patients during treatment only includes monitoring of serum IFX concentration which is performed exclusively using ELISA immunoassay [239]. ELISA assays are fast and easy to use, however they may exhibit specificity issues, potentially leading to false positive or negative results [240,241], and cannot provide information regarding the structure of IFX [242]. In addition, mAb quantification, typically in the range of 0.5-14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, achieved using ELISA methods may potentially exhibit uncontrolled biases because of the absence of internal standard to normalize eventual component loss during washing steps for example [197].

Mass spectrometry (MS) has gradually taken a leading role in the structural characterization and quantification of proteins due to its optimal specificity, sensitivity and

structural information [243,244]. Liquid chromatography hyphenated to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) represents the most commonly used technique for the analysis of peptide mixtures [245]. The use of heavy-isotope labeled internal standards enabled the accurate and robust quantification of proteins in biological matrices using MS through normalization of experimental variabilities due to sample preparation and analysis [175]. Capillary zone electrophoresis (CZE) has recently demonstrated to be particularly relevant for peptide separation. Indeed, the electrophoretic migration generated in CZE enables the separation of analytes with different charge states in solution and/or different hydrodynamic radii [154]. Thereby, CZE is suitable for the separation of short or polar peptides, such as glycopeptides, in parallel with longer and more apolar ones in the same analysis [110]. Therefore, the hyphenation of CZE to MS has recently proven to be particularly relevant for the characterization of the primary structure of mAbs [96,109,141], with the possibility to achieve 100 % sequence coverage using a single analysis [110].

In the present work, we have designed and implemented a novel CZE-MS/MS method for the absolute quantification and simultaneous characterization of the primary structure of IFX in serum samples from Crohn's disease patients. A specific sample preparation protocol was developed to extract IFX from biological samples while ensuring optimal compatibility with the subsequent CZE-MS/MS analysis. A full method validation was performed to demonstrate the characteristics of the developed CZE-MS/MS method. Furthermore, the CZE-MS/MS data were used to characterize the N-glycosylation of IFX in biological samples by differentiating the structure and relative abundance of glycans. The data could also be used to characterize different PTMs for which an innovative normalization methodology was incorporated to avoid the introduction of bias regarding the estimation of the modification levels. Finally, the CZE-MS/MS analytical workflow was applied to a series of serums from patients treated with IFX for Crohn's disease, highlighting that the structural characterization of mAb after administration could be essential to understand variations in clinical response. The aim of the study was to provide an accurate analytical strategy delivering in biological samples, simultaneous quantification of IFX and PTMs characterization post-administration. The CE-MS/MS strategy could be further applied in a cohort study for instance to investigate if clinical loss of response might be associated with specific PTMs.

8.2. Materials and methods

- **Chemicals.** Chemicals used were of high purity grade and purchased from Merck Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) if not stated otherwise. IFX (IFX, Remicade®) samples are EMA/FDA-approved formulation purchased from the manufacturer (Merck Sharp and Dohme). RapiGest SF surfactant was purchased from Waters (Milford, MA). biotinylated TNF- α from R&D

System was obtained from Biotechne. Sequencing Grade Modified Trypsin was purchased from Promega Corporation, (Madison, WI, USA). PBS solution (Phosphate buffer saline) was purchased from Gibco ThermoFisher as tablets for reconstitution in water.

- **Standards and QCs with blank serums.** Blank serums were provided by the French institute of blood (Paris, France) after extraction and purification from total blood. Calibration samples and quality control (QC) samples were prepared by spiking known concentrations of IFX to the blank serum for method evaluation.

- **Serum from Crohn's disease patients.** Serum samples from 24 patients were obtained from the gastro-enterology department of Saint-Louis hospital (Paris, France). The patients had been diagnosed with Crohn's disease for at least 3 months and were receiving regular IFX injections. Gender, age and time since last IFX administration prior to serum collection were indicated. 100 μL of serum per patient was collected, and the SIL-IFX internal standard (1 μg) was added.

- **Sample preparation.** Spiked serums used as calibrants, and patient serums were prepared in exactly the same manner. For IFX affinity purification, 217 μL of Streptavidin M-280 DynabeadsTM (Fisher scientific Invitrogen, Carlsbad, CA) were washed with PBS solution. 148 μL of biotinylated TNF- α (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added and the mixture was left at RT for 1h. Excess biotinylated TNF- α was removed by three consecutive washes with PBS. Afterward, a volume of 100 μL of serum was added to the functionalized magnetic beads and the mixture was left at RT for 1 hour to ensure optimal capture of IFX and SIL-IFX by the immobilized TNF- α . After incubation, the serum was removed and 50 μL of MeOH/H₂O/FA mixture (48.5/48.5/3; v/v/v) was added before incubation for 10min. The supernatant was collected, and this step was repeated. Supernatants were pooled and dried for 2 hours using a miVac DNA concentrator systemTM (Genevac), at 35°C. The sample was reconstituted in 70 μL of 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8). The last step followed a denaturation-reduction-alkylation-digestion protocol commonly used for protein digestion [119]. Extracted mAbs were denatured with 5 μL of RapiGest SFTM at 0.1%, at 80°C for 10 min. Consequently, 10 μL of 50 mM dithiothreitol was added and the sample was left at 80°C for 20 min to reduce disulfide bridges. The solution was cooled to room temperature, and 10 μL of 50 mM iodoacetamide was added. The sample was incubated in the dark for 20 min to perform cysteine alkylation. 1 μL of trypsin 0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was introduced to the sample and left at 20°C for 2 h. 1 μL of trypsin was again added prior incubation at 37°C overnight. Afterward, 1 μL of formic acid 98% was added to quench the reaction. The peptide mixtures were finally evaporated and reconstituted in 5 μL ammonium acetate 100 mM, pH 4.

▪ **CZE-ESI-MS/MS.** Experiments were performed using a CESI8000® Capillary Electrophoresis system (Sciex separations, Darmstadt, Germany) coupled by mean of a sheathless CE-ESI-MS interface to a Sciex 5600 TTOF mass spectrometer (Darmstadt, Germany) operated by Analyst® software (Sciex, Darmstadt, Germany). A detailed description of this interface was provided by Haselberg *et al.*(2010) [246]. Separation was performed using a homemade bare-fused silica capillary (total length 100 cm; 30 µm i.d.), the outlet end of which was etched with hydrofluoric acid [247], resulting in a 2-cm porous tip positioned inside the cannula of the sheathless interface. The cannula was filled through a second capillary (total length 80 cm; 50 µm i.d.) with background electrolyte (BGE) consisting of 10 % acetic acid to maintain electrical contact between the CE inlet and outlet electrodes [84]. Concerning CZE-ESI-MS/MS conditions, a preconcentration step by transient isotachopheresis was implemented by injecting the peptide digest reconstituted in a leading electrolyte of ammonium acetate (pH 4), which is more conductive than the BGE. The analytes were therefore first focused in the capillary and then separated by zone electrophoresis. 68 nL of sample was injected hydrodynamically (5 psi, 100 sec) and a voltage of 23 kV was applied. The total analysis time is 60 min. The ESI source parameters were set as follows: ESI voltage 1.5 kV, while gas supplies (GS1 and GS2) were turned off, source heating temperature 100 °C, and curtain gas value 2. Experiments were performed in Top20 information-dependent acquisition (IDA, Sciex), and the accumulation time was 250 ms for MS scans and 80 ms for MS/MS scans, leading to a total duty cycle of 1.9 s. Mass/charge (m/z) range was for 100–2000 in MS and 50–2000 for MS/MS. SIL-IFX with arginine and lysine residues labeled with (¹³C; ¹⁵N) was used as an internal standard for quantification to correct for variability originating from sample preparation. DILLTQSPAILSVPGER (LC01) was selected as the peptide for quantification because it is strictly specific to IFX, which was verified using a blast with a human database [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>], and the absence of known PTMs. LC01 was therefore located in IFX variable part and was found to be specific to this mAb. Data were obtained as .wiff and were analyzed through Skyline software. The peak ratio (IFX/SIL-IFX) were calculated using this software.

▪ **CE-MS/MS quantification method validation.** The quantification method was validated using blank serum spiked with known concentrations of IFX and stable-isotope labeled infliximab (SIL-IFX) internal standard. Statistical validation of the method was performed in order to comply with both European medicines agency (EMA) and food and drug administration (FDA) guidelines [160,161]. Indeed, both guidelines are mainly similar, but there are minor differences regarding the threshold of acceptance criteria or methodology [162]. Therefore, for each parameter, the most stringent criteria and the largest number of replicates were systematically applied. For linearity assessment, 5 calibration curves were carried out over 6 concentration points over a time span of

3 months. QC samples spiked with IFX at 4 different concentrations (QC1:0.5; QC2:1.5; QC3:12 and QC4:19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were analyzed, representing a total of 12 replicates for each QC level, divided into 4 separate batches run on different days. The trueness and precision calculated from the QC sample replicates were expressed as percent bias, and relative standard deviation (RSD%), respectively. LOD and LOQ were estimated by signal-to-noise ratio (>3 for LOD and >10 for LOQ). The selectivity of the method was determined using 6 blank human serum samples by extraction of the m/z corresponding to the LC01 peptide and expressed as a percentage of the IFX's LOQ signal. Specificity was tested in triplicate using serum spiked with adalimumab, etanercept and cetuximab at $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, alongside with IFX at $19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and compared to serum spiked with IFX alone. Matrix effects were studied using the post-extraction addition protocol. MS signal of IFX ($1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in a standard solution of H_2O , was compared to a post-extraction solution spiked with the same concentration. The matrix factor of IFX (IFX peak area in the presence of matrix divided by IFX peak area in the absence of matrix) was divided by that of SIL-IFX. The stability of the peptide mixture was evaluated by 3 freeze and thaw cycles. After each freeze/thaw cycle, samples were analyzed with CE-MS/MS. Stability was also determined for storage in the autosampler (10°C). Three replicates were stored in the autosampler and injected into the CE-MS/MS instrument every 2 hours. The effect of hemolysis, lipemia and icterus on IFX quantification was evaluated. IFX-free serums with these characteristics were provided by the Lariboisière hospital (Paris, France). IFX concentration back-calculation was evaluated after spiking at $19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the same samples were then analyzed by ELISA assay using a Promonitor® IFX kit, following the supplier's instructions. Correlation between ELISA and CE-MS/MS quantification results was determined using linear regression analysis.

▪ **Relative Quantification of PTMs.** The m/z of ions corresponding to peptides containing PTM hotspots were extracted from the MS and MS/MS data. Thus, 6 glycans (G0F, G1F, G2F, G0FN and M5) were characterized in addition to 6 amino acid PTMs: 4 asparagine deamidations (N^{57} (heavy chain: HC), N^{137} (light chain: LC), N^{158} (LC) and N^{387} (HC)) and 2 aspartate isomerizations (D^{283} (HC) and D^{404} (HC)). The localization of the different PTMs on IFX amino acid sequence was represented in Figure 8.S1. They were selected because they represented PTM hotspots of the studied mAbs [17,18,193]. For a monitored amino acid (e.g. labeled "L"), its level of modification, obtained by CE-MS/MS analysis, in IFX and SIL-IFX compounds, was determined for spiked serums ($L_{\text{ref}}^{\text{IFX}}$ and $L_{\text{ref}}^{\text{SIL}}$) and patient serums ($L_{\text{p}}^{\text{IFX}}$ and $L_{\text{p}}^{\text{SIL}}$).

Table 8.1. Expression of the different steps potentially affecting the PTM levels of IFX and SIL-IFX

		<i>PTM level generated at each stage of mAbs life</i>			<i>PTM level measured by CE-MS/MS analysis</i>
		Production	Patient administration	Sample preparation	
Spiked serums (ref)	IFX	$f_{\text{prod}}^{\text{IFX}}$		$f_{\text{prep A}} (1 - f_{\text{prod}}^{\text{IFX}})$	$L_{\text{ref}}^{\text{IFX}} = \sum \text{steps}$
	SIL-IFX	$f_{\text{prod}}^{\text{SIL}}$		$f_{\text{prep A}} (1 - f_{\text{prod}}^{\text{SIL}})$	$L_{\text{ref}}^{\text{SIL}} = \sum \text{steps}$
Patient serums (p)	IFX	$f_{\text{prod}}^{\text{IFX}}$	$f_{\text{blood}}^{\text{IFX}} (1 - f_{\text{prod}}^{\text{IFX}})$	$f_{\text{prep B}} (1 - f_{\text{prod}}^{\text{IFX}})(1 - f_{\text{blood}}^{\text{IFX}})$	$L_{\text{p}}^{\text{IFX}} = \sum \text{steps}$
	SIL-IFX	$f_{\text{prod}}^{\text{SIL}}$		$f_{\text{prep B}} (1 - f_{\text{prod}}^{\text{SIL}})$	$L_{\text{p}}^{\text{SIL}} = \sum \text{steps}$

L_{X}^{Y} : Level of modification of the PTM “L”, for the analyte “Y” (IFX or SIL-IFX) that occurred in the step “X”

$f_{\text{ref}}^{\text{Y}}$: Level of modification of the PTM “L”, for the analyte “Y” (IFX or SIL-IFX) that is observed in CE-MS/MS analysis of a healthy serum spiked with IFX and SIL-IFX

f_{p}^{Y} : Level of modification of the PTM “L”, for the analyte “Y” (IFX or SIL-IFX) that is observed in CE-MS/MS analysis of a patient serum spiked with SIL-IFX

The normalization strategy was developed to remove possible endogenous structural changes due to sample preparation and/or storage. The proportion of induced PTM is given in Table 8.1 for the 3 different steps that IFX and SIL-IFX undergo during their lifetime. Table 8.1 also includes (last row) the final level of this PTM, measured by CE-MS/MS, which corresponds to the sum of each step. It can be noted that the sample preparation affects similarly IFX and SIL-IFX in the same sample but differently in two distinct samples ($f_{\text{prep A}}$ and $f_{\text{prep B}}$) to address errors associated with pipette volumes or CE-MS/MS analysis. $f_{\text{blood}}^{\text{IFX}}$ represents the proportion of the studied amino acid that underwent modification during the residence time in the patient's body. As only infliximab is administrated to patients, the corresponding SIL-IFX case is grayed out. Normalization consists of extracting $f_{\text{blood}}^{\text{IFX}}$ from data collected by CE-MS/MS (last row), which led to the equation (1), using Mathematica® software (Wolfram).

Level of PTM of an amino acid “L” occurring in blood of patients (%) = (8.1)

$$f_{\text{blood}} = \frac{L_{\text{p}}^{\text{IFX}} - L_{\text{ref}}^{\text{IFX}} - L_{\text{p}}^{\text{SIL}} + L_{\text{ref}}^{\text{IFX}} L_{\text{p}}^{\text{SIL}} + L_{\text{ref}}^{\text{SIL}} - L_{\text{p}}^{\text{IFX}} L_{\text{ref}}^{\text{SIL}}}{1 - L_{\text{ref}}^{\text{IFX}} - L_{\text{p}}^{\text{SIL}} + L_{\text{ref}}^{\text{IFX}} L_{\text{p}}^{\text{SIL}}}$$

Bilateral statistical tests were performed to determine whether the $f_{\text{blood}}^{\text{IFX}}$ calculated for each patient’s serum was significantly different from the 30 spiked serums used as controls. The p-value corresponding to the probability that this hypothesis is true was calculated by applying a Welch’s two-tailed t-test. The critical value for the p-value to be considered unlikely was 0.05.

8.3. Results and discussion

8.3.1. CE-MS/MS method development and validation

The designed analytical workflow, represented in Figure 8.1, consisted of the specific extraction of IFX and the stable-isotope labeled infliximab (SIL-IFX) internal standard from serum. The extraction was performed using recombinant TNF- α immobilized on in-house prepared ferromagnetic beads. Accordingly, the extracted IFX and SIL-IFX underwent digestion, and the resulting peptide mixture was then separated and analyzed by high sensitivity CE-MS/MS analysis. Method development was performed using blank serums spiked with known concentrations of IFX and SIL-IFX. The spiked serums were used to complete the validation of the CE-MS/MS quantification method and to demonstrate the ability to characterize different types of PTMs, including IFX N-glycosylation, Asn deamidation and Asp isomerization, from the same experiment.

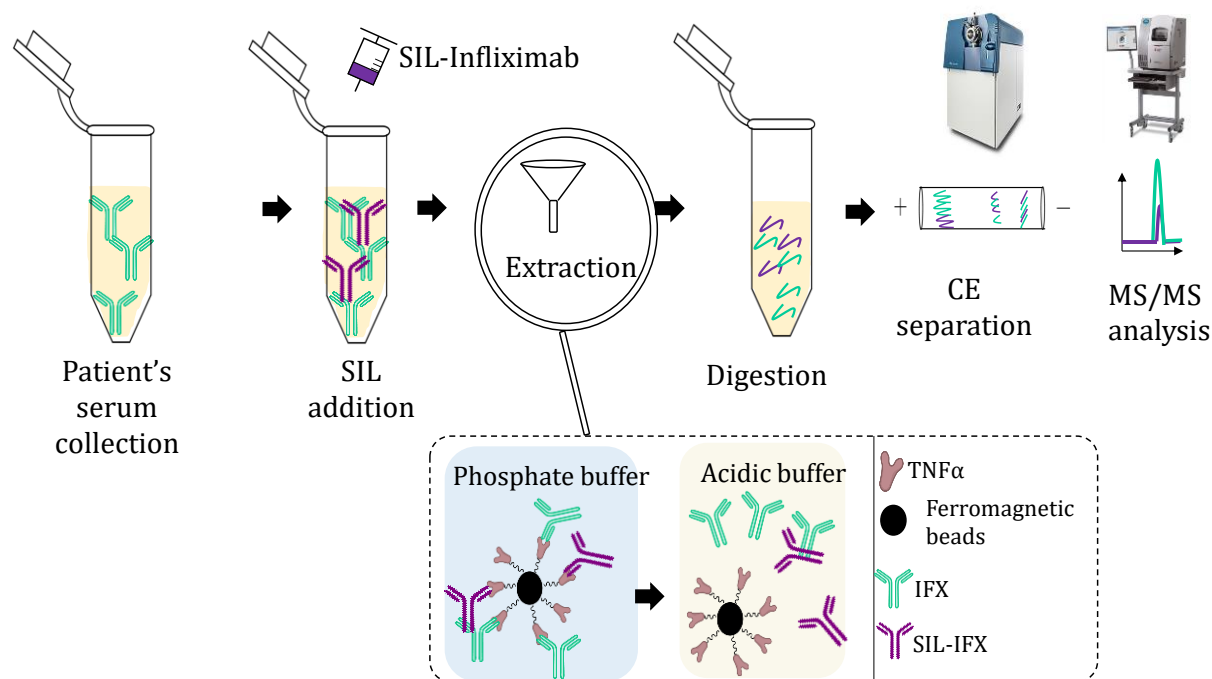


Figure 8.1. Schematic representation of the analytical workflow developed for the absolute quantification and structural characterization of infliximab in human serum using CE-MS/MS analysis.

Quantification of IFX was performed using a label-free method based on the MS signal corresponding to the LC01 peptide, which was selected because it is proteotypic for IFX (Table 8.2). For each CE-MS/MS analysis, unambiguous peptide identification was provided by high-resolution m/z ratio measurement in addition to the peptide fragment fingerprint (Figure 6.2, chapter 6). Statistical validation of the CE-MS/MS quantification method was conducted to determine the performance of the analysis. The linearity of the method was demonstrated over the

concentration range 0.4-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 8.S2). This range corresponds to the concentrations typically observed in IFX-treated patients [248].

In addition, the CE-MS/MS analysis allowed to achieve a LOD of 0.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (0.4 nM) and a LOQ of 0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1.5 nM) respectively (Table 8.2). The method was found to be selective as the interferences in blank serums remained less than 15% of the LOQ signal of IFX. The CE-MS/MS method was applied to serums spiked with other biotherapeutics (adalimumab, etanercept and cetuximab). The bias from the nominal IFX concentration for spiked serums was $2.1 \pm 1.3 \%$. Thus, it was concluded that CE-MS/MS quantification was not significantly affected by the presence of other biotherapeutics, although adalimumab and etanercept also target TNF- α . They were most likely extracted concomitantly during sample preparation but could not further interfere as the LC01 peptide was strictly specific to IFX. The results highlighted the outstanding specificity of the IFX proteotypic peptide quantification delivered by the CE-MS/MS method.

Trueness and precision were estimated using quality control (QC) samples (Table 8.2) for intra-day and inter-day replicates. RSD for replicates and biases from the nominal concentration were systematically below 15% underscoring the appropriate accuracy of the method. The experiments showed that matrix effects remained limited with values lower than 15 % (Table 8.2). No carry-over could be observed when the analysis of the blank samples was performed immediately after the QC4 samples.

Table 8.2. *Compilation of the results obtained for the statistical validation of the CE-MS/MS method for the absolute quantification of infliximab.*

Sequence	DILLTQSPAILSVPGER (LC01)			
Concentration range	0.4-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			
Equation	0.1108 x – 0.027			
R ²	0.989			
LOD	0.06 \pm 0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			
LOQ	0.22 \pm 0.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			
Selectivity (n=6)	blank signal $\leq 2 \pm 2 \%$ IFX LOQ			
Specificity (%Bias) ^a	2.1 \pm 1.3 %			
Matrix effect ^b	$\leq 11 \pm 4 \%$			
Level of QC	QC1 (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	QC2 (1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	QC3 (12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	QC4 (19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>Intra-days statistics</i>				
Precision (RSD %) ^b	5.8	2.0	3.1	4.2
Trueness (% Bias) ^a	- 4.9	- 11.1	0.8	- 2.6
<i>Inter-days statistics</i>				
Precision (RSD %)	7.7	5.6	7.5	4.5
Trueness (% Bias)	7.0	- 6.4	9.6	- 0.9

^a % bias: determined as : (measured conc. – nominal conc.)/nominal conc. *100%.

^b RSD : determined as : standard deviation/ABS(mean). *100%.

Finally, the recovery was found to be above 85 % after three consecutive freeze-thaw cycles, illustrating the stability of the sample. Similarly, storage of a sample for 15h in the instrument autosampler did not influence the accuracy of the quantification with a bias from nominal concentration below 2 % (Figure 8.S3). As a consequence, the characteristics of the CE-MS/MS method determined from the statistical validation showed the validity of the absolute quantification of IFX.

Additional experiments were conducted to complement the method validation to further investigate the properties of the CE-MS/MS quantification method. CE-MS/MS quantification was performed on IFX-spiked icteric, hemolyzed and lipemic serums to assess the impact of sample type on the analysis. The different serum types considered represented common alterations that affect the general aspect of the serum and may alter matrix effects due to the presence of endogenous interfering compounds in the serum [249]. The results yielded an average bias from the nominal concentration of 3.0 %, 0.3 % and 0.7 % for hemolyzed, icteric and lipemic serums, respectively (Figure 8.2). Therefore, quantification by CE-MS/MS demonstrated excellent accuracy that was not affected by the type of serum analyzed. The same samples were also quantified using a commercial ELISA assay. As emphasized in Figure 8.2, the experiments exhibited significantly higher biases of 9.7 %, 4.3 % and 15.6 % for hemolyzed, lipemic and icteric serums respectively. It is noteworthy to mention that the ELISA quantification showed a systematic underestimation of IFX even in normal serum.

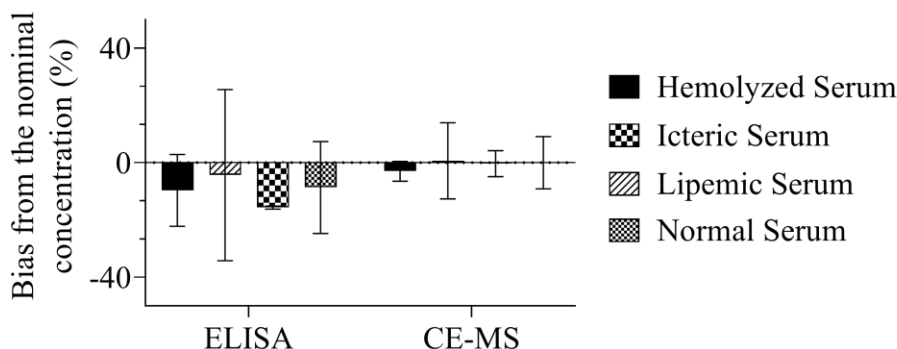


Figure 8.2. Infliximab quantification accuracy and repeatability for different types of spiked serums ($19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) measured using ELISA assay and CE-MS/MS analysis ($n=3$). Hemolyzed serum typically contained products of red blood cells lysis, lipemic serum exhibited an important turbidity due to the accumulation of lipoproteins and icteric serum contained an excess of bilirubin.

Previous reports described the possibility of using CE-MS/MS to characterize mAbs amino sequence, N-glycosylation and amino acid PTMs in a single analysis [154]. CE-MS/MS analysis achieved a sequence coverage of 90 %. Only a single long peptide composed of 63 amino acids could not be identified due to poor ionization, however it did not present any PTMs hotspots. From this observation, we studied the possibility of characterizing IFX N-glycosylation in serum

samples simultaneously with quantification using CE-MS/MS data. Indeed, CE-MS/MS quantification method is derived from a quantitative proteomics methodology, hence the collected MS and MS/MS data also include IFX peptides exhibiting PTMs. IFX contains a single N-glycosylation site located in the HC constant domain of the mAb. Characterization of the N-glycosylation was achieved through the intermediate of the glycopeptide EEQYNSTYR [156]. CE-MS/MS data demonstrated robust characterization of the 6 major glycans for spiked serums with IFX concentrations above $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 7.1, chapter 7). The processing of the MS/MS spectra allowed systematic characterization of the glycosylation structure. MS signals corresponding to the glycopeptide bearing different glycans were considered in order to estimate the relative abundance of the different glycans. The CE-MS/MS glycoprofiles were established for IFX-spiked serum samples and compared to IFX commercial solution (Figure 8.3). CE-MS/MS glycoprofiles showed no significant differences between the commercial IFX solution and the spiked serum samples, demonstrating the reliability of the relative quantification of glycosylation delivered by the analytical workflow. In addition, the IFX glycoprofile was similar to previous reports performed on the commercial IFX product [156,250]. The level of performance achieved in the characterization of N-glycosylation was explained by the ability to partially separate glycopeptides bearing different glycosylation thanks to the electrokinetically driven separation of CZE (Figure 7.1, chapter 7). As a result, the glycopeptides are gradually transferred to the ESI ionization source, resulting in optimal sensitivity. Finally, because the characterization was performed at the glycopeptide level, independent localization and characterization could be envisaged even in the case of mAbs incorporating multiple glycosylation sites.

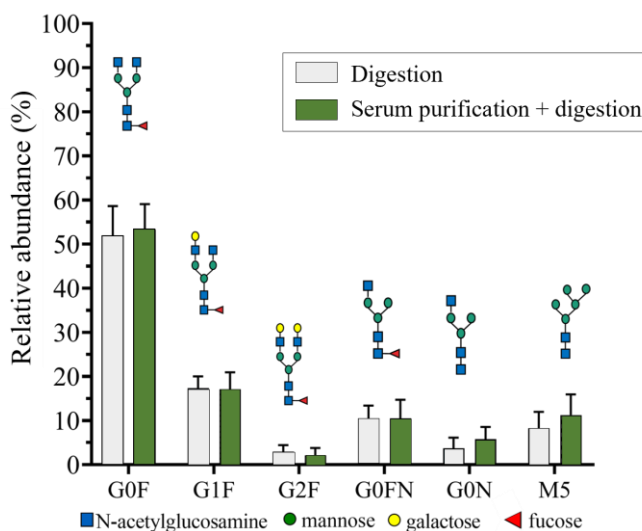


Figure 8.3. Glycoprofile of IFX obtained using CE-MS/MS method developed for spiked serum (green bars, $n=30$) and for IFX commercial product (white bars, $n=15$). The structure of the glycan linked to the Asn of the EEQYNSTYR peptide is presented above each bar. Error bars presents the standard deviation among the replicates.

Similarly to N-glycosylation, the possibility of performing hotspot characterization of amino acid PTMs simultaneously to IFX quantification was investigated. The study focused on 4 asparagine deamidations (N^{158} LC, N^{137} LC, N^{387} HC and N^{57} HC) and 2 aspartate isomerizations (D^{283} HC and D^{404} HC) mentioned in the literature to potentially affect mAb activity [251]. CE-MS/MS data obtained from IFX-spiked serums demonstrated the successful characterization of the 6 PTMs of interest in a reproducible manner, concomitantly to IFX quantification and N-glycosylation characterization. The selectivity of CE allowed a systematic baseline separation of modified peptides from their unmodified counterparts (Figure 8.S4), which enabled to perform the relative quantification despite MS isotopic profiles overlap. Indeed, asparagine deamidation involved a mass difference of only 0.98 Da whereas aspartate isomerization did not induce any mass difference. As a consequence, it is essential to separate the two peptides before their transfer to the MS instrument to provide optimal sensitivity and, in the case of isomerization, to distinguish peptides carrying different aspartate isomers. The MS signals corresponding to the intact peptide and its modified counterpart could be used to determine the levels of modification for each PTM independently. The modification levels measured for the different PTMs by CE-MS/MS analysis were compared for IFX-spiked serums and IFX commercial product. Results showed no significant differences between the IFX commercial product and serum samples spiked with IFX, demonstrating that serum purification did not introduce bias into the analysis (Figure 8.4).

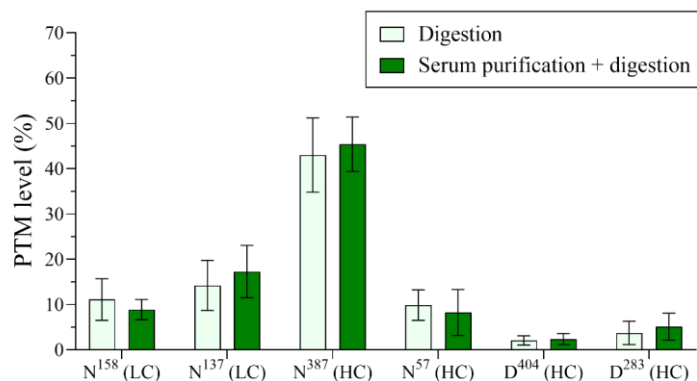


Figure 8.4. Modification level determined using CE-MS/MS analysis for 4 asparagine deamidations and 2 aspartate isomerization in the case of IFX spiked serums (green bars, $n=30$), or in IFX commercial product (white bars, $n=15$). Error bars represent the standard deviation between replicates.

As a result, the developed CE-MS/MS analytical strategy demonstrated adequate accuracy and repeatability for the quantification of IFX in biological samples through extensive method validation. Especially, the analytical strategy delivered substantial specificity that resulted in the absence of interferences, even for samples containing other types of biopharmaceuticals or in the case of altered serum samples. Furthermore, the quantification of IFX by CE-MS/MS was found to be as efficient as, if not better than, the ELISA quantification which is currently the reference method for this type of analysis. To our knowledge, this is the first time that the CE-MS technique

has been described for the absolute quantification of a protein. Concomitantly, the structure of the N-glycosylation could be unambiguously characterized, and their relative abundance estimated from serum samples with IFX, using the same CE-MS/MS data. The major glycosylations successfully detected by the CE-MS/MS method represented more than 90% of the IFX content [156]. Since the characterization was performed at the glycopeptide level, independent localization and characterization could be envisaged even in the case of mAbs incorporating multiple glycosylation sites. Finally, the CE-MS/MS method has demonstrated the possibility of simultaneously characterizing faint amino acid PTMs in a relevant and accurate manner. For every quantitative and structural aspect considered, the performance of the CE-MS/MS method was fully compatible with the characterization of IFX for serum samples from patients treated for Crohn's disease. The ability to quantify a protein in a complex biological sample together with an advanced characterization of its primary structure has never been described before and represents a significant advance from an analytical chemistry perspective. This level of performance was achieved due to the excellent sample preparation protocol developed, which allowed optimal compatibility with CE-MS/MS analysis, in addition to the relevant characteristics of the CE separation mechanism and state-of-the-art CE-MS coupling. Quantification of IFX in patient serums has been performed by ELISA assays [252] or by LC-MS/MS [175,196,253], but never in conjunction with structural characterization. Structural assessment of IFX PTMs has mostly been done for biosimilarity assessment and production control [250,254,255]. This is the first time that such level of characterization is demonstrated under conditions consistent with analysis directly after drug administration to patients.

8.3.2. CE-MS/MS analysis of patient serums treated using IFX

The CE-MS/MS analytical workflow was consequently applied to 24 IFX-treated serums from patients diagnosed with Crohn's disease. The CE-MS/MS analysis was performed to quantify free IFX in patient serums in addition to the structural characterization in terms of N-glycosylation and amino acid PTMs. The CE-MS/MS data allowed the successful quantification of IFX for all patient samples (Table 8.S1). Among the 24 patient serums characterized, 7 were found at concentrations above $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and required prior dilution to fit within the calibration range. Patient samples were also quantified using a commercially available ELISA assay to confirm the validity of the CE-MS/MS results (Table 8.S1). The comparison of CE-MS/MS and ELISA analyses, shown in Figure 8.5, exhibited a good correlation ($R^2 = 0.963$) between the two techniques. However, a limited tendency towards lower quantification in the case of ELISA assay compared to CE-MS/MS analysis could be observed. This difference was consistent with the systematic underestimation provided by ELISA assay that could be observed during method development (Figure 8.2). El

Amrani *et al.* (2016) also described a similar trend when comparing LC-MS/MS analysis with the ELISA assay [175]. They attributed this discrepancy to the ELISA assay, which requires two distinct interactions of IFX, one with the plate, and the other with the detection reagent. Therefore, the experimental procedure could lead to a biased quantification in case of suboptimal interactions with either of the two required interactions. In contrast, the affinity extraction procedure designed in our case for sample preparation required only a single high-affinity interaction, in addition to the CE-MS/MS analysis which was systematically normalized with the SIL-IFX internal standard.

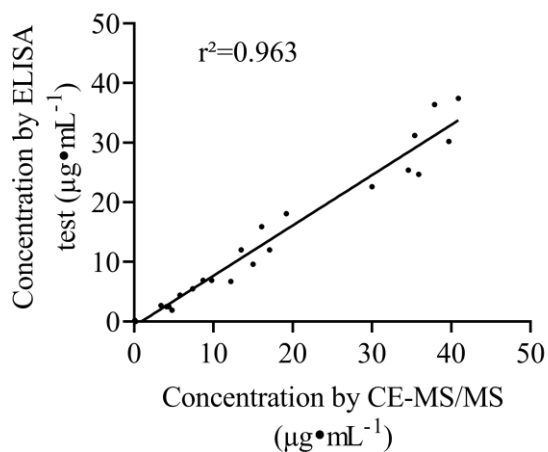


Figure 8.5. Comparison of the quantification of IFX achieved in patient serums using ELISA assay versus CE-MS/MS analysis (n=24). Linear regression is presented.

For the characterization of IFX N-glycosylation and amino acid PTMs, only 3 out of the 24 available samples exhibited an IFX concentration lower than 4 µg·mL⁻¹ and were therefore not considered because the performance of the CE-MS/MS method could not be guaranteed, as demonstrated during method development. In addition, IFX may experience artifactual modifications, for example due to sample storage and/or preparation, which could potentially alter the reliability of the structural characterization. For example, endogenous deamidation of asparagine may be generated during proteolytic digestion due to the use of ammonium bicarbonate at mildly alkaline pH [125,256]. The digestion protocol was not modified because the alkaline pH provided the maximum enzymatic activity necessary to achieve an optimal LOQ. However, the objective of the CE-MS/MS method was to characterize the structural changes and to determine the levels of modifications occurring after administration to the patient. As a consequence, an innovative normalization method was developed to systematically subtract artifactual modifications and provide an accurate estimate of the levels of PTMs generated during the residence time of IFX in the patient's system. Figure 8.6 summarizes the implemented normalization strategy. For each PTM, the level of endogenous modification was determined for IFX and SIL-IFX internal standard using CE-MS/MS analysis on calibration samples. Afterward, the modification level strictly due to IFX residence in the system of the patient could be calculated by comparing the CE-MS/MS analysis of the calibrants and patient serums. The mathematical

expression of each parameter (Figure 8.6) enabled the establishment of equation 1, which provides a systematic normalization the level of modification occurring during the residence time of IFX in the patient's organism (cf. material and methods).

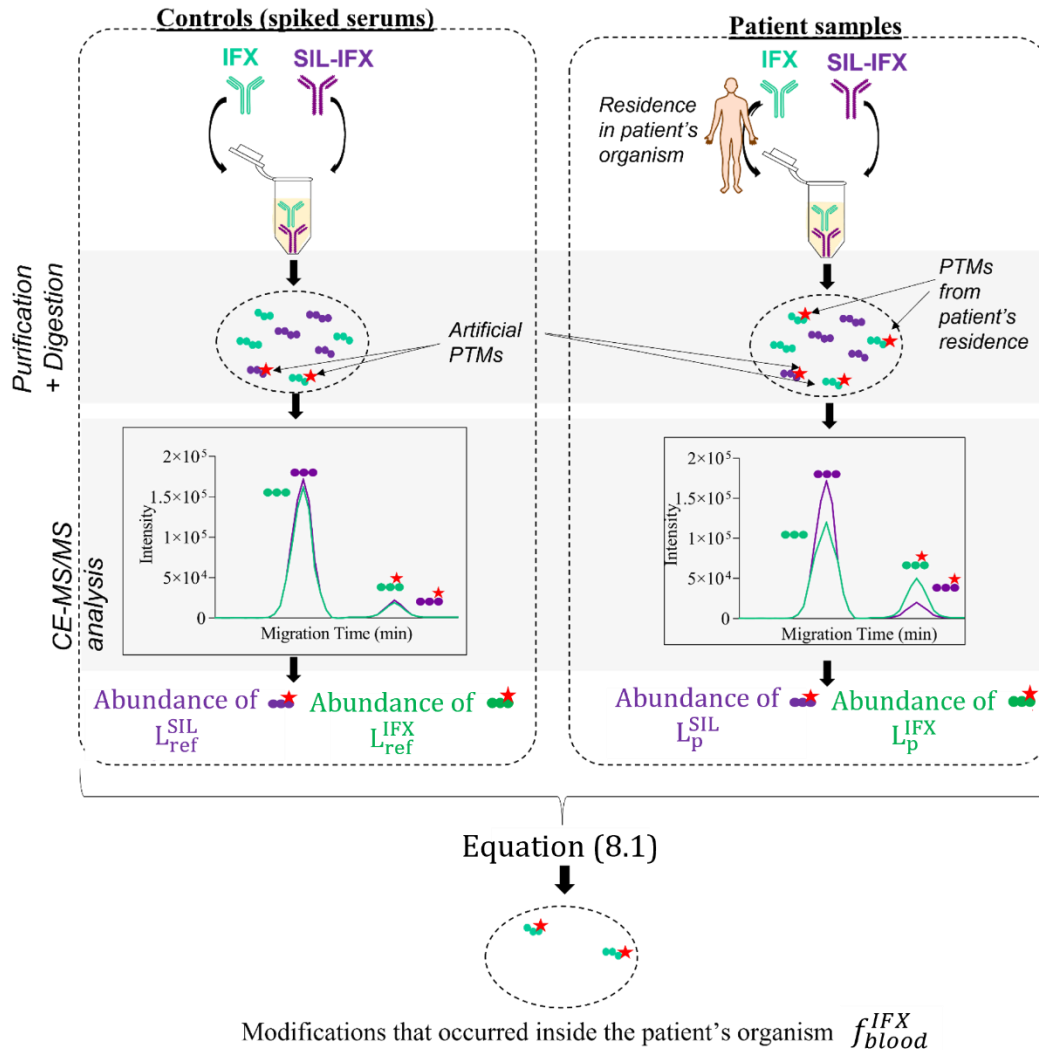


Figure 8.6. Schematic representation of the procedure for the determination of the level of modification of an amino acid due to IFX residence in a patient's organism (f_{blood}^{IFX}). The strategy for normalization of PTM levels included CE-MS/MS analysis of the peptide of interest in the case of IFX (L_p^{IFX}) and SIL-IFX (L_p^{SIL}) in the patient's serum (left-hand panel) and similarly for IFX (L_{ref}^{IFX}) and SIL-IFX (L_{ref}^{SIL}) in spiked serums (right-hand panel) in order to obtain the parameters required to calculate (f_{blood}^{IFX}) using Equation 8.1 (Cf. experimental section, and Figure 8.S5 and 8.S6 for SIL-IFX information).

Concerning IFX N-glycosylation, CE-MS/MS analysis characterized the 6 major glycosylations for serum samples from IFX-treated patients, and the MS data could be used to perform their relative quantification (Table 8.S2). Using the CE-MS/MS data, the variation of the abundance of each glycosylation during the IFX residence time in the organism of patients was calculated by applying equation 8.1 (Figure 8.7). Regarding patient samples, the overall dispersion between the different samples was consistent with the dispersion of the IFX-spiked serums used as controls

and reflected the standard variation of the CE-MS/MS method observed previously (Figure 8.3). For the different types of glycans, a Welch's t-test was conducted to determine whether the relative abundance was significantly different in the patient serums compared to the control samples, without assuming equal variances [257]. The results, compiled in Table 8.3, demonstrated that the hypothesis that the two groups were statistically similar was rejected for G1F, G0N, G0FN and M5, indicating a statistical difference (p -value < 0.05). Especially, patient samples presented 6-12 % lower M5 abundance than the mean value of control samples. In the case of G0FN proportion, patient serums were approximately 5 % lower than controls. Thus, the CE-MS/MS results indicate that the glycodistribution of IFX was slightly altered after administration, independent of the patient. This observation could potentially be due to several IFX glycoforms exhibiting faster clearance, leading to more rapid elimination of the concerned glycans. Goetze *et al.* (2011) have shown that high-mannose glycan have faster serum clearance than other glycan forms, which is in agreement with the results observed Figure 8.7 [258].

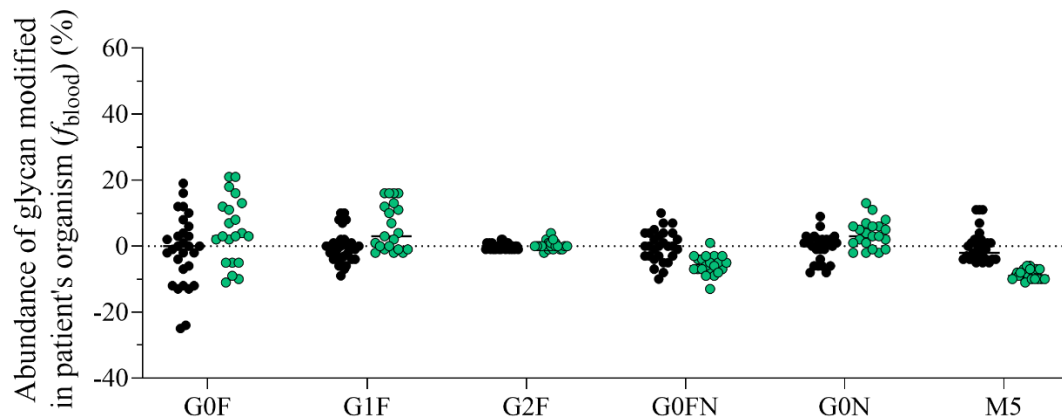


Figure 8.7. Glycan relative abundance variations for IFX during residence in patient's blood after normalization measured using CE-MS/MS analysis. Green dots = patients' serums ($n=21$). Black dots = controls ($n=30$) that did not incubated in a human's blood.

Regarding asparagine deamidation and aspartate isomerization, CE-MS/MS analysis demonstrated consistent characterization of the different PTM hotspots for the 21 patient serums considered (Table 8.S3). As with N-glycosylation, equation 1 was applied for normalization to estimate the level of modification occurring during the residence time of IFX in the patient's system. The results, represented in Figure 8.8, showed the absence of significant levels of modification for the amino acids N^{137} , N^{158} , N^{387} , D^{283} and D^{404} . In addition, Welch's t-tests yielded p -values > 0.05, proving that the control samples and patient serums were not significantly different (Table 8.3). Several studies have investigated the conditions affecting PTMs, such as pH, temperature or humidity. Typically, harsh conditions were used to generate significant degradations in a short amount of time, but did not necessarily reflected conditions after administration [245,250]. Therefore, environmental conditions of IFX consequently to administration did not affect some hotspot PTMs that are nevertheless observed under extreme conditions.

In the case of N⁵⁷ deamidation, the analysis of patient serums exhibited significantly higher levels of modification and important dispersion compared to the spiked serums (Figure 8.8), which was confirmed by a p-value indicating significant differences (Table 8.3). Thus, CE-MS/MS analysis revealed that N⁵⁷ deamidation was occurring during IFX residence time. The residue N⁵⁷ is located in the complement determining region (CDR) of IFX, which interacts directly with TNF- α [211]. Therefore, deamidation of this residue to aspartate could potentially alter the interaction of IFX with the corresponding antigen. Concerning Crohn's disease patients, the anteriority since the last IFX administration at the time of blood sampling was provided. To further understand the evolution of IFX, the concentration measured in the patient serums and the level of N⁵⁷ modification were plotted against the anteriority of the administration. As illustrated in Figure 8.9.a, the remaining IFX concentration was not influenced by the anteriority of the injection. However, CE-MS/MS analysis demonstrated a gradual deamidation of the N⁵⁷ residue to aspartate as the IFX residence time was increased (Figure 8.9.b). This effect could not be observed for the other asparagine residues suggesting a specific sensitivity of the amino acid N⁵⁷. Also, the amount of N⁵⁷ deamidation was not related to the concentration of IFX in the characterized sample.

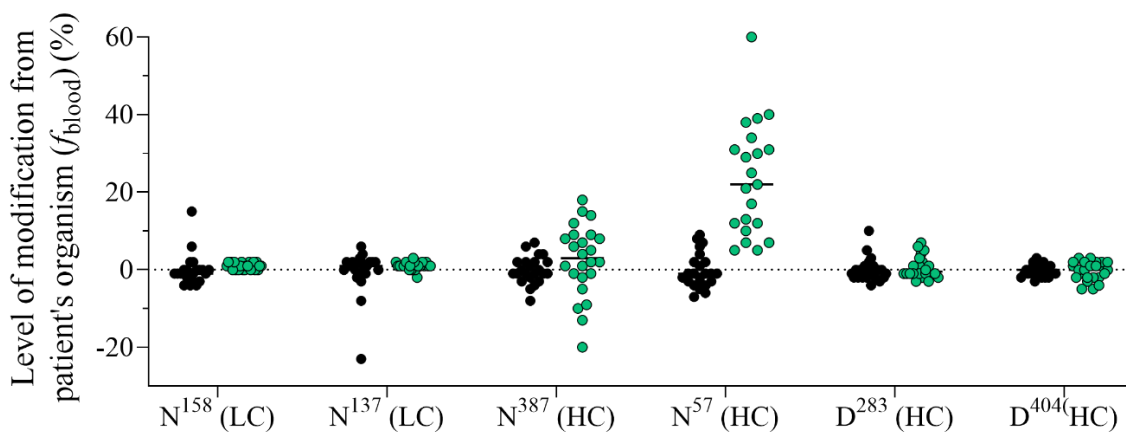


Figure 8.8. Proportion of PTMs induced to IFX during residence in patient's blood L_{blood} , ($n=21$) (green dots) compared to the values found in spiked serum taken as controls (black dots). For asparagine (N), the modification monitored was deamidation, and for aspartate residues (D) the modification was isomerization.

Currently, the clinical follow-up of IFX-treated patients is performed by ELISA assay, which strictly focuses on the evolution of mAb concentration after administration. The CE-MS/MS analytical workflow demonstrated accurate quantification of IFX in patient serums, in addition to characterizing N-glycosylation and amino acid PTMs hotspots. The advanced clinical follow-up provided by CE-MS/MS demonstrated that monitoring IFX concentration may not be sufficient to fully understand the complex dynamics regarding IFX evolution post-administration. Indeed, even if the IFX concentration is successfully maintained within the therapeutic range over an extended period of time, PTMs potentially affecting the potency of the biomolecule could occur, especially since mAbs have a significantly prolonged serum half-life. Therefore, the CE-MS/MS

methodology, which provides simultaneous absolute quantification and advanced characterization of PTMs, represents a relevant analytical methodology to study the outcome of mAbs at an unprecedented level.

Table 8.3. P-values calculated from Welch's t-test applied on patient serums compared to IFX spiked samples used as controls (degree of freedom = 22, $\alpha = 0.05$). Data of the two groups were compared for each PTMs monitored in this study, with p-value < 0.05 indicating a significant difference between the two groups.

	<i>p-value</i>
N-glycosylation	
G0F	1.0E-01
G1F	5.0E-04
G2F	1.4E-01
G0FN	1.8E-07
G0N	2.0E-03
M5	6.3E-08
Amino acid PTMs	
N ⁵⁷	1.5E-07
N ¹⁵⁸	2.4E-01
N ¹³⁷	3.9E-01
N ³⁸⁷	2.3E-01
D ²⁸³	3.7E-01
D ⁴⁰⁴	7.9E-01

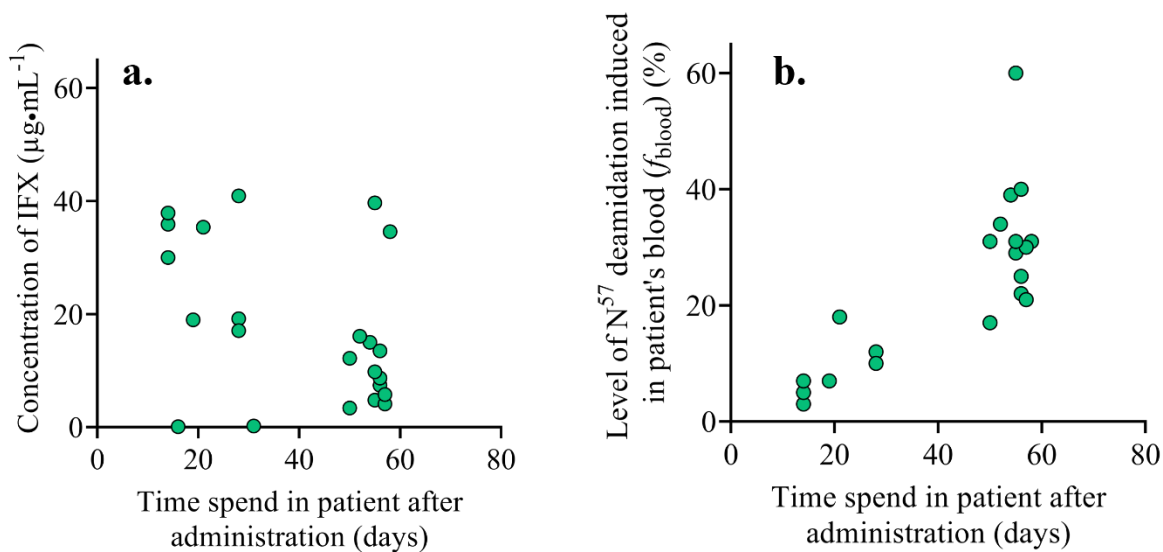


Figure 8.9. a. Evolution of the concentration of Infliximab in patient serums with anteriority of the administration to patient (n=23). **b.** Evolution of the deamidated level of N⁵⁷ with anteriority of the administration to patient (n=21).

8.4. Conclusion

In the present work, we developed a novel analytical strategy based on CE-MS/MS analysis in order to simultaneously perform absolute quantification of IFX, characterization of the 6 major N-glycosylations and 6 hotspots amino acid PTMs in serum samples in a single analysis. The validation of the CE-MS/MS method demonstrated relevant analytical performances for the analysis of serum samples from IFX-treated patients, especially regarding specificity and sensitivity. The results obtained proved the feasibility of absolute protein quantification using CE-MS/MS analysis. Thus, the developed analytical workflow provided an accurate quantification while avoiding matrix effects, that may potentially interfere in the case of ELISA assay. Consequently, the CE-MS/MS workflow was applied to the analysis of serum samples collected from patients treated for Crohn's disease using IFX. The experimental results provided a reliable quantification of IFX. Concerning the structural characterization, an original data treatment methodology was developed to confidently estimate the level of PTMs that occurred exclusively during IFX residence time in the organism of patients. Thus, CE-MS/MS data allowed the identification of structural modifications of IFX occurring following its administration to the patient. In particular, the analysis of patient serums using the CE-MS/MS method developed identified a correlation showing progressive deamidation of the residue N⁵⁷ which had the particularity of being located in the CDR of IFX. However, the evolution of the IFX concentration exhibited an important variability from patient-to-patient and could not be correlated with the residence time of the protein in the system of the patient.

CE-MS/MS analytical strategy demonstrated the possibility to reach an additional dimension of characterization regarding the evolution of therapeutic proteins after administration. In addition, it is the first time that protein absolute quantification in biological samples could be realized concomitantly to structural characterization regarding PTMs. The analytical strategy described could represent a promising alternative in order to realize an advanced follow-up of patients treated with therapeutic mAbs. Nevertheless, the elaborated multi-characterization offered by this method would be particularly relevant for research, especially for a cohort study in order to better understand the outcome of mAbs after administration. Disparities in clinical response among patients are not yet fully understood and could be elucidated by a method that simultaneously links PTM levels of hotspots and infliximab levels. The opportunity to obtain such comprehensive information in a single analysis could significantly reduce the biases and errors associated with the need for multiple workflows to independently obtain quantification, N-glycosylation and amino acid PTMs characterization.

Finally, further research could enable to investigate the impact of the PTMs on the bioactivity of therapeutic mAbs in order to potentially interpreting the complex behavior of this type of treatment and attributing the occurrence of unusual clinical responses. The CE-MS/MS analysis can also be transposed in a straightforward manner to other types of mAbs which in this case also illustrates the potential of mAbs comprehensive follow-up using this methodology.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank every person that contributed to the achievement of this article, especially the Professor M. Allez (Chief of Service Gastro-enterology, Inserm U1160, Hospital Saint Louis, France) that provided serum samples of the cohort and Victor Chardiny for his help. They thank Armand Leclerc for his helpful discussions, and his help for the normalization strategy. They also thank Antony Lechner for his great contribution in the beginning of this project. This research work was supported by the Agence National de la Recherche as part of the project MethAmAbs (project no. ANR-19-CE29-0009).

8.5. Supporting Information

Heavy Chain

EVKLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASGFIFS NHWMNWVRQS PEKGLEWVAE IRSKSN⁵⁷SAT HYAESVKGRF TISRDDSKSA
 VYLQMTDLRT EDTGVYYCSR NYYGSTYDYW GQGTTLVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS
 WNSGALTSKV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDHEDPEVKFNW YVD²⁸³GVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIKAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESN³⁸⁷GQP ENNYKTTTPV
 LDS⁴⁰⁴GSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

Light Chain

DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQFVG SSIHWYQQRN NGSPRLLIKY ASESMSGIPS RFGSGSGTD FTLSINTVES EDIADYYCQQ
 SHSWPFTFGS GTNLEVKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLN¹³⁷NFY PREAKVQWKV DN¹⁵⁸ALQSGNSQ ESVTEQDSKD
 STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECK

Figure 8.S1. Amino acid sequence of infliximab. In red are presented the 6 amino acids PTMs sites studied and glycan site N³⁰⁰. The sequence observed by the CE-MS/MS method is underlined.

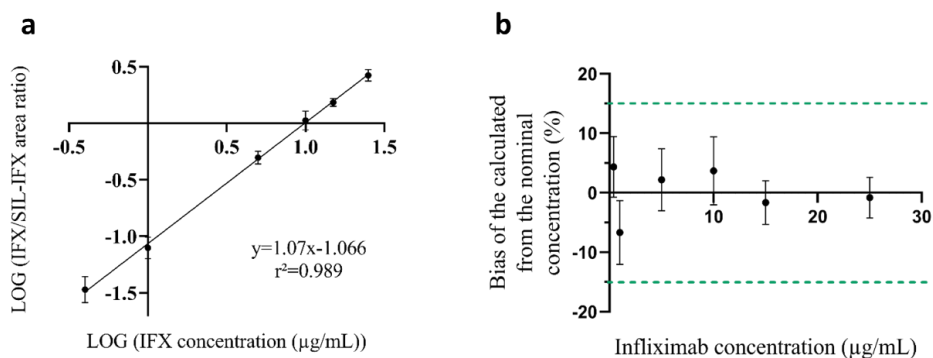


Figure 8.S2. Linearity of the quantification's method. **a.** Calibration curve obtained for Infliximab over the range 0.4-25 µg·mL⁻¹, for 5 replicates per concentrations. Logarithm of both axes was applied. R²=0.989, standard error (SE)= 0.01, slope 1.07. **b.** Trueness of the back calculated concentrations of the calibration curves. Green dotted lines: acceptability limit defined by EMA guideline. Error bars present the standard deviation among the replicates. Workflow of the Infliximab's analysis in serum.

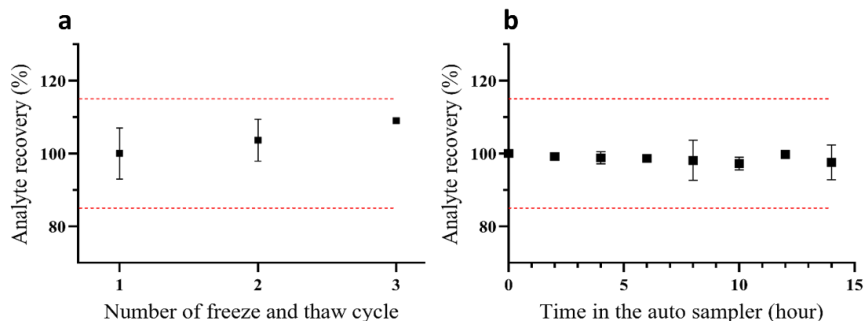


Figure 8.S3. Stability of the peptide's mixture (after total workflow Figure 5.1) at high QC ($19\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in different conditions: **a.** Freeze and thaw cycles **b.** Short-term stability in auto sampler at 10°C . Error bars present the standard deviation among the 3 replicates.

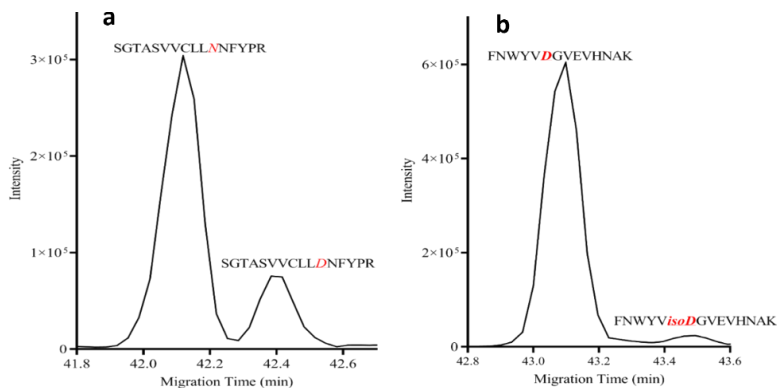


Figure 8.S4. Separation of modified peptide from unmodified one for **a.** deamidation of N^{137} (LC) and **b.** isomerization of D^{283} (HC) using Capillary Electrophoresis. Red amino acid is the one going through modification.

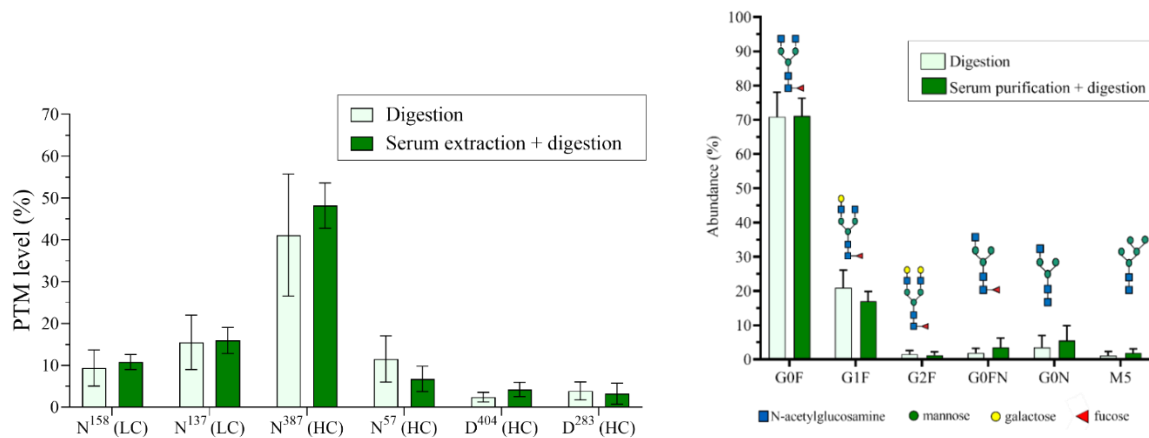


Figure 8.S5. Level of 4 asparagine deamidations and 2 aspartate isomerization obtained in SIL-IFX in spiked blank serum (green bars, $n=30$, L_{ref}^{SIL}), or in pure product digested (white bars, $n=15$). Error bars presents the standard deviation among the replicates.

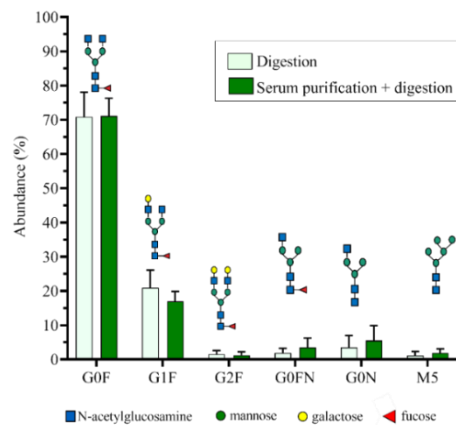


Figure 8.S6. Glycoprofile of SIL-IFX in spiked blank serum (green bars, $n=30$, L_{ref}^{SIL}), or in pure product digested (white bars, $n=15$). The structure of the glycan linked to the N of the EEQYNSTYR peptide is presented above each bar. Error bars presents the standard deviation among the replicates.

Table 8.S1. Concentration of IFX in the 24 serums of patients measured by CE-MS/MS or ELISA assays.

	<i>Concentration of IFX found with CE-MS/MS method ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)</i>	<i>Concentration of IFX found with ELISA assay ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)</i>
Patient n°1	4.8	1.9
Patient n°2	37.9	36.4
Patient n°3	39.7	30.2
Patient n°4	34.6	25.4
Patient n°5	30	22.6
Patient n°6	19.2	18.1
Patient n°7	4.1	2.5
Patient n°8	4.4	2.5
Patient n°9	7.4	5.5
Patient n°10	17.1	12
Patient n°11	8.7	6.9
Patient n°12	5.8	4.4
Patient n°13	9.8	6.9
Patient n°14	35.9	24.7
Patient n°15	3.4	2.7
Patient n°16	15	9.6
Patient n°17	40.9	37.4
Patient n°18	12.2	6.7
Patient n°19	16.1	15.9
Patient n°20	13.5	12.0
Patient n°21	35.4	31.2
Patient n°22	0.1	0.2
Patient n°23	0.1	0.1
Patient n°24	0.2	0

Table 8.S2. Relative abundance of the 6 glycan of Infliximab of the 21 patients. This level corresponds to the measured one in CE-MS/MS analysis (L_p^{IFX})

	G0F	G1F	G2F	G0FN	G0N	M5
Patient n°1	56%	16%	3%	10%	12%	3%
Patient n°2	57%	31%	3%	3%	2%	5%
Patient n°3	63%	20%	3%	4%	8%	2%
Patient n°4	67%	18%	1%	6%	7%	1%
Patient n°5	58%	33%	2%	1%	5%	2%
Patient n°6	59%	19%	1%	5%	11%	4%
Patient n°7	68%	18%	0%	5%	9%	0%
Patient n°8	53%	33%	2%	3%	4%	5%
Patient n°9	61%	29%	4%	2%	3%	2%
Patient n°10	62%	15%	1%	6%	12%	5%
Patient n°11	50%	27%	4%	3%	17%	0%
Patient n°12	54%	19%	2%	7%	13%	5%
Patient n°13	59%	17%	1%	10%	9%	3%
Patient n°14	54%	31%	1%	5%	5%	4%
Patient n°15	63%	22%	6%	0%	9%	0%
Patient n°16	61%	26%	5%	3%	5%	0%
Patient n°17	58%	31%	3%	3%	2%	2%
Patient n°18	59%	20%	3%	6%	12%	0%
Patient n°19	67%	16%	2%	4%	11%	0%
Patient n°20	59%	20%	2%	7%	12%	1%
Patient n°21	61%	28%	1%	2%	5%	3%

Table 8.S3. Relative abundance of the 6 other PTMs of Infliximab of the 21 patients. This level corresponds to the measured one in CE-MS/MS analysis (L_p^{IFX})

	N¹⁵⁸ (LC)	N¹³⁷ (LC)	N³⁸⁷ (HC)	N⁵⁷ (HC)	D²⁸³ (HC)	D⁴⁰⁴ (HC)
Patient n°1	11%	13%	62%	65%	4%	3%
Patient n°2	12%	13%	60%	14%	5%	3%
Patient n°3	12%	16%	57%	36%	7%	1%
Patient n°4	11%	15%	48%	37%	4%	3%
Patient n°5	11%	17%	56%	17%	6%	0%
Patient n°6	17%	24%	56%	23%	3%	1%
Patient n°7	13%	14%	56%	36%	12%	3%
Patient n°8	17%	18%	65%	17%	4%	1%
Patient n°9	13%	10%	54%	34%	6%	1%
Patient n°10	16%	17%	61%	17%	4%	0%
Patient n°11	17%	20%	67%	26%	7%	2%
Patient n°12	15%	19%	64%	27%	6%	0%
Patient n°13	13%	14%	59%	38%	11%	1%
Patient n°14	11%	10%	54%	10%	3%	1%
Patient n°15	16%	14%	58%	21%	16%	2%
Patient n°16	17%	13%	59%	46%	3%	0%
Patient n°17	12%	13%	55%	22%	8%	0%
Patient n°18	15%	14%	56%	37%	5%	1%
Patient n°19	16%	17%	58%	41%	7%	2%
Patient n°20	13%	11%	53%	46%	5%	3%
Patient n°21	12%	16%	50%	26%	4%	1%

CHAPITRE 9.

PREDICTION DES PTM POST-ADMINISTRATION DU PRODUIT ORIGINAL DE L'INFLIXIMAB ET DE SES BIOSIMILAIRES

Préambule

En 2022, parmi les 10 produits pharmaceutiques les plus vendus, 5 sont des anticorps monoclonaux (adalimumab, dupilumab, nivolumab, ustekinumab et pembrolizumab). Cette prédominance des anticorps thérapeutiques rend donc cruciale leur protection par brevet. Le nombre de dépôts de brevets relatifs aux mAbs à l'Office Européen des Brevets (OEB) a pratiquement doublé entre 2010 et 2017 [259]. Ces anticorps constituent une source de revenu importante pour les entreprises pharmaceutiques les produisant. En 2016, l'infliximab (Remicade®, MSD) a atteint la 7^{ème} place du médicament le plus onéreux pour l'assurance maladie en France, avec plus de 260 millions d'euros remboursés par la Sécurité sociale cette année-ci. Ces chiffres mettent en évidence la raison pour laquelle les sociétés pharmaceutiques déposent des brevets pour ces produits. Or, les brevets ont une durée de validité de près de 20 ans, et sont donc passés dans le domaine public pour la première génération d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. Il est alors possible pour les entreprises tierces de produire des biosimilaires à ces anticorps originaux de référence à moindre coût, permettant de réduire les frais des traitements pour les patients [260]. Afin d'assurer la sécurité et l'efficacité du traitement, les biosimilaires doivent néanmoins être soumis à une étude de biosimilarité particulièrement rigoureuse. En effet, les autorités européennes et américaines ont établi des réglementations en termes de CQA pour assurer de la similitude des biosimilaires envers le produit original de référence [142,261]. La biosimilarité de produits peut s'avérer compliquée à établir pour des mAbs de grande complexité structurale, comme dans le cas de l'Ertibux®, dont aucun biosimilaire n'est commercialisé [262].

L'infliximab (Remicade®, Janssen Biologics) fut le premier mAb à se voir obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de biosimilaires en Europe en 2013, avec Remsima® ou Inflectra®, développé par Celltrion (Incheon, South Korea). En 2016, un nouveau biosimilaire de l'infliximab, Flixabi® (Samsung Bioepis), fait son apparition et très récemment Zessly® (Sandoz GmbH) est commercialisé en France aussi. La structure de ces anticorps biosimilaires est très proche de celle du produit original. Pour commencer, tous doivent avoir exactement la même séquence d'acides aminés, et présenter des niveaux similaires de PTM après production. Le Remsima® et l'Inflectra® étant les premiers biosimilaires mis sur le marché, de nombreuses études ont permis leur comparaison rigoureuse avec le Remicade® [250,263]. Après évaluation de

la biosimilarité des produits purs, des dégradations forcées sont généralement mises en œuvre, par stress thermiques, mécaniques ou encore chimiques, afin d'étudier la stabilité du produit au cours du temps [264,265]. Ces conditions de stress sont beaucoup plus extrêmes que celles rencontrées par le produit thérapeutique lors de sa manufacture, son transport, son stockage ou encore sa manipulation par le médecin, mais permettent, par l'exagération des dégradations, de déterminer les conditions d'utilisation et de conservation du produit.

Dans la partie précédente, nous avons pu mettre en évidence que l'infliximab subit des PTM *in vivo*, après administration dans l'organisme des patients. Nous avons notamment pu démontrer qu'une asparagine localisée sur une zone CDR de cet anticorps présente une déamidation progressive en fonction du temps passé de la biomolécule dans la circulation sanguine du patient. La quantification de la concentration d'infliximab biodisponible dans l'organisme des patients semble indiquer que la proportion de cette déamidation progressive n'est pas due à une pharmacocinétique différente du mAb non modifié, mais bien à une PTM *in vivo*.

Ces résultats ont montré la nécessité d'aller au-delà de la simple quantification, mais également de suivre l'évolution structurale des biosimilaires et du produit original de référence, afin de s'assurer d'une dégradation post-administration similaire. L'étude de biomolécules *in vivo* est particulièrement difficile à mettre en place, notamment au vu de la disponibilité d'échantillons, et de la complexité à engager une analyse de cohorte. Il est donc apparu essentiel de développer des méthodologies *in vitro*, c'est-à-dire en dehors du système vivant, capables de prédire les dégradations structurales des mAbs thérapeutiques après leur administration [223]. Des études ont démontré que l'incubation *in vitro* de mAbs thérapeutiques dans des sérums modèles sains à 37°C entraîne des proportions et cinétiques d'apparition de PTM (*deaN*, *oxiM*, *isoD*...etc.) similaires aux données *in vivo* [266]. De façon analogue à l'évaluation de la stabilité des produits lors de leur stockage en simulant les contraintes de stress, cette approche vise à recréer au mieux les conditions environnementales du corps du patient pour évaluer la stabilité du mAb après son administration. Ainsi, ce chapitre vise à présenter les travaux suivants ;

- Une approche permettant la simulation des conditions environnementales de l'organisme des patients a été mise en place. Cette approche permet le suivi cinétique des PTM sur l'infliximab suite à son incubation dans ces conditions spécifiques. Les PTM induites au cours de cette incubation ont été quantifiées, après adaptation de la stratégie de normalisation établie au chapitre 7 ;
- L'approche a alors permis de comparer la stabilité post-administration des biosimilaires de l'infliximab ;
- Puis, les données *in vitro* ont été confrontées à celles issues de l'analyse des patients pour démontrer la validité de l'approche.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue à comité de lecture *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

Publication: Post-translational modifications comparative identification and kinetic study of infliximab innovator and biosimilars in serum using capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry

Tessa Reinert, Pascal Houzé, Nathalie Mignet, Yannis-Nicolas Francois, Rabah Gahoual

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

2023, 234, 115541

[10.1016/j.jpba.2023.115541](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115541)

Abstract:

Despite reports indicating the potential impact of post-translational modifications on the activity of a monoclonal antibody, their prediction or monitoring post-administration remains a challenge. In addition, with the expiration of patents concerning the early generation of mAbs, the production of biosimilars is constantly increasing. Structural differences of biosimilars compared to the innovator product are commonly evaluated for the formulated product in the context of biosimilarity assessment. However, estimating their structural outcome after administration is particularly difficult. Due to the complexity of *in vivo* studies, there is a need to develop analytical strategies to predict PTMs consequently to their administration and their impact on mAbs potency.

Here, we identified and evaluated the modification kinetics of 4 asparagine deamidations and 2 aspartate isomerizations of infliximab innovator product (Remicade®) and two biosimilars (Inflectra® and Remsima®) *in vitro* using serum incubation at 37°C. The methodology was based on a bottom-up approach with capillary electrophoresis hyphenated with mass spectrometry analysis for an unequivocal assignment of modified and unmodified forms. 2 asparagines demonstrated a gradual deamidation correlated with incubation time. The specific extraction efficiency was evaluated to determine possible changes in the antigen binding affinity of infliximab with the incubation. Results showed the possibility to achieve an additional aspect concerning biosimilarity assessment, oriented on the study of the structural stability after administration.

9.1. Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) and their related formats, including bispecific antibodies and antibody-drug conjugates, are showing a tremendous interest as therapeutic treatments. As a result, mAbs represent the fastest growing category of pharmaceutical products. More than 100 therapeutic mAbs are currently approved, and 12 have been approved for the first time in 2022 [195]. In addition, several patents for the first generation of mAbs have recently entered the public domain. Therefore, the production of biosimilar mAbs, defined by regulatory authorities as an

equivalent product containing the active substance of an original biopharmaceutical product, is of growing interest [142].

Based on immunoglobulin G (IgG), mAbs are tetrameric glycoproteins that exhibit a wide range of microheterogeneity, due to their inherent structure, resulting in a significant number of variants. Indeed, mAbs can undergo different types of post-translational modifications (PTMs) during protein expression or storage, including asparagine deamidation (deaN), aspartate isomerization (isoD), or N-glycosylation. Some PTMs, defined as hotspots, can potentially impact the physicochemical properties, the structure and the conformation of mAbs. As a consequence, their occurrence can alter the biological activity and the pharmacological properties of mAbs. For instance, in the case of glycosylation, different studies have shown reduced receptor binding for mAbs glycoforms exhibiting core-fucose N-glycans [258,267]. Similarly, a decrease in the antigen-binding affinity of IgG1 mAbs due to the deamidation of an asparagine residue located in the complement determining region (CDR) of the light chain (LC), has been described [16,18]. In addition, changes in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) have been observed in the case of a specific *deaN* occurring in the constant domain (F_c) of a mAb [13,19,147]. Thus, the impact of PTMs on the biological activity of mAbs appears to depend on the localization and the nature of the modification. Therefore, PTMs require extensive characterization to identify their occurrence and to estimate their abundance, in order to ensure optimal efficacy and safety of the product. Regarding the development and approval of biosimilar candidates, the assessment of biosimilarity is achieved through detailed structural characterization and comparison to the innovator mAb. Especially, the comparison of the two products should emphasize the absence of differences concerning PTMs. In case of minor differences, further investigations are required to demonstrate the absence of significant impact on biological activity and toxicity in order for the product to be approved as a biosimilar [268].

Due to their structural complexity, significant research activities have been conducted in order to establish analytical methods that deliver a comprehensive characterization of mAbs structure, including PTMs. However, the described methods are strictly focused on production assessment or product stability studies [106,109]. Recent studies have shown that mAbs may undergo PTMs *in vivo* after administration of the product, which could potentially alter the efficacy of the therapeutic protein [15,16]. Thus, it appears crucial to characterize structural modifications of innovator mAbs, but also biosimilars, that will occur after injection of the product. Also, it is important to determine whether the modifications generated have an impact on the efficacy of the drug.

Infliximab (IFX) is a chimeric mAb targeting the tumor necrosis factor (TNF- α). In addition to the innovator product, several biosimilars have recently been approved. Previous studies have

evaluated the structural similarity between the formulation product of the innovator infliximab and the corresponding biosimilars [143,250], and after forced degradation of the mAbs [193,269]. However, studies predicting PTMs occurring after product administration are not yet described, mainly because they require structural analysis of mAbs present in serum, which contains important quantities of natural IgGs. Recently, we developed an analytical strategy based on capillary electrophoresis hyphenated to tandem mass spectrometry (CE-MS/MS), which allowed the absolute quantification and the characterization of mAbs PTMs extracted from serum using a specific purification protocol [270].

In the present work, the innovator product corresponding to infliximab (Remicade®) was characterized and compared to two biosimilar products (Inflectra® and Remsima®) concerning the occurrence of PTMs, after incubation in human serum at 37°C. After affinity extraction from serum samples, infliximab was characterized using CE-MS/MS to identify PTM hotspots and determine their modification levels. Four distinctive asparagine deamidations and two aspartate isomerizations, conventionally referred to as hotspots due to their potential impact on mAb properties, located on both the light chain (LC) and heavy chain (HC), were investigated. The study was designed to independently determine the modification kinetics for the different PTMs over time, using conditions that mimic the post-administration environment of infliximab. To prevent the introduction of any bias and/or artifactual PTMs due to sample treatment or analysis, an innovative normalization strategy adapted to the determination of PTM modification levels, was applied. CE-MS/MS experiments allowed to achieve a comparative study of the different infliximab products regarding their stability after administration, demonstrating the need for this type of study to further extend biosimilarity assessment. Results obtained *in vitro* using model serum samples incubated under conditions that mimic the mAb environment were compared to samples collected from treated patients to demonstrate the relevance of the analytical approach in predicting the stability of the primary structure of mAbs after administration. Finally, the effect of a deamidation identified in the CDR region on the infliximab/TNF- α interaction was studied by means of specific extraction from serum.

9.2. Materials and methods

- **Chemicals.** Chemical used were of high purity grade and purchased from Merck Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) if not stated otherwise. Ultrapure water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA Purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). Infliximab innovator Remicade® (Merck Sharp and Dohme), biosimilar Inflectra® and Remsima® (Celltrion Healthcare) samples were EMA/FDA-approved formulations purchased from the manufacturer. Stable-isotope labeled infliximab (SIL-IFX) internal standard was

purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). RapiGest SF surfactant was purchased from Waters (Milford, MA). Streptavidin M-280 Dynabeads™ and biotinylated TNF- α were obtained from Fisher Scientific Invitrogen (Carlsbad, CA). Sequencing grade modified trypsin was purchased from Promega Corporation, (Madison, WI, USA). PBS (phosphate buffer saline) solution was purchased from Gibco ThermoFisher as tablets for reconstitution in water. Blank serums were provided by the French Institute of Blood (Paris, France). IFX stock solution at 1 g·L⁻¹ was prepared after reconstitution in H₂O milliQ and stored at -20°C.

- **Infliximab structural stability study in serum.** A volume of 1 mL of human serum was spiked with Remicade®, Remsima® or Inflectra® at a final concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and incubated at 37°C. Each sample was prepared in triplicate. A volume of 100 μL of each serum sample was collected after 2, 6, 30, 50 and 90 days of incubation. Consequently, 4 μL of SIL-IFX internal standard solution at 0.25 g·L⁻¹ were added before proceeding immediately with sample preparation.

- **Sample preparation.** Serum sample preparation was based on a protocol recently developed in our group [270]. Briefly, 217 μL of Streptavidin M-280 Dynabeads™ ferromagnetic beads were preincubated with 148 μL biotinylated TNF- α (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS) for 1 hour at 20°C. Then, the serums, previously spiked with SIL-infliximab were added to the beads and left for 1 hour at room temperature to allow any TNF- α antibody inhibitors to bind to the beads. A magnet was used to remove serum from the beads. Acidic dissociation of the mAbs from TNF- α was then performed by two consecutive washing steps using 50 μL MeOH/H₂O/FA: 48.5/48.5/3% solution. Supernatants were pooled and dried for 2 hours at 35°C using a miVac DNA Concentrator System™. The sample was reconstituted with 70 μL of ammonium bicarbonate buffer (50 mM, pH 8) and digested. A denaturation-reduction-alkylation-digestion workflow, commonly used for the digestion of mAbs into peptides, was performed [119]. Finally, the peptide digests were evaporated at 30°C for 2 hours, and then resuspended in 5 μL ammonium acetate 100 mM, pH 4.

- **Capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry analysis.** Peptide mixtures obtained from sample preparation were analyzed using a CESI8000® capillary electrophoresis system (Sciex separations, Darmstadt, Germany) coupled to a Sciex 5600 TOF mass spectrometer (Darmstadt, Germany) operated by Analyst® software (Sciex, Darmstadt, Germany). The hyphenation of CE with ESI-MS was made through a sheathless interface, consisting of two capillaries in the CE system. The separation is performed in a bare fused silica capillary (total length 100 cm; 30 μm i.d.), the outlet end of which was etched to make it porous using a home-made protocol [247]. A second capillary (total length 80 cm; 50 μm i.d.) is used to maintain electrical contact at the porous interface with the background electrolyte (BGE) composed of 10

% acetic acid. During the analysis, a transient isotachopheresis preconcentration step (t-ITP) was performed by injecting the peptide digest solubilized in a leading electrolyte of 100 mM ammonium acetate (pH 4), which is more conductive than the BGE. 68 nL of the peptide digest was injected hydrodynamically (5 psi, 100 sec) and a voltage of 23 kV was applied to the separation capillary. For the ESI source parameters, the applied ESI voltage was 1.5 kV, the source heating temperature was 100 °C, and the curtain gas was set to 2. Experiments were performed in Top20 information-dependent acquisition (IDA, Sciex) with a total duty cycle of 1.9 s during 60 min of analysis. The mass/charge (m/z) range was 100–2000 for MS and 50–2000 for MS/MS. The data were analyzed using Skyline software.

▪ **Post-translational modifications characterization and extraction yield determination.**

The presence of PTMs was systematically identified based on high-resolution m/z measurements provided by MS spectra and fragment characterization observed in MS/MS data collected from CE-MS/MS experiments. 6 distinct PTM hotspots were investigated: 4 asparagine deamidations (N^{57} (heavy chain: HC), N^{137} (light chain: LC), N^{158} (LC) and N^{387} (HC)) and 2 aspartate isomerizations (D^{283} (HC) and D^{404} (HC)). The proportion of each PTM was determined by integration of MS signals corresponding to unmodified peptides and their modified counterparts. To suppress any eventual artifactual modifications occurring during sample preparation, a PTM-specific normalization strategy previously implemented by our group was used [270]. Briefly, the SIL-infliximab internal standard added to the sample at the beginning of the workflow acted as a marker for endogenous modifications occurring during sample preparation and analysis (Figure 9.1). For an amino acid (here denoted “L”) of infliximab, which incubated at 37°C in serum (here denoted “sample”), its level of modification that occurred strictly during the *in vitro* incubation ($f_{incubation}^{IFX}$) is expressed by equation (9.1). The references values (ref) are necessary as the initial structure of SIL might differ from infliximab.

$$f_{incubation}^{IFX} = \frac{L_{sample}^{IFX} - L_{ref}^{IFX} - L_{sample}^{SIL} + L_{ref}^{IFX} L_{sample}^{SIL} + L_{ref}^{SIL} - L_{sample}^{IFX} L_{ref}^{SIL}}{1 - L_{ref}^{IFX} - L_{sample}^{SIL} + L_{ref}^{IFX} L_{sample}^{SIL}} \quad (9.1)$$

L_{sample}^{IFX} : Abundance of the modification of “L” found in CE-MS for the infliximab compound, in spiked serum incubated at 37°C.

L_{sample}^{SIL} : Abundance of the modification of “L” found in CE-MS for the SIL-infliximab compound, in spiked serum incubated at 37°C.

L_{ref}^{IFX} : Abundance of the modification of “L” found in CE-MS for the infliximab compound, in spiked serum immediately analyzed.

L_{ref}^{SIL} : Abundance of the modification of “L” found in CE-MS for the SIL-infliximab compound, in spiked serum immediately analyzed.

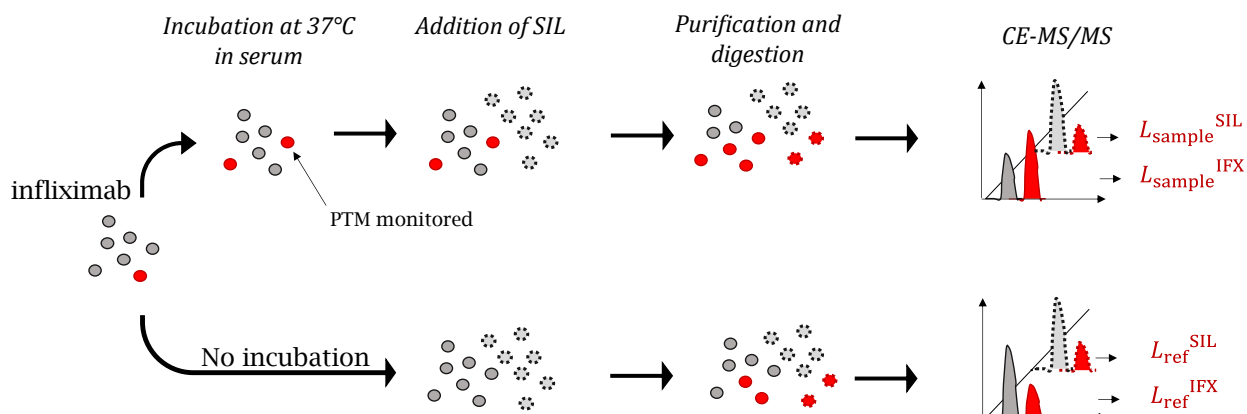


Figure 9.1. Schematic representation of the normalization approach for the relative quantification of PTM levels occurring during incubation.

The determination of the extraction efficiency was based on the monitoring of a dedicated tryptic peptide of infliximab and SIL-IFX, which possessed the particularity to be proteotypic for both compounds. The selected peptide was DILLTQSPAILSVPGER (LC01), located in the variable domain of infliximab, and its specificity to this antibody was verified by a blast search using a human database [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. The signal used for SIL-IFX monitoring corresponds to the same LC01 peptide, incorporating ^{13}C and ^{15}N isotope labeling for the arginine (R) amino acid (+10 Da). The extraction efficiency was estimated by comparing the infliximab/SIL-IFX signal ratio of the sample of interest (here infliximab-spiked serums that incubated at 37°C) of the reference sample (immediately analyzed infliximab spiked serum) and was expressed by the equation (9.2):

$$\text{Extraction efficiency (\%)} = 100 \frac{\left(\frac{A_{\text{LC01}}^{\text{IFX}}}{A_{\text{LC01}}^{\text{SIL}}}\right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{A_{\text{LC01}}^{\text{IFX}}}{A_{\text{LC01}}^{\text{SIL}}}\right)_{\text{reference}}} \quad (9.2)$$

$\left(\frac{A_{\text{LC01}}^{\text{IFX}}}{A_{\text{LC01}}^{\text{SIL}}}\right)_{\text{sample}}$ the infliximab/SIL-infliximab signal ratio found in the spiked serum incubated at 37°C . And $\left(\frac{A_{\text{LC01}}^{\text{IFX}}}{A_{\text{LC01}}^{\text{SIL}}}\right)_{\text{reference}}$: infliximab/SIL-infliximab signal ratio found in the spiked serum immediately analyzed.

9.3. Results and discussion

To investigate the possibility of studying *in vitro* the structural modification of infliximab after administration, the stability study was performed using blank serums spiked with either Remicade®, Inflectra® or Remsima®, incubated at 37°C to mimic physiological conditions. After incubation, as shown in Figure 9.2, SIL-infliximab internal standard was added to the sample. Consequently, a specific extraction of both infliximab and SIL-infliximab was performed using

TNF- α immobilized on ferromagnetic beads, followed by proteolytic digestion. Finally, the generated peptide mixture was characterized by CE-MS/MS analysis (see Materials and methods section). Spiked serums analyzed immediately without incubation were used as references to compare the extraction yield and the level of PTMs of incubated samples. Concerning the relative quantification of PTM levels, the normalization strategy (equation (9.1)) using the SIL-infliximab as a marker was applied to account for possible artifactual reactions that could occur during sample preparation (Figure 9.S1).

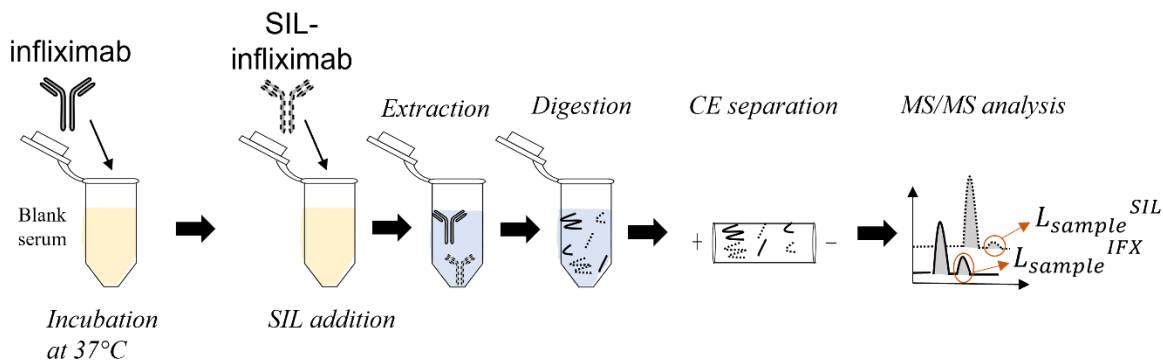


Figure 9.2. Schematic representation of the CE-MS/MS strategy used to identify post-translational modifications (PTMs) of infliximab after incubation at 37°C in serum.

9.3.1. Capillary electrophoresis separation

CE-MS/MS data showed that the analytical workflow enabled the systematic identification of peptides presenting PTMs hotspots [141,143,198]. Thus, the selectivity of CE separation, based on the electrokinetic mobility of the analytes, delivered a baseline separation of modified peptides from their unmodified counterparts. Therefore, CE-MS/MS analysis allowed reliable characterization of PTMs and relative quantification of modification levels for asparagine deamidation (*deaN*) as emphasized in Figure 9.3.a, which involved a mass difference of (+ 0.98 Da). In addition, aspartate isomerization (*isoD*), which did not involve a mass shift of the peptide could be identified after CE separation (Figure 9.3.b). Previous work in our group showed a lower electrophoretic mobility of the peptide with *isoD* than with D, due to the hydrodynamic radius change [21]. Without the implementation of CE separation prior to the MS analysis, the identification of the PTMs could be hindered or impossible due to isotopic profile overlapping on MS spectra between the modified peptide and the unmodified homologue.

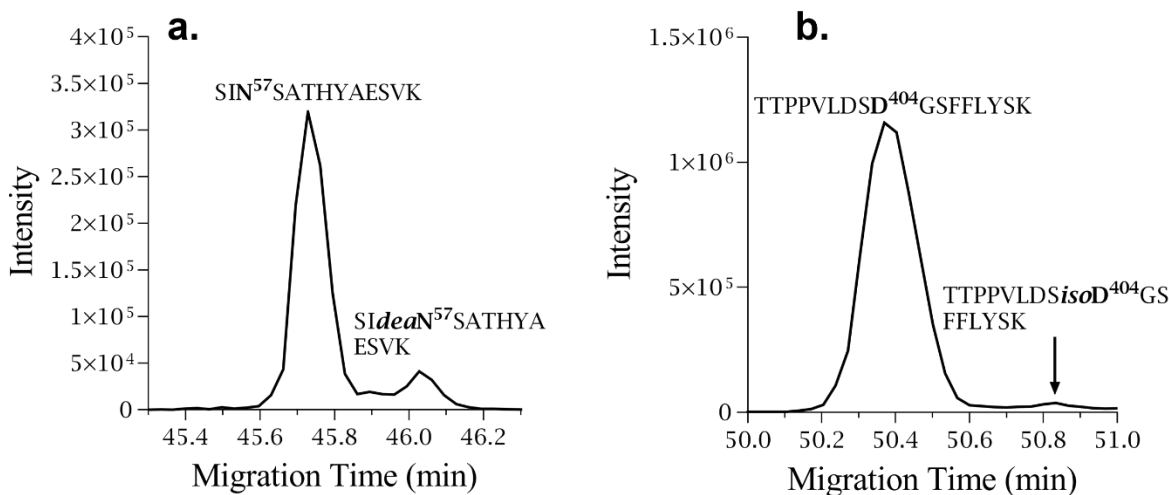


Figure 9.3. Examples of CE-MS/MS electropherograms exhibiting: **a.** Separation of a peptide presenting an asparagine deamidation (*deaN*⁵⁷) from the unmodified homologue (*N*⁵⁷). **b.** Separation of a peptide demonstrating an aspartate isomerization (*isoD*⁴⁰⁴) from the corresponding intact peptide (*D*⁴⁰⁴).

9.3.2. Quantification of induced PTMs during *in vitro* storage

For infliximab innovator and the corresponding biosimilaires, the modification levels of 4 asparagine deamidations (*N*¹⁵⁸ (LC), *N*¹³⁷ (LC), *N*³⁸⁷ (HC) and *N*⁵⁷ (HC)) and 2 aspartate isomerizations (*D*²⁸³ (HC) and *D*⁴⁰⁴ (HC)) were measured using CE-MS/MS analysis at different incubation time (Table 9.S1). The median half-life of infliximab is approximately 14 days. However, the concentration of this mAb in patients with Crohn's disease was found to be highly variable between individuals, with some patients still presenting serum infliximab levels > 2.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 14 weeks of treatment [164]. Therefore, the present study sought to evaluate the structural outcome of the mAb up to 90 days of incubation. Fig. 4 presents the evolution of PTMs abundance with incubation time. The results showed an absence of significant modification for the two aspartates studied, and in the case of the residues *N*¹⁵⁸ and *N*¹³⁷. Indeed, their level of modification induced during incubation, calculated from CE-MS/MS data, remained systematically below 10 % for the different infliximab products, even after 90 days. Concerning deamidation of the residue *N*³⁸⁷, the results showed a gradual increase of the residue deamidation over time up to 16.6 % after 50 days of incubation in serum for Remsima®, followed by a stabilization afterward (Figure 9.4). The modification of this particular residue was attributed to the presence of an adjacent glycine in the amino acid sequence, which made the residue highly prone to deamidation at neutral to alkaline pH due to the possible formation of the cyclic imide [18,218]. Plus, the 3D structure of infliximab *F*_c part indicated that *N*³⁸⁷ is located on an external helix exposed to the external environment, close to the area of binding with *F*_c γ RIII. Lu *et al.* (2020) have shown that deamidation of *N*³²⁵ reduces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity after 4 months of incubation at 40°C [147].

In the case of the residue N⁵⁷, CE-MS/MS data demonstrated a gradually increasing level of deamidation, reaching 43.6 % for the Remsima® product after 90 days of incubation. The residue N⁵⁷ is located in the CDR part of infliximab, so the modification of this residue could potentially hinder the affinity of the mAbs with the antigen due to its proximity during the interaction. Various studies have investigated the implication of this hotspot on the antigen-antibody interaction. For instance, Huang *et al.*(2005) observed a similar deamidation of the residue N⁵⁵ for another IgG over time after administration to monkeys [16]. They noted a decrease in antigen binding affinity with this N⁵⁵ deamidation.

Regarding the assessment of biosimilarity, CE-MS/MS data obtained for the biosimilars showed a gradual modification of residues N⁵⁷ and N³⁸⁷ in nearly equivalent proportions compared to the infliximab innovator product after 6 days when incubated in serum. However, it could be noted that Inflectra® showed lower modification levels for N⁵⁷ than the other compounds after this time point (Figure 9.4). Although the kinetics of this deamidation should be confirmed with other batches of Inflectra®, the method has demonstrated its suitability for structural assessment of mAbs after administration. Therefore, the study allowed to point that both biosimilar products exhibited a similar structural evolution in comparison to the innovator product during incubation in the biological sample. In this case, the CE-MS/MS analysis allowed to demonstrate in the perspective of the outcome after administration, the structural equivalence of the studied biosimilars of infliximab compared to the innovator product in term of amino acids subjected to post-translational modification. Plus, the determination of the rate of these degradations is possible with this method but would require multiple batch experiments for biosimilarity assessment. CE-MS/MS analysis performed for the different products showed the occurrence of specific PTMs during the incubation of infliximab under conditions that mimic in vitro the environment of mAbs after administration. Thus, the strategy developed enabled to anticipate the occurrence of PTMs potentially affecting the mAbs after their injection, during their residence time, which is particularly long due to the extended serum half-life of IgG. In addition, the CE-MS/MS results highlighted the relevance of characterizing PTMs hotspots post-administration in order to attribute changes in the efficacy of the mAbs over time.

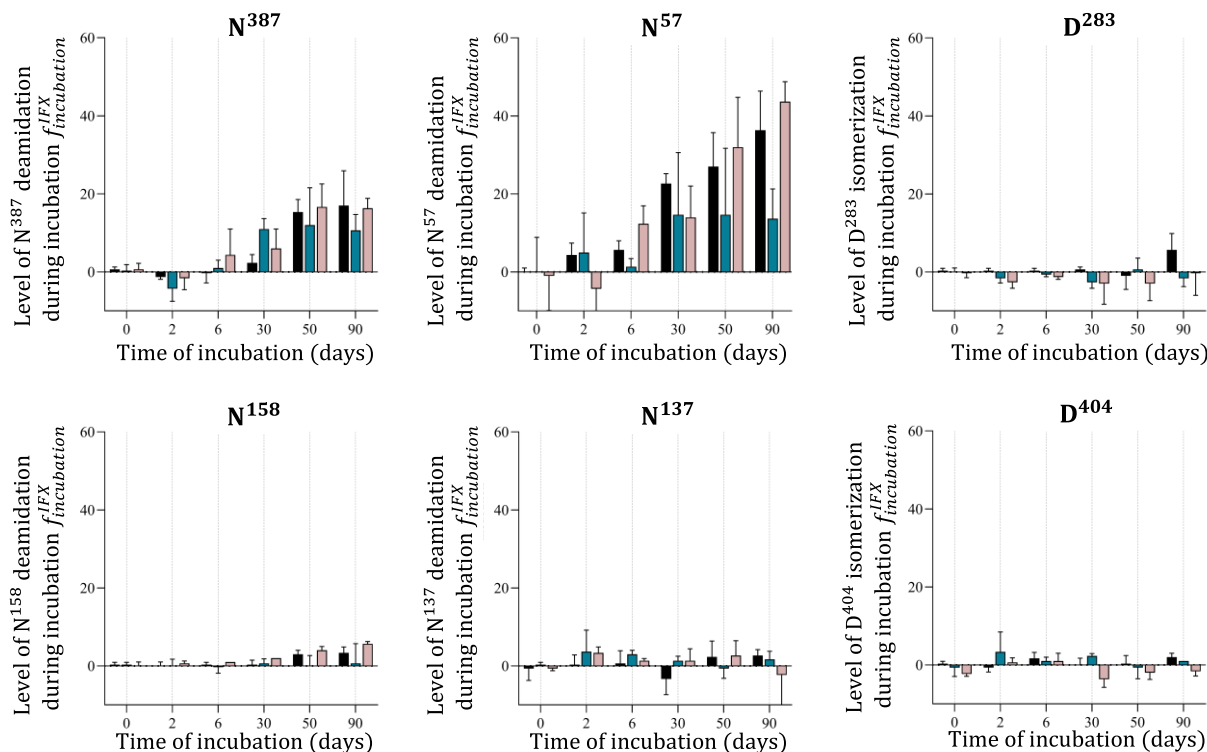


Figure 9.4. Modification levels of 6 amino acids generated after incubation of infliximab in serum at 37°C. Black bars: Remicade®, blue bars: Inflectra® and pink bars: Remsima®. Error bars correspond to standard deviation of triplicates.

9.3.3. Evaluation of TNF- α binding

The presence of the identified PTMs may potentially affect the affinity of the mAbs for the corresponding antigen or receptors responsible for effector functions (e.g. F_cRn, F_c γ RI), especially in the case of the residue N⁵⁷ which is located in the CDR of infliximab. The sample preparation developed for the CE-MS/MS analytical workflow was based on an affinity extraction step performed by the intermediate of recombinant TNF- α immobilized on ferromagnetic beads. Therefore, to further investigate the impact of the gradual deamidation of the amino acid N⁵⁷ on the infliximab/TNF- α interaction, the efficiency of the bead extraction was evaluated (equation 9.2).

As emphasized in Figure 9.5, the CE-MS/MS analysis demonstrated an extraction efficiency systematically higher than 75%. The incubation time did not show a significant influence on the extraction efficiency over a period of 50 days. By extension, experiments showed that the infliximab/TNF- α binding could be maintained. Therefore, CE-MS/MS analysis allowed to correlate that these significant levels of N⁵⁷ deamidation, resulting from prolonged incubation in serum, did not compromise the binding interaction of infliximab to its antigen. The experiment carried out during the study was based on the estimation of the relative amount of infliximab bound using the SIL-IFX, with a fixed amount of TNF- α , in order to avoid variations possibly due to the

repeatability of the extraction. Thus, this approach allowed only the estimation of the actual occurrence of the infliximab/TNF- α interaction. As a consequence, although the infliximab/TNF- α interaction was maintained, the affinity of the interaction, represented by the dissociation constant, could still potentially be affected by the occurrence of PTMs in the CDR regions without completely abolishing the interaction. Concerning biosimilarity assessment, the infliximab innovator and the corresponding biosimilar demonstrated a similar evolution of the extraction efficiency over the studied period of time (Figure 9.5). Data generated during the study showed that the different infliximab products underwent equivalent evolution when placed in conditions mimicking the environment of the mAbs after administration, further supporting their bioequivalence. As a result, the analytical workflow developed in this case allowed for an additional dimension of comparison in the context of biosimilarity assessment, with a reduced number of experiments.

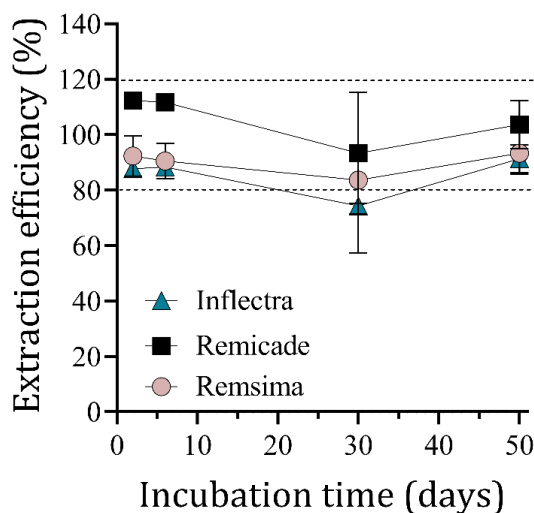


Figure 9.5. Achieved extraction efficiency of infliximab innovator product (Remicade[®]) or biosimilars (Inflectra[®] and Remsima[®]) for different incubation duration in blank serums at 37°C. Error bars represent the standard deviation among triplicates. Dotted lines: bias of +/- 20% of the extraction efficiency compared to a sample without incubation (reference).

9.3.4. Comparison with *in vivo* values

The relevance regarding the implementation of conditions mimicking the environment of the mAbs after administration to predict mAb stability was further investigated. Thereby, hotspots PTMs levels obtained for spiked serums incubated at 37°C were compared with those values observed *in vivo* for the characterization of serums originating from treated patients, as previously reported [270]. The analysis of serums of patients after their administration with infliximab exhibited the absence of modifications at the residues D²⁸³, D⁴⁰⁴, N¹⁵⁸ and N¹³⁷, which is in full agreement with the CE-MS/MS results obtained under conditions simulating the environment of the mAbs (Figure 9.4). In addition, the progressive deamidation of the residue N⁵⁷ characterized

by CE-MS/MS analysis in the case of incubated serum samples, was consistent with its evolution reported *in vivo* consequently to administration. In particular, a comparison of the deamidation kinetic of the residue N⁵⁷ measured *in vitro* by the intermediate of incubated serums and *in vivo* in the case of samples originating from treated patients was performed. It allowed to demonstrate a significantly similar rate of modification of the protein (Figure 9.S2) which validated the relevance of the conditions mimicking the environment of infliximab after administration. The gradual deamidation of the residue N⁵⁷ was partially attributed to the effect of temperature, which is in agreement with previous reports [193]. A study recently investigated by Kato *et al.* (2020) has suggested that H₂PO₄⁻ and HCO₃⁻ ions are the principal catalysts for Asn deamidation *in vivo* [219]. Concerning the residue N³⁸⁷, comparison between *in vitro* and *in vivo* deamidation rate was less clear, as the maximum level of modification observed was 20 % (Figure 9.S3). Despite a higher dispersion among patients, it is possible to observe a similar tendency between the two studies.

The CE-MS/MS method demonstrated the possibility to independently characterize faint PTMs occurring on infliximab present in complex biological samples, in a precise and robust manner. The characteristics of the CE-MS/MS methods, supported by a specifically tailored sample preparation procedure, enabled to achieve an optimal sensitivity and to prevent any interference from natural IgGs or serum proteins. A novel analytical approach was developed in order to predict the occurrence of PTMs consequently to the administration, in the case of infliximab innovator and the corresponding biosimilars. The characterization of infliximab-spiked serums incubated at 37°C allowed to identify stable residues alongside to the gradual deamidation of two distinctive asparagine residues over time. Without the necessity to perform additional experiments, the determination of the TNF- α affinity extraction efficiency showed that the N⁵⁷ deamidation, located in the CDR of mAbs, did not involve significant alterations of the infliximab/TNF- α interaction. Finally, comparison of N⁵⁷ deamidation kinetics obtained from the analysis of model samples and serum samples demonstrated a relevant correlation between the two sets of experiments. Thus, the results allowed to emphasize the validity of using conditions mimicking the environment of mAbs in order to anticipate the evolution of their primary structure after administration, in a detailed manner.

9.4. Conclusion

In the present work, we developed an analytical strategy implementing conditions that mimic the environment of mAbs after their administration over an extended period of time in order to predict *in vitro* the potential occurrence of primary structure degradation of mAbs. CE-MS/MS analysis enabled the simultaneous characterization of six PTM hotspots including *deaN* and *isoD*, for infliximab innovator and two corresponding biosimilar products in biological samples.

Biosimilarity assessment usually performed on formulated products, the study allowed to investigate the different infliximab products from the perspective of their stability after administration, in order to further demonstrate their biological equivalence. Results allowed the identification of two distinct PTM hotspots presenting significant modification due to the environment, including *deaN*⁵⁷ located in the CDR part of infliximab. CE-MS/MS data showed a similar evolution regarding modification levels between the infliximab innovator and the two biosimilars. Nonetheless, the excellent sensitivity of the method provided the possibility to distinguish faint differences in terms of modification levels. The comparison of the results obtained from the analysis of *in vitro* model samples and *in vivo* serum samples, originating from treated patients, proved to be in agreement regarding the affected residues and their respective modification kinetics. As a consequence, the comparison demonstrated the relevance of the *in vitro* analytical strategy developed, to predict the occurrence of PTMs and anticipate the primary structure stability of mAbs after administration. Concomitantly, the analytical strategy enabled to evaluate the influence of the N⁵⁷ deamidation on the infliximab/TNF- α binding, which allowed to determine that the modification of the residue does not prevent the interaction within a 50-day incubation.

The study illustrated the importance of characterizing the evolution of the primary structure of a biosimilar candidate also in the context of its administration. Indeed, like in the case of infliximab, the evolution of the primary structure after administration to patients could be drastically different from the formulated product, which is usually used to perform stability studies using forced degradation. The *in vitro* analytical strategy developed provided a suitable approach in order to facilitate and anticipate this type of experiment, alleviating the effective administration of the product. It could also potentially be adapted to other mAbs in a straightforward manner, with the only requirement that the adequate antigen is used for the specific extraction. Further studies evaluating the impact of structural degradation on other functional aspects of an antibody could help to better understand their outcome after administration. For instance, studies have showed that PTMs occurring near the F_c receptor region could impact the binding of the antibody to essential receptors such as F_cRn or F_c γ Rs, thereby affecting its serum half-life, or cytotoxicity [26,28,147,267].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank every person that contributed to the achievement of this article, especially the Professor M. Allez (Chief of Service Gastro-enterology, Inserm U1160, Hospital Saint Louis, France) that provided serum samples of the cohort and Victor Chardiny for his help. They thank Armand Leclerc for his helpful discussions, and his help for the normalization strategy. They also thank Antony Lechner for his great contribution in the beginning of this project. This research work was supported by the Agence National de la Recherche as part of the project MethAmAbs (project no. ANR-19-CE29-0009).

9.5. Supporting information

Table 9.S1. Level of modification obtained by MS integration of peptides for Remicade®, Inflectra® and Remsima® over incubation time. Standard deviation was calculated for replicates of 3. These are the row data, before normalization (equation 9.1).

			Level of modification ($L_{\text{sample}}^{\text{IFX}}$)					
Time of incubation (days)			0	2	6	30	50	90
PTM	Location	Analyte						
Isomerization	D ²⁸³	Remicade®	3 ± 1 %	2 ± 1 %	1 ± 1 %	3 ± 2 %	2 ± 1 %	8 ± 6 %
		Remsima®	4 ± 2 %	3 ± 1 %	3 ± 3 %	3 ± 1 %	2 ± 1 %	5 ± 6 %
		Inflectra®	4 ± 3 %	2 ± 1 %	3 ± 0 %	2 ± 1 %	7 ± 4 %	3 ± 3 %
	D ⁴⁰⁴	Remicade®	1 ± 1 %	2 ± 0 %	2 ± 2 %	5 ± 4 %	1 ± 1 %	2 ± 0 %
		Remsima®	4 ± 4 %	4 ± 4 %	2 ± 2 %	2 ± 2 %	3 ± 3 %	1 ± 1 %
		Inflectra®	2 ± 2 %	5 ± 5 %	1 ± 1 %	1 ± 1 %	1 ± 1 %	1 ± 1 %
Deamidation	N ⁵⁷	Remicade®	4 ± 2 %	12 ± 5 %	12 ± 6 %	44 ± 25 %	31 ± 9 %	40 ± 9 %
		Remsima®	23 ± 1 %	13 ± 8 %	31 ± 3 %	29 ± 8 %	44 ± 11 %	53 ± 5 %
		Inflectra®	17 ± 8 %	19 ± 10 %	15 ± 1 %	23 ± 11 %	25 ± 13 %	22 ± 17 %
	N ³⁸⁷	Remicade®	31 ± 3 %	48 ± 2 %	51 ± 9 %	40 ± 4 %	42 ± 12 %	54 ± 13 %
		Remsima®	58 ± 10 %	48 ± 1 %	50 ± 15 %	48 ± 8 %	51 ± 5 %	51 ± 7 %
		Inflectra®	55 ± 8 %	44 ± 5 %	46 ± 8 %	63 ± 11 %	46 ± 3 %	54 ± 8 %
	N ¹³⁷	Remicade®	12 ± 3 %	9 ± 3 %	25 ± 6 %	9 ± 7 %	8 ± 2 %	13 ± 3 %
		Remsima®	13 ± 5 %	7 ± 2 %	14 ± 6 %	13 ± 5 %	10 ± 1 %	16 ± 6 %
		Inflectra®	16 ± 9 %	22 ± 7 %	19 ± 12 %	12 ± 3 %	9 ± 3 %	11 ± 4 %
	N ¹⁵⁸	Remicade®	4 ± 0 %	10 ± 1 %	12 ± 1 %	9 ± 1 %	9 ± 3 %	11 ± 2 %
		Remsima®	12 ± 3 %	5 ± 4 %	9 ± 2 %	9 ± 1 %	9 ± 0 %	13 ± 1 %
		Inflectra®	11 ± 3 %	8 ± 4 %	11 ± 3 %	9 ± 1 %	8 ± 1 %	10 ± 2 %

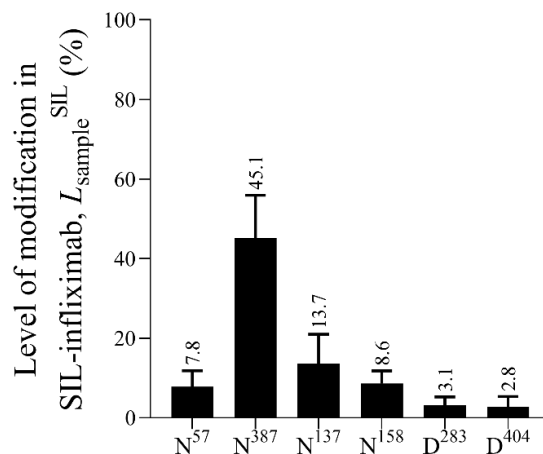


Figure 9.S1. Level of modification obtained by MS integration of peptides for SIL-infliximab. Mean and standard deviation were obtained with of all SIL-infliximab samples analysis (at each time of incubation), since SIL-infliximab is added to the serum after incubation time (see Figure 9.1) (n=61).

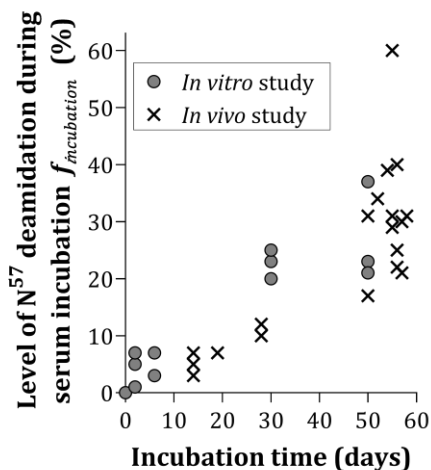


Figure 9.S2. Evolution of the level of deamidated N⁵⁷ of infliximab (Remicade®) with the time spend in during incubation. *In vitro* study: incubation in normal serum at 37°C (gray bars). *In vivo* study: incubation in patient's organism (black crosses).

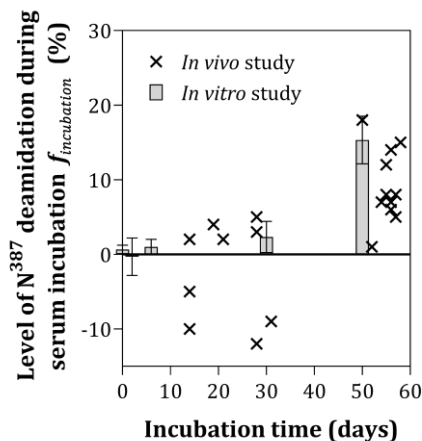


Figure 9.S3. Evolution of the level of deamidated N³⁸⁷ of infliximab (Remicade®) with the time spend in during incubation. *In vitro* study: incubation in normal serum at 37°C (gray bars). *In vivo* study: incubation in patient's organism (black crosses).

9.6. Discussions additionnelles

9.6.1. Prédiction de PTM post-administration de sites additionnels de l'inflximab

Afin d'élargir la caractérisation structurale, cette section propose d'identifier d'autres sites de PTM à partir des mêmes données MS utilisées dans la publication du chapitre 9. Ces résultats n'ont pas été inclus dans l'article pour conserver une clarté dans la présentation des capacités de l'approche développée. Dans la première partie de ces discussions additionnelles, le suivi cinétique du profil de glycosylation après chaque incubation a été évalué. Puis, sont présentés les suivis cinétiques de certaines oxydations de méthionines et d'autres déamidations d'asparagines.

▪ Glycoprofiles.

Les analyses CE-MS/MS de l'inflximab (commercialisé sous les noms de Remicade®, Inflectra® et Remsima®) après incubation en présence de sérum pendant une période de 0 à 90 jours, permettent les extractions EIE des 6 glycopeptides majoritaires. À partir des aires des signaux extraits, les profils de glycosylation ont été établis sur la Figure 9.6.a.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux présentés par Pisupati *et al.* (2017), ayant comparé les proportions glycaniques de l'inflximab original et de son biosimilaire Remsima®, à partir des produits formulés [250]. Dans cet article, il était déjà souligné que le Remsima® présente une proportion plus élevée de G1F au détriment de G0F et G0FN par rapport à son homologue

original. Remsima® est produit à partir d'un clone de cellules Sp2/0 avec des excipients différents de celui du Remicade®, ce qui peut expliquer cette différence [193]. L'Inflectra® étant produit dans les mêmes conditions que le Remsima®, il présente un profil de glycosylation similaire.

Les profils de glycosylations des produits de l'infliximab présentés Figure 9.6.a. semblent rester stables au cours du temps d'incubation. En utilisant l'équation (9.1) de normalisation établie dans l'article de ce chapitre pour quantifier $f_{\text{incubation}}^{\text{IFX}}$, la proportion de modification apparue lors de chaque incubation, il a été possible de normaliser les glycoprofiles, sur Figure 9.6.b. Les niveaux de $f_{\text{incubation}}^{\text{IFX}}$ obtenus étant très faibles (< 20 %), appuient la théorie selon laquelle aucune variation significative de l'abondance de chaque glycan n'a lieu durant l'incubation *in vitro*. Comme observé dans le chapitre 8, la normalisation de l'abondance du glycopeptide G0F est plus variable que les autres glycans, à cause de sa forte proportion. En comparant les résultats de ces sérums incubés aux échantillons contrôles, on ne remarque pas de variation significative.

Dans le chapitre 8 (Figure 8.7), de légères variations dans les proportions de M5 et G0FN de l'infliximab Remicade® avaient été observées suite à son administration aux patients, ce qui n'est pas retrouvé après incubation *in vitro*. Ces modifications post-administration ont été attribuées aux différences de cinétique d'élimination de ces glycoformes, c'est-à-dire leur clairance. Des études antérieures ont démontré que certains glycans ont une faible interaction avec le récepteur FcRn. Cela affecte le temps de demi-vie des mAbs qui portent ces glycans [258]. Dans le cadre des travaux réalisés sur la Figure 9.6, étant donné que l'infliximab est simplement incubé dans du sérum modèle, ce recyclage biologique n'a pas lieu.

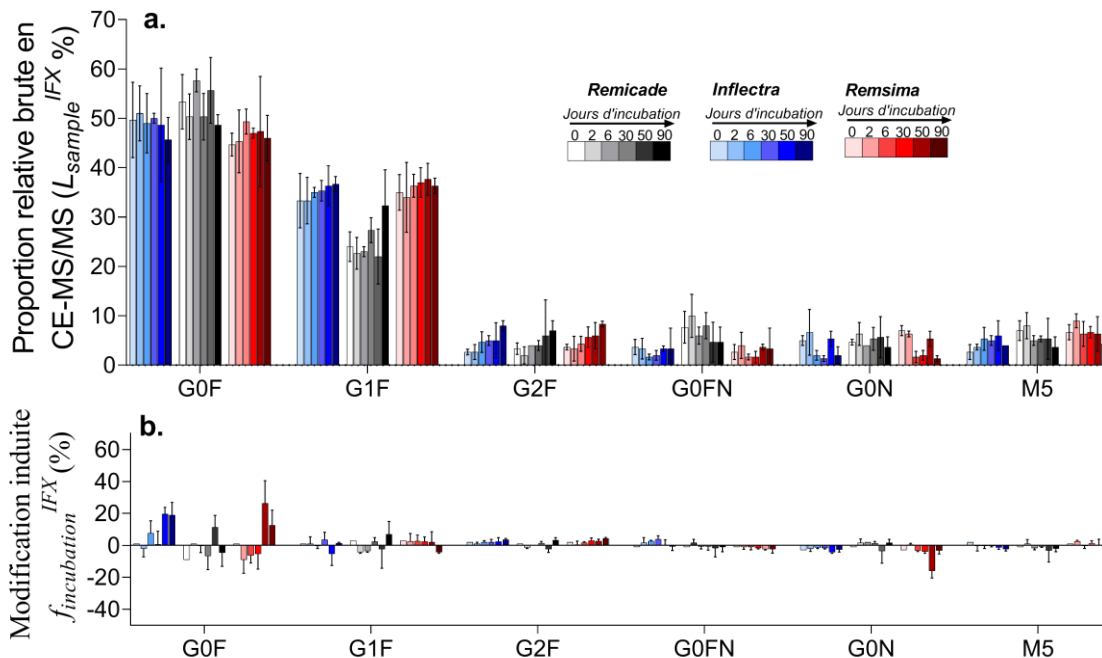


Figure 9.6.a. Profils de glycosylation de l'infliximab produit original (Remicade®) ou biosimilaires (Remsima® et Inflectra®) après incubation dans du sérum sain à 37°C (0-90 jours). **b.** Niveau de glycan ayant été modifié lors de l'incubation *in vitro* de l'infliximab dans du sérum. Les barres d'erreurs représentent les écarts type pour n = 3.

- **Oxydations de méthionines.**

Ces mêmes données CE-MS/MS permettent d'extraire les EIE des ions correspondants aux 3 oxydations de méthionines *hotspots* M¹⁸, M⁸⁵ et M²⁵⁵. Les niveaux d'oxydations produits durant l'incubation ($= f_{\text{incubation}}^{\text{IFX}}$) ont été déterminés pour ces analyses *in vitro* sur la Figure 9.7. Dans le cas des 3 méthionines considérées, la méthode souligne là encore que la cinétique des oxydations de ces sites semble être similaire entre le produit Remicade® et ses biosimilaires.

Pour chacun des trois produits de l'infliximab, les résultats indiquent une oxydation progressive du site M²⁵⁵ avec le temps de l'incubation. Plusieurs études ont remarqué une relation entre l'oxydation de M²⁵⁵ et l'affinité de l'IgG avec le récepteur néonatal FcRn, modulant le recyclage et donc le temps de demi-vie de l'anticorps dans l'organisme. Néanmoins, des recherches complémentaires ont permis d'établir que le niveau d'oxydation de M²⁵⁵ doit excéder les ~ 40-50 % pour que la pharmacocinétique de l'anticorps soit affectée [27,29]. D'après nos études *in vitro*, ce niveau n'est atteint qu'après 90 jours d'incubation. Or, l'infliximab est généralement éliminé de l'organisme des patients avant 90 jours.

Le principal défi rencontré lors de l'étude des *oxiM* de ce projet doctoral a été l'absence de reproductibilité inter-journées des oxydations endogènes induites par la préparation d'échantillon/analyse. En effet, bien que l'analyse CE-MS/MS des sérums dopés avec de l'infliximab résulte en une reproductibilité des *oxiM* intra-journée acceptable (CV < 30 %, n = 3), la reproductibilité inter-journées s'est avérée bien moins satisfaisante (CV > 50 %, n = 3). Pendant certaines manipulations, il a été constaté que le niveau d'*oxiM*, mesuré par analyse CE-MS/MS sur un infliximab provenant de sérum, atteignait 100 %. La raison de cette variabilité d'oxydation artificielle induite par la stratégie n'est pas encore pleinement comprise. Il est possible de suggérer que la canule métallisée à l'extrémité du capillaire de séparation, située dans l'interface ESI, induit de manière non-systématique des oxydations artificielles importantes sur les méthionines. De telles observations ont été décrites avec la corrosion de l'émetteur ESI en LC-MS, qui peut provoquer jusqu'à 80 % d'*oxiM* de certains peptides [271].

Or, si la quantification relative brute obtenue par CE-MS/MS d'une PTM est à 100 %, la stratégie de normalisation n'est plus applicable, car elle ne permet pas de distinguer les PTM inhérentes au stress ou à l'administration de celles qui proviennent de la préparation de l'échantillon. Ce phénomène a été constaté dans certaines analyses de sérums de patients ainsi que pour les sérums dopés du 2^{ème} jour d'incubation. Par conséquent, ces points ne sont pas inclus dans la Figure 9.7.

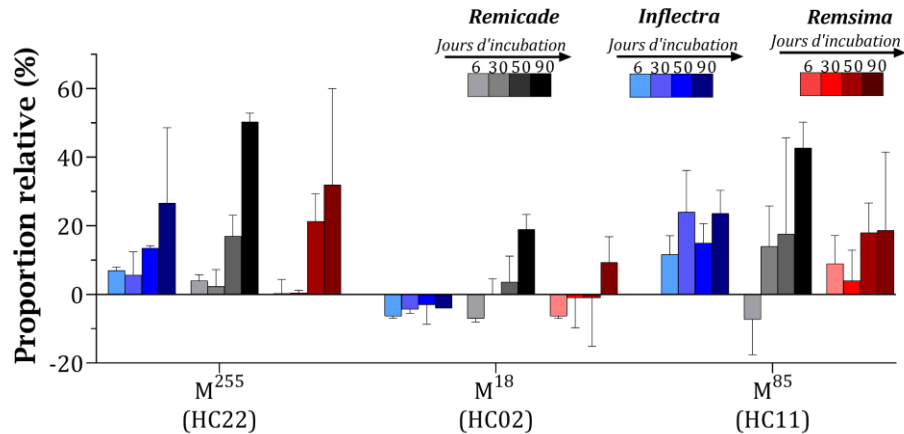


Figure 9.7. Proportions d'oxydations de méthionines de l'infliximab (original Remicade® et biosimilaires Remsima® et Inflectra®) selon le temps d'incubation *in vitro* dans du sérum modèle à 37°C (6-90 jours) Les barres d'erreurs représentent les écarts-types pour $n = 3$.

▪ Déamidations d'asparagines

Afin d'avoir une perspective plus élargie des déamidations de l'infliximab post-administration, d'autres sites d'asparagine ont été extraits des données CE-MS/MS. Toujours par application de l'équation (9.1), les proportions de déamidations induites lors de l'incubation de l'infliximab ($= f_{\text{incubation}}^{\text{IFX}}$) ont été calculées. La Figure 9.8 présente ces proportions pour 8 nouveaux sites d'asparagines suivis (en plus des 4 issus de la publication de ce chapitre 9) de l'infliximab produit original Remicade®. Ces résultats mettent en évidence qu'aucune des huit asparagines, dont l'une est située sur une zone CDR (N^{101}), ne se déamident avec le temps d'incubation. Comme présenté dans l'article, on retrouve les dégradations progressives de N^{57} et N^{387} .

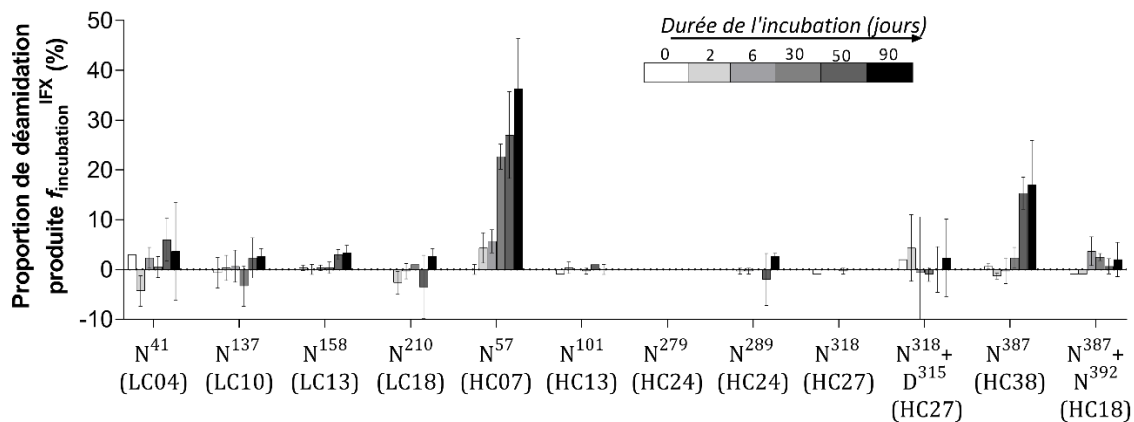


Figure 9.8. Proportions de déamidations d'asparagines de l'infliximab (original Remicade®) selon le temps d'incubation *in vitro* dans du sérum modèle à 37°C (0-90 jours) Les barres d'erreurs représentent les écarts-types pour $n = 3$.

Les mêmes asparagines ont été caractérisées pour les biosimilaires de l'infliximab (Remsima® et Inflectra®) et sont présentées sur la Figure 9.9. Une fois encore, seules les asparagines N^{57} et N^{387} se déamident *in vitro* de manière non négligeable ($f_{\text{incubation}}^{\text{IFX}} > 20\%$). Les autres asparagines étudiées ne montrent aucune altération suite à cette période d'incubation. Ces résultats appuient la

biosimilarité des dégradations structurales du Remsima® et de l'Inflectra® par rapport au Remicade®.

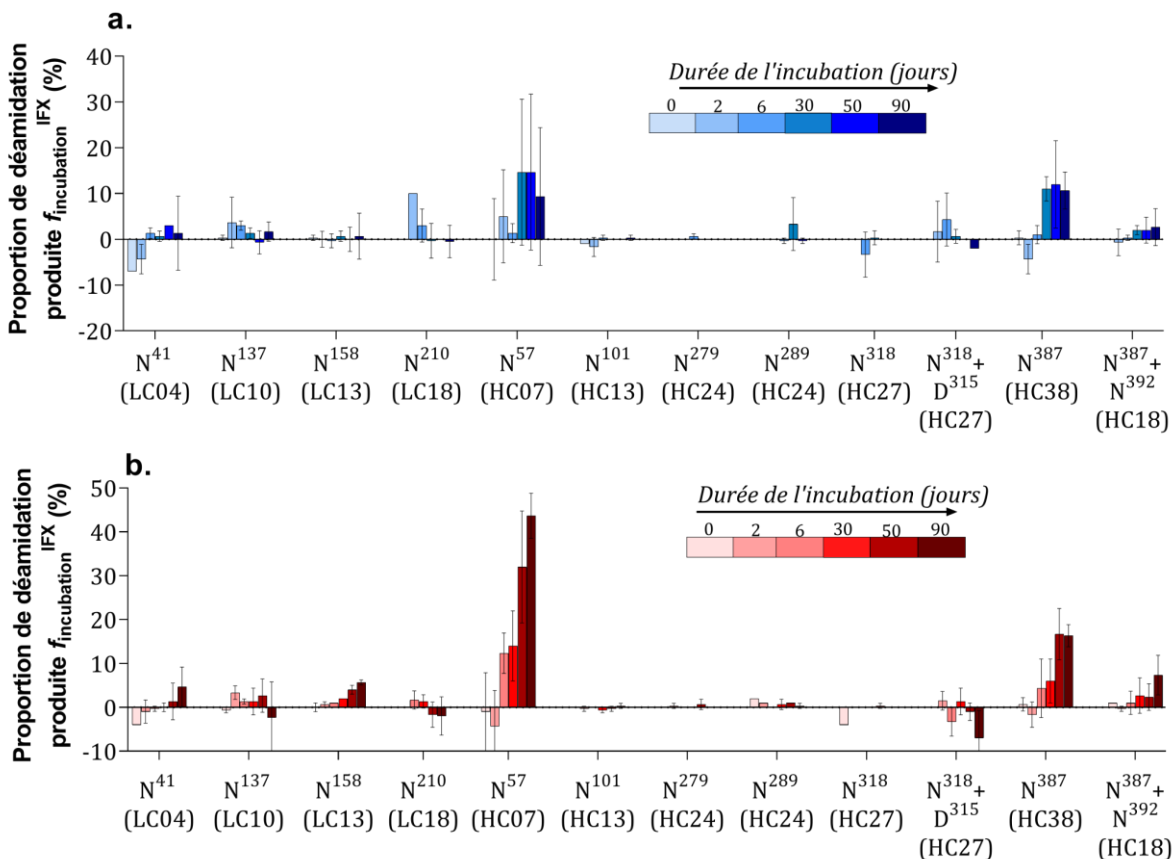


Figure 9.9. Proportions de déamidations d'asparagines de l'infliximab (biosimilaires **a.** Inflectra® et **b.** Remsima®) selon le temps d'incubation *in vitro* dans du sérum modèle à 37°C (0-90 jours) Les barres d'erreurs représentent les écarts type (n=3).

Ainsi, que ce soit pour l'évolution des proportions glycaniques ou d'autres PTM, la stratégie *in vitro* implémentée a permis d'apporter des informations sur le devenir post-administration de l'infliximab. En particulier, cette approche a ouvert la voie à une nouvelle perspective peu explorée jusqu'ici, en évaluant la biosimilarité structurale de produits mAbs après administration. En ce qui concerne les résultats présentés dans ce chapitre, les biosimilaires Remsima® et Inflectra® ont pu démontrer une évolution structurale très similaire à leur produit original Remicade®.

9.6.2. Discussion sur l'origine des déamidations spontanées de N⁵⁷ et N³⁸⁷

9.6.2.a. Quels facteurs responsables de la déamidation ?

Parmi les 12 asparagines étudiées *in vitro*, deux sont sujettes à une déamidation significative dès 6 jours d'incubation, et ce pour l'infliximab original et ses deux biosimilaires. L'objectif a alors

été d'essayer d'identifier et de comprendre l'origine de ces déamidations. Plusieurs études ont mis en évidence que la température et le pH peuvent entraîner des déamidations [14]. La caractérisation des dégradations *in vivo* (chapitre 8) et *in vitro* (chapitre 9) de l'infliximab a mené à des proportions de *deaN*⁵⁷ extrêmement élevées (~ 20 % après 30 jours d'incubation). En 2023, Legrand *et al.* ont évalué la déamidation de l'acide aminé N⁵⁷ de l'infliximab conservé à 40°C dans de l'eau, par analyse LC-MS/MS *bottom-up* [54]. Ils ont démontré que ce site se déamide à environ 12 % après 30 jours d'incubation. Bien que cela reste dans le même ordre de grandeur que nos résultats, cette différence pourrait être attribuée à la présence de composants dans le sérum pouvant catalyser cette réaction. Des études ont récemment indiqué qu'une augmentation de la concentration d'ions carbonates et phosphates, naturellement présents dans le sang, accélère la déamidation de protéines. Ces ions catalysent la réaction en stabilisant la position de certains atomes de l'asparagine [219,272,273].

Pour étudier ces effets, nous avons réalisé des incubations d'infliximab dans des tampons contenant des ions phosphates ou carbonates, afin de voir si d'identiques observations de *deaN* pouvaient être observées. De l'infliximab Remicade® a été ajouté à des solutions de bicarbonate d'ammonium ou de PBS, alors stockées à 37°C. Les déamidations ayant émergé ($f_{\text{incubation}}^{\text{IFX}}$) après ces incubations de 6 ou 30 jours *in vitro* ont été évaluées pour les 12 asparagines. Parallèlement, d'autres expériences préliminaires ont été menées afin de comparer l'évolution des PTM de l'infliximab Remicade®, dans différents types de sérum. Comme présenté sur la Figure 9.10, les sérums de patients ont généralement un aspect jaune pâle. Il arrive, dans certains cas, que le sérum ait un aspect plus orangé et turbide, que l'on appelle « lipémique », dû à une concentration élevée de lipides. Cette surconcentration peut être observée si le prélèvement sanguin s'effectue après un repas, ou peut provenir de maladies de défaillance du métabolisme des graisses comme le diabète. Les sérums « ictériques », ont un aspect jaune ocre provenant essentiellement d'une grande concentration de bilirubine, généralement associée à des maladies du foie. La lipémie et l'ictère sont deux conditions sanguines dans lesquelles l'infliximab peut se trouver après administration (contrairement à l'hémolyse qui provient essentiellement d'un mauvais prélèvement). Il a été intéressant de voir l'effet d'une incubation dans ces sérums sur les 12 sites d'asparagine étudiés.

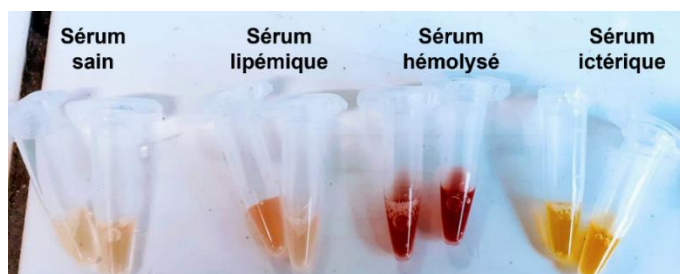


Figure 9.10. Différents aspects du sérum après prélèvement du sang aux patients.

Matériel et méthode. Trois échantillons ont été réalisés, contenant du Remicade® à $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dilué dans du sérum sain, ictérique ou lipémique fourni par l'hôpital Lariboisière, pour un volume final de $250 \mu\text{L}$. Deux autres échantillons ont été réalisés, contenant du Remicade® à $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dilué dans du PBS (pH 8) ou du bicarbonate d'ammonium (50 mM pH 8), pour un volume final de $250 \mu\text{L}$. Ces échantillons ont été incubés 6 ou 30 jours à 37°C , puis, $100 \mu\text{L}$ ont été prélevés avant l'ajout de $4 \mu\text{L}$ de SIL-IFX. Puis, les échantillons sont préparés selon la procédure décrite à la section 9.2 de ce chapitre 9 et analysés en CE-MS/MS.

Résultats. Les résultats des niveaux de *deaN* apparus durant l'incubation de ces échantillons sont présentés sur la Figure 9.11. Là encore, des proportions importantes de déamidation des sites N^{57} et N^{387} après 30 jours d'incubation ont été observées, tandis qu'aucune déamidation significative n'a été constatée pour le reste des asparagines examinées. L'incubation dans le sérum ictérique semble mener à des dégradations similaires au sérum normal. En revanche, le niveau de modification de N^{57} atteint après 30 jours d'incubation dans du sérum lipémique est près de 30 % supérieur à celui des autres conditions. Ces résultats sont néanmoins à considérer comme préliminaires car ils n'ont pas été réalisés en triplicatas, et nécessitent des investigations supplémentaires pour parvenir à des conclusions définitives.

Ces résultats révèlent un autre aspect intéressant : l'incubation du Remicade® dans des tampons PBS ou bicarbonate d'ammonium, entraîne des modifications similaires du mAb à celles observées lorsqu'il est incubé dans du sérum. Les concentrations d'ions phosphates ou bicarbonates dans les tampons PBS et bicarbonate d'ammonium sont respectivement de 10 mM et 50 mM, ce qui est supérieur aux concentrations présentes dans la circulation sanguine d'un adulte (généralement de 0,8 à 1,4 mM pour les ions phosphates et de 20 à 30 mM pour les ions bicarbonates). Ces premières observations suggèrent que la combinaison d'un pH physiologique, d'une température de 37°C et peut-être la présence d'ions phosphates/bicarbonates induit *deaN*⁵⁷ et *deaN*³⁸⁷. Pour affiner cette hypothèse, des manipulations supplémentaires devraient être effectuées. Il serait essentiel de s'assurer de la répétabilité des résultats présentés dans la Figure 9.11. Ensuite, il serait intéressant, à titre de comparaison, de mesurer les niveaux de *deaN* après incubation dans de l'eau ultra-pure, ne contenant pas d'ions carbonates ou phosphates.

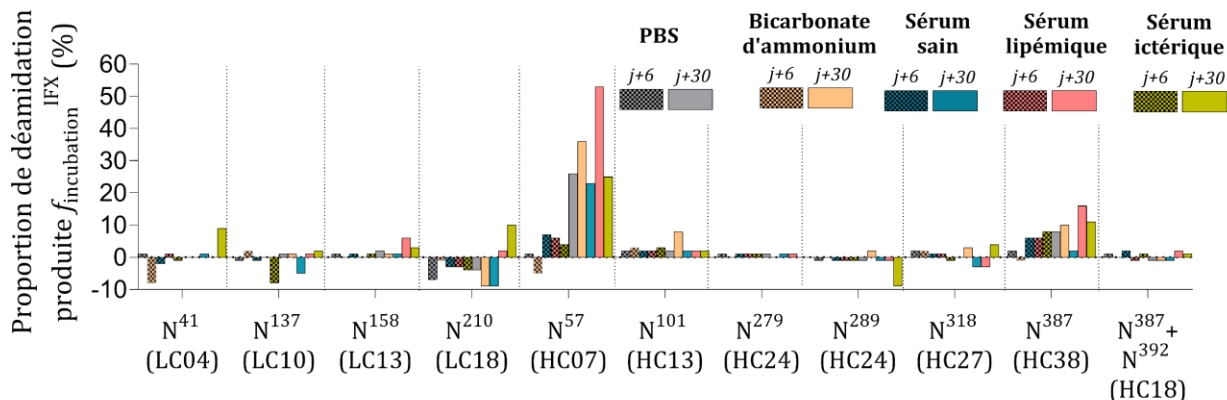


Figure 9.11. Proportions de déamidations d'asparagines de l'inflximab (original Remicade®) selon le temps d'incubation dans du sérum sain, lipémique ou ictérique, ou dans du PBS ou du bicarbonate d'ammonium à 37°C (6 ou 30 jours) Les barres d'erreurs représentent les écarts type pour $n = 3$.

Les résultats de cette section, bien que préliminaires, mettent en évidence la capacité de cette stratégie *in vitro* à comparer le devenir structural de mAbs selon différentes conditions. Ainsi, l'approche pourrait être explorée en vue d'identifier d'éventuels facteurs responsables de modification PTM d'anticorps thérapeutiques.

9.6.2.b. D'où vient la spécificité de $deaN^{57}$ et $deaN^{387}$?

▪ Effet de l'environnement spatial.

Les résultats présentés dans ce manuscrit montrent que deux asparagines spécifiques se déamident : N^{57} et N^{387} . Les autres asparagines étudiées ne semblent pas être modifiées de manière significative. Afin d'identifier l'origine de cette sélectivité, la localisation spatiale de ces asparagines sur l'inflximab a été étudiée par l'intermédiaire des structures cristallines des régions F_{ab} et F_c décrites dans la littérature [211,274]. Les modèles 3D de ces structures de l'inflximab peuvent être consultés dans la base de données *Protein Data Bank* (PDB), et permettent de visualiser les interactions et la surface accessible de tous les acides aminés de la protéine. Ces surfaces ont été répertoriées dans la Table 9.1, pour les 12 asparagines sélectionnées de l'inflximab. On peut alors observer une assez grande disparité de cette surface accessible entre les acides aminés considérés.

Concernant les asparagines, on observe que N^{57} et N^{387} présentent les plus grandes accessibilités (surfaces $> 100 \text{ \AA}^2$), ce qui peut expliquer leur propension à la déamidation. Ainsi, il est possible de suggérer qu'une surface d'accessibilité importante facilite la catalyse par les ions phosphates ou carbonates du sérum conduisant ainsi à la déamidation. Cependant, cette explication ne suffit pas à elle seule, car d'autres asparagines possédant une grande surface accessible telles que N^{41} et N^{158} ne présentent pas de déamidations *in vitro*.

Table 9.1. Valeurs de surfaces accessibles des 12 asparagines étudiées de l'infliximab selon les structures 3D établies dans PDB, aux références 5VH5 et 4G3Y

<i>Localisation de l'asparagine</i>	<i>Surface accessible (Å²)</i>
N ⁴¹ (LC04)	150,4
N ¹³⁷ (LC10)	5,1
N ¹³⁸ (LC10)	47,3
N ¹⁵⁸ (LC13)	114,6
N ²¹⁰ (LC18)	48,5
N ⁵⁷ (HC07)	115,9
N ¹⁰¹ (HC13)	2,7
N ²⁷⁹ (HC24)	30,6
N ³¹⁸ (HC27)	55,5
N ³⁸⁷ (HC38)	123,0
N ³⁹² (HC38)	108,0

▪ **Effet de l'environnement local.**

En 1990, Patel et Brochardt ont étudié comment la séquence d'acides aminés environnant une asparagine peut influencer son processus de déamidation [218]. Le mécanisme de déamidation, à pH alcalin ou neutre, passe par un intermédiaire de réaction, le succinimide (voir Figure 1.2, chapitre 1). Ils ont démontré que l'acide aminé positionné en C-terminal de l'asparagine affecte son taux de déamidation. Cet effet s'explique par la gêne stérique qui peut être amenée par la chaîne latérale de l'acide aminé en question, limitant la formation du succinimide. Plus cette chaîne latérale sera petite, plus le mécanisme de déamidation sera favorisé. Or, l'asparagine N³⁸⁷ est adjacente en C-terminal à une glycine (Table 9.2), ne possédant pas de chaîne latérale, ce qui rend extrêmement propice la formation de l'intermédiaire réactionnel. L'asparagine N⁵⁷, quant à elle, précède une sérine dont la chaîne latérale est relativement courte (57.5 Å) par rapport à d'autres acides aminés. Là encore, ces informations ne suffisent pas à cerner toutes les complexités biologiques des déamidations de protéines. On retrouve en effet une glycine sur le C-terminal de l'asparagine N⁴¹, qui pourtant ne montre pas de déamidation importante lors des incubations.

Table 9.2. Valeurs de surfaces accessibles des chaînes latérales des acides aminés en C-terminal des asparagines considérées.

<i>Asparagine considérée</i>	<i>Acide aminé sur le C-terminal</i>	<i>Aire de surface accessible de la chaîne latérale, Å, issu de [275]</i>
N ⁴¹ (LC04)	Glycine	0
N ¹³⁷ (LC10)	Asparagine	80,8
N ¹³⁸ (LC10)	Phénylalanine	107,4
N ¹⁵⁸ (LC13)	Sérine	57,5
N ²¹⁰ (LC18)	Arginine	152,9
N ⁵⁷ (HC07)	Sérine	57,5
N ¹⁰¹ (HC13)	Tyrosine	119,1
N ²⁷⁹ (HC24)	Tryptophan	143,4
N ³¹⁸ (HC27)	Glycine	0
N ³⁸⁷ (HC38)	Glycine	0
N ³⁹² (HC38)	Asparagine	80,8

CONCLUSION

La **quantification d'infliximab a pu être validée** dans le chapitre 8, sur une gamme de concentration de **0,22 à 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$** , couvrant les concentrations usuelles chez les patients. L'identification de certains sites *hotspots* de PTM, suivie de la normalisation des proportions obtenues par CE-MS/MS, a permis de quantifier le niveau de certaines modifications apparues dans l'organisme de patients. Les analyses de 24 sérums de patients ont identifié les asparagines N⁵⁷ et N³⁸⁷, sujettes aux **déamidations *in vivo***.

Le chapitre 9 a présenté la mise en place et la pertinence d'une méthodologie permettant la **dégradation *in vitro*** de l'infliximab, qui imite fidèlement les conditions *in vivo*. Cette approche a été appliquée pour suivre les PTM du produit original de l'infliximab et de ses biosimilaires. Elle apporte des **informations complémentaires sur la biosimilarité** d'anticorps, et notamment sur leur évolution post-administration.

Cette partie III du manuscrit a donc mené à l'identification de certaines PTM *in vivo*. Dans la littérature, certaines de ces PTM ont été associées à des effets sur des interactions spécifiques, comme celle avec l'antigène (pour N⁵⁷) ou avec les récepteurs F_c (pour M²⁵⁵). Néanmoins, il n'a pas été prouvé dans ce manuscrit que les proportions obtenues de ces PTM, même après 30 jours d'incubation, sont susceptibles d'entraîner une baisse d'efficacité thérapeutique. En particulier, les résultats de l'extraction, basée sur l'interaction infliximab/TNF- α , n'ont pas montré de perte de rendement d'infliximab, même à 30 % de *dea*N⁵⁷ après 50 jours d'incubation. Ces résultats indiquent que l'infliximab peut toujours se lier au TNF- α avec ce niveau de déamidation, mais l'affinité de cette interaction n'a pas été étudiée.

Enfin, un aspect important à prendre en compte est l'existence d'autres PTM potentiellement responsables d'un changement de l'activité thérapeutique de l'infliximab après administration. Dans le cadre de ce projet doctoral, nous nous sommes particulièrement intéressés aux *dea*N, *iso*D, *oxi*M et à la glycosylation, définis en tant que *hotspots*, qui représentaient un défi analytique en termes de séparation et détection en une seule analyse. Il serait particulièrement intéressant d'adopter une **approche de suivi non ciblée** de l'évolution des PTM, sur l'ensemble des acides aminés de l'infliximab. Dans cette optique, le couplage CE-MS/MS pourrait être utilisé pour suivre plusieurs PTM *in vivo* du mAb et les corrélérer avec les réponses cliniques des patients. Pour cela, une étude de cohorte serait nécessaire pour établir des liens statistiquement significatifs entre certaines PTM et la réponse clinique. Une telle approche permettrait de mieux comprendre l'impact des PTM sur l'efficacité thérapeutique de l'infliximab et d'ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine des thérapies par anticorps.

PARTIE IV : IDENTIFICATION ET
QUANTIFICATION D'ANTICORPS IMMUNOGENES
PAR CE-MS/MS

Les résultats de l'analyse des 24 sérums de patients de la partie III ont montré que la concentration d'infliximab varie d'un patient à un autre, et ce, de manière non corrélée avec le temps de résidence de l'anticorps. Cela indique donc une pharmacocinétique patient-dépendante du traitement thérapeutique. Ces disparités pourraient être partiellement expliquées par des réactions auto-immunes que certains patients développent contre le traitement. Il s'agit d'anticorps produits par le système immunitaire, dirigés contre le mAb thérapeutique, qui peuvent mener à la perte à son élimination précipitée de l'organisme [276]. En particulier, l'infliximab, possède 25 % de sa séquence issue d'un anticorps murin qui peut être reconnu par l'organisme comme corps étranger. Ces anticorps anti-médicament (ADA) sont plus spécifiquement appelés ATI (*Antibodies-to-infliximab*) dans le cas de l'infliximab. Si ces ATI sont dirigés contre les zones CDR de l'infliximab, l'empêchant de se lier au TNF- α , ils sont nommés « neutralisants » : NATI. Dans le cadre d'un suivi clinique d'un traitement par infliximab, l'identification et la quantification de NATI s'effectuent généralement lorsque la concentration d'infliximab mesurée dans le sérum des patients est anormalement faible.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette partie IV portent sur l'implémentation de la quantification de NATI à la méthode préalablement développée. L'intérêt fut qu'à partir d'une seule analyse en CE-MS/MS d'un sérum, trois quantifications majeures d'un suivi clinique soient possibles :

- 1) La quantification de l'infliximab ;
- 2) La détermination des niveaux des PTM post-administration ;
- 3) La quantification de NATI.

Cette partie IV est divisée en deux chapitres. Le chapitre 10 décrit le développement d'une nouvelle méthode basée sur l'analyse CE-MS/MS pour la détermination de la constante de dissociation de l'interaction NATI/infliximab.

Le chapitre 11 présente la mise en place de la méthode par CE-MS/MS pour quantifier simultanément les NATI et l'infliximab. Puis, la stratégie a été appliquée à l'analyse de 13 sérums de patients suivant une thérapie d'infliximab. Ces mêmes données ont été utilisées pour recueillir des informations sur les PTM de l'infliximab, dans la discussion additionnelle.

CHAPITRE 10.

STRATEGIE CE-MS/MS POUR LA DETERMINATION DE CONSTANTE DE DISSOCIATION ENTRE DEUX ANTICORPS

Préambule

Les mAbs, en raison de leur spécificité ciblée, présentent un intérêt considérable car ils sont dirigés contre un récepteur spécifique. Cependant, dans certaines situations, le patient peut développer des anticorps anti-médicament (ADA) qui ciblent le mAb thérapeutique, entraînant ainsi une réduction de son activité biologique [277]. L'étude des interactions entre le mAb et les ADA permet de mieux comprendre les mécanismes des réponses immunitaires, et peut aider à identifier les traitements thérapeutiques vulnérables à une perte d'efficacité, entraînant une réponse clinique défavorable [60,278]. Plus un mAb thérapeutique induira la production d'ADA ayant une forte affinité avec lui, moins le traitement sera efficace. L'EMA a élaboré des directives pour l'évaluation de l'immunogénicité, qui peut être requise au cas par cas [279]. Ces directives portent principalement sur l'analyse des données immunologiques, pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, d'efficacité clinique et de sécurité.

L'affinité intrinsèque entre un paratope d'un anticorps et un épitope d'un antigène peut être exprimée comme étant inversement proportionnelle à la constante de dissociation, qui reflète les forces chimiques qui les séparent. Selon la loi d'action de masse, et considérant la liaison d'un paratope mono-ligaté, la constante de dissociation (K_d) entre ces deux espèces peut être liée à leurs activités, comme indiqué dans l'équation (10.1).



$$K_d = \frac{a_{\text{paratope}} a_{\text{épitope}}}{a_{\text{complexe [paratope/épitope]}}} \quad (10.1)$$

a_x : Activité du composé x

K_d : Constante de dissociation

Pour tout soluté, on peut définir l'activité comme égale à γ *concentration, avec γ le coefficient d'activité.

De multiples méthodes analytiques permettent de déterminer le K_d de l'affinité intrinsèque entre un anticorps et l'antigène associé. On cite notamment l'analyse radio-immunologique (RIA),

la méthode de résonance plasmonique de surface (SPR), ou encore les immunodosages tels que ELISA. Ces approches consistent à suivre l'interaction antigène/anticorps. Pour beaucoup de ces méthodes, ce suivi se base sur la quantification ou bien des espèces non liées ou bien des complexes formés, après état d'équilibre. Puis, ces concentrations sont implémentées dans la loi d'action de masse (10.1) pour déterminer la constante de dissociation K_d . Généralement, le coefficient d'activité γ est égal à 1 pour les gammes de concentration étudiées. La caractérisation de l'affinité entre des anticorps anti-médicaments et les médicaments est encore peu établie, bien qu'elle permette de mieux comprendre le devenir des traitements [280]. Ainsi, ce chapitre propose une nouvelle approche, basée sur une analyse CE-MS/MS, pour déterminer l'affinité entre un paratope d'un anticorps monoclonal et celui d'un ADA neutralisant. Ces travaux décrivent une nouvelle méthodologie cherchant à s'affranchir de problématiques rencontrées dans certaines stratégies :

- **Configuration de l'interaction.** Pour déterminer la constante de dissociation entre deux espèces, il faut dans un premier temps réaliser leur interaction. Dans certaines approches, l'affinité intrinsèque monovalente se détermine après fixation sur phase solide, ou encore marquage de l'un des composés. Or, il a été décrit que ces étapes peuvent altérer les paratopes impliqués dans l'interaction [170,281]. Ces altérations modifient alors les interactions non covalentes mises en jeu et impactent la valeur de K_d . Ainsi, la stratégie mise en place ici réalise la complexation en phase liquide, dans la matrice biologique, sans marquage préalable des anticorps, afin de reproduire les interactions biologiques *in vivo*.

Cette configuration, en plus de ne pas altérer structurellement les anticorps avant leur interaction, va prendre en compte la bivalence des anticorps. En effet, ces protéines possèdent deux bras de liaison et peuvent mener à des stœchiométries diverses. Certaines méthodologies de détermination de K_d impliquent la fixation du mAb par l'un de ses bras pour suivre l'interaction d'un antigène sur le deuxième. Or, il est possible que les forces d'une liaison paratope/épitope soient différentes si le mAb est lié à un autre composé sur son deuxième paratope ou non. Ici, nous avons donc cherché à calculer le K_d apparent de toutes les interactions formées.

- **Méthode de quantification.** Comme décrit dans le paragraphe précédent, la détermination d'un K_d d'une interaction entre deux composés se base, pour beaucoup de méthodes, sur un suivi quantitatif d'au moins une des espèces (libre ou complexée). Ainsi, cette quantification doit être la plus juste possible afin d'obtenir une constante de dissociation fiable. Les pertes associées aux lavages, à la préparation d'échantillon et à l'analyse doivent donc être contrôlées. Nous avons donc cherché à normaliser ces biais par l'utilisation d'un étalon interne, afin d'obtenir la quantification absolue d'une des espèces.

Ces travaux font état de preuve de concept, et ont été appliqués sur l'infliximab et son NATI (*Neutralizing antibody to Infliximab*). Le NATI choisi est un commercial de type IgG1, l'isotype majoritaire des ATI de l'infliximab. L'objectif a été de déterminer la constante de dissociation de leur interaction paratope/épitope. Ici, le K_d déterminé correspond à celui dit apparent, c'est-à-dire moyen de toutes les interactions paratope/épitope formées.

L'infliximab et le NATI étant bivalents, ils peuvent résulter en des complexes de stœchiométries variées. Afin de caractériser ces formes complexées, l'interaction NATI/infliximab a été dans un premier temps étudiée par photométrie de masse (MP). Ces analyses font l'objet d'une collaboration et ont été réalisées dans le Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO) de Strasbourg, dirigé par Sarah Cianféroni.

Photométrie de Masse

Le principe de la photométrie de masse repose sur la mesure optique de la diffusion d'un faisceau lumineux généré par une particule à l'interface verre-eau. Ainsi, la molécule à analyser est disposée dans un tampon aqueux, qui forme une goutte sur une plaque en verre. La mesure du signal de diffusion d'un faisceau incident est linéairement proportionnelle à la polarisabilité de la molécule. Le contraste radiométrique (différence entre la lumière diffusée et celle réfléchie) obtenu peut alors être converti à la masse de la particule. Cette technique permet donc de remonter aux masses de biomolécules et à leurs abondances. Il s'agit d'une mesure en solution, avec une grande gamme de masse, ne nécessitant que quelques microlitres et nM d'échantillon, générant des résultats en quelques minutes, mais peu résolutive (FWHM : 25 kDa).

Les travaux présentés dans le chapitre qui suit sont en cours de finalisation et sont rédigés en anglais dans une démarche de diffusion scientifique. La méthodologie de détermination d'une constante de dissociation entre deux anticorps est présentée, et appliquée sur de l'infliximab en tant que preuve de concept. L'objectif fut de développer une approche capable de déterminer l'affinité apparente moyenne entre toutes les interactions infliximab/NATI formées en matrice biologique. La stratégie s'affranchit de plusieurs problématiques rencontrées dans la littérature, mais repose sur des hypothèses, dont de futures recherches permettront d'assurer la validité. Après finalisation, ces résultats seront soumis à une revue scientifique à comité de lecture.

Monoclonal antibody – Anti-drug antibody affinity constant determination using Capillary Electrophoresis – tandem mass spectrometry

Tessa Reinert, Pascal Houzé, Nathalie Mignet, Aynur Naghizade, Lola Alez-Martin, Sarah Cianferani, Oscar Hernandez-Alba, Armand Leclerc, Yannis-Nicolas Francois, Rabah Gahoual

Publication in preparation

Abstract:

Measurements of antigen-antibody interactions are critical to understanding the outcome of biotherapeutics after administration. In particular, the affinity between an antibody and its immune response, an anti-drug antibody, is of growing interest for medical applications. Immobilization and label-free techniques are the current methods widely used for such applications, due to their simplicity, but they struggle to measure tight interactions and can lead to non-native environments or configurations of the protein.

In this study, we propose a novel approach to determine the affinity dissociation constant between an antibody and an anti-drug antibody by promoting immobilization-free complexation under physiological conditions. The key advantage of this method is that it mimics *in vivo* interactions by avoiding the application of physical forces like washing steps and diffusion, which can cause denaturation or dissociation of the complexes, leading to erroneous measurements. The interaction of the two IgGs was first studied by mass photometry to determine equilibrium conditions and was then performed in a biological matrix. The method employs a competitive screening assay that allows absolute quantification of the residual amount of active drug by CE-MS/MS analysis.

To demonstrate the effectiveness of the approach, we applied it to investigate the interaction between infliximab, an anti-inflammatory treatment, and its neutralizing anti-infliximab antibody. The results revealed a dissociation constant of 14.8 ± 1.2 nM. The strategy's sensitivity, accuracy, and efficiency make it highly suitable for the determination of dissociation constants (K_d), especially when dealing with immunogenic reactions.

10.1. Introduction

Protein-protein interactions are essential for biological processes such as receptor recognition or cell migration. The strength of these interactions can determine the outcome of these processes. Therefore, it is extremely important to evaluate the interaction affinities. In particular, during monoclonal antibody treatment, the organism can develop neutralizing anti-drug antibodies (n-ADAs) that bind to the active site of the drug and inhibit its interaction with the corresponding antigen.

ELISA-based methods for assessing the affinity of an antibody for an antigen are extremely attractive because they require a small amount of antibody and are relatively fast and

straightforward. An appropriate approach is based on the measurement of the concentration of unbound antibodies in an antibody-antigen mixture after equilibrium using an ELISA assay. Then, it is possible to relate this measurement to the affinity of both compounds using the law of mass action. In 1985, Friguet *et al.* suggested a mathematical solution for this application [282], which was further investigated to achieve a more precise affinity measurement [283,284]. Joyce *et al.* (2022) applied this method to determine the affinity of an antidrug antibody in clinical samples [280]. Nonetheless, although the mathematical aspect has been extensively investigated to limit errors in affinity assessment, the analytical method relies on the quantification of residual free antibodies by immunoassay, which is known to be highly affected by interferences, especially when the ligand-binding assay is designed for anti-drug antibody quantification [172,285–288]. In addition, the surface functionalization of mAbs in an ELISA plate, which can lead to epitope alteration, along with the multiple washing steps that can dissociate low-affinity complexes, induces false positive and negative results in the quantification, affecting the affinity measurement [170,281].

The present paper is devoted to the constant dissociation K_d of the therapeutic mAb infliximab (IFX) and a neutralizing anti-drug antibody referred to as neutralizing antibody-to-infliximab (NATI). Stable isotope-labeled infliximab (SIL-IFX) was used for infliximab/NATI complexation as it was considered to have the same bioactivity as unlabeled infliximab. The approach is similar to that of Bobrovnik *et al.* (2003) but is implemented using capillary electrophoresis hyphenated to mass spectrometry (CE-MS/MS) for the quantification of remaining active infliximab after controlled complexation. The aim was to provide accurate and absolute quantification of this compound based on the high selectivity of MS, and the use of an isotope-labeled internal standard of adalimumab (SIL-ADM) to account for any losses.

The developed method consisted of immobilization-free infliximab/NATI complexation performed directly in the serum matrix. Thus, the aim of the method was to mimic the *in vivo* interactions and avoid denaturation or dissociation of the complexes. The stoichiometry of infliximab/NATI complexation was investigated using mass photometry (MP) analysis. Subsequently, the fraction of infliximab not neutralized by NATI, was extracted from the serum sample by affinity purification. Finally, purified mAbs were submitted to proteolytic digestion, and the peptide mixture obtained was characterized using capillary zone electrophoresis hyphenated to tandem mass spectrometry (CE-MS/MS). Thereby, the methodology consists of a competitive screening assay aimed at accurately quantifying the amount of infliximab neutralized by NATI using indirect absolute quantification. CE-MS/MS analysis performed at different concentrations of NATI was used to determine the dissociation constant K_d .

10.2. Materials and methods

- **Chemicals.** Stable isotope labeled infliximab (SIL-IFX) and adalimumab (SIL-ADM) were labeled on all arginines and lysines ($^{13}\text{C}_6$; $^{15}\text{N}_4$) and supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). A full-length human anti-idiotypic antibody against IFX (clone AbD17841_hIgG1) used as a standard NATI was obtained from BioRad Laboratories (California, U.S.A). Streptavidin M-280 DynabeadsTM and biotinylated TNF- α were obtained from Fisher Scientific Invitrogen (Illkirch, France). Sequencing-grade modified trypsin was purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA).

- **SIL-IFX quantification calibration sample preparation.** Blank serums, free from IFX and NATI, were obtained from the French Institute of Blood (Paris, France). Standard solutions used to determine SIL-IFX calibration curves were prepared from blank serum spiked with increasing SIL-IFX concentrations ranging from 1 to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and SIL-ADM a constant concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

- **K_d determination samples preparation.** Samples used for K_d determination using CE-MS/MS analysis were prepared from blank serum spiked with a constant concentration of SIL-ADM and SIL-IFX (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ each) and increasing concentrations of NATI ranging from 1 to 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Afterward, samples were incubated for 1 h at 20°C prior to further treatment.

- **CE-MS/MS sample preparation.** The preparation of serum samples was identical to the protocol recently published by our group [270]. Briefly, ferromagnetic beads (DynabeadsTM) and TNF- α were mixed and incubated for 1 h at 20°C. The serum solution was then added to the beads and left for 1h at room temperature to allow any TNF- α inhibitor to bind to the beads. After elimination of the serum solution, acidic dissociation of the mAbs from TNF- α was performed by addition of MeOH/H₂O/FA (48.5/48.5/3; v/v/v) solution. The supernatant was dried. 70 μL of ammonium bicarbonate buffer (50 mM, pH 8) was used to reconstitute the sample prior to the denaturation-reduction-alkylation-digestion workflow, which is commonly used for the bottom-up strategy of monoclonal antibodies [119]. Finally, the peptide digests were dried and diluted in 5 μL ammonium acetate, 100 mM, pH 4.

- **Capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry analysis.** The CESI8000® capillary electrophoresis system (Sciex separations, Darmstadt, Germany) coupled to a Sciex 5600 TTOF mass spectrometer (Darmstadt, Germany) operated by the Analyst® software (Sciex, Darmstadt, Germany) was used to analyze the peptide mixture. The conditions for CE-MS/MS

analysis are identical to a previous article in our group [270]. Hyphenation of CE with ESI-MS was performed using a sheathless interface. The separation capillary, filled with the background electrolyte (BGE, 10 % acetic acid), was made of bare fused silica (total length 100 cm; 30 μm i.d.), and its outlet end was etched. During each separation run, 68 nL of the peptide digest was injected (5 psi, 100 s). A voltage of 23 kV was applied for the separation. The applied ESI voltage was 1.5 kV, source heating temperature was 100 °C, and curtain gas was set to 2. Experiments were performed in Top20 information-dependent acquisition (IDA, Sciex) with a total duty cycle of 1.9 s during 60 min of analysis.

- **Quantification of free SIL-IFX.** The quantification of purified SIL-IFX was based on the monitoring of the area of the peak corresponding to the proteospecific peptide IFX*_{LC01}, first peptide of the light chain (Table 10.1). In order to provide robust infliximab absolute quantification, SIL-ADA, which is another mAb targeting TNF- α , was used as an internal standard and monitored by the intermediate of the peptide ADM*_{HC01} (Table 10.1). The MS and MS/MS spectra were studied to ensure unambiguous identification of the two compounds. The SIL-IFX peptide IFX*_{LC01} is located on the variable part of infliximab and its specificity was verified by a blast search against a human proteome database. Because ADM is a humanized antibody, the selected peptide is not strictly specific to the mAb. However, the SIL-ADM internal standard incorporated arginine, which contains heavy isotopes for carbon and nitrogen that allowed specific detection in MS.

Table 10.1. Ions of surrogate's peptides for SIL-IFX and SIL-ADM

<i>Peptide sequence</i>	<i>Name</i>	<i>Analyte</i>	<i>Role</i>	<i>Precursor (m/z)</i>	<i>Product ions (m/z)</i>
DILLTQSPAILSVPGER* (¹³ C, ¹⁵ N)	IFX* _{LC01}	SIL-IFX	Quantifier	953.53	y9-967.54; y6-654.34; y8-854.34; y5-555.27 y7-741.37;
EVQLVESGGGLVQPGR* (¹³ C, ¹⁵ N)	ADM* _{HC01}	SIL-ADM	Internal standard	817.94	y8-909.45; y5-498.27; y7-746.39; y4-441.25 y6-645.34;

- **Mass photometry.** MP experiments were carried out on a OneMP instrument (Refeyn, UK) at room temperature (approximately 20 °C). Microscope coverslips (24×50 mm, Fisher Scientific and 24×24 mm, Globe Scientific) were prepared by rinsing them consecutively with isopropanol and H₂O and drying them under a stream of clean nitrogen. High-concentration protein stocks were diluted in PBS (Phosphate buffer solution). Solutions containing NATI (3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and SIL-IFX (3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were incubated for different times (1-60 min) before being loaded into the flow chambers formed by stacked coverslips. For the dynamic study, NATI was fixed at 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and SIL-IFX (0-24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added to the samples and incubated for 10 min before analysis. Images were processed using the LabView software provided by the manufacturer (Reofeyn, UK).

10.3. Results and discussions

10.3.1. IFX/NATI complexation study using mass photometry

The assessment of the dissociation constant (K_d) for the interaction between infliximab and its neutralizing anti-infliximab antibody (NATI) was carried out using a multi-step approach. The first step involved utilizing mass photometry (MP), a cutting-edge single-molecule technique, to evaluate various aspects of the complexation process, including the stoichiometry and kinetics of the infliximab/NATI neutralization. MP is a recent and powerful method used for studying biomolecular interactions. It has been extensively used in previous studies to investigate various biological processes [289–292].

10.3.1.a. Stoichiometry of the infliximab/NATI interaction

Equimolar solutions of infliximab and NATI at $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS were incubated for 1 hour at 20°C and analyzed in MP (Figure 10.1.a). Since both antibodies have two F_{ab} in the active variable domain for binding, the stoichiometry of the resulting complex can vary. As shown in Figure 10.1.a, the majority of the complex formed has an approximate molecular weight of 290 kDa, corresponding to a complex formed by one NATI and one infliximab (each having a molecular weight of ~ 150 kDa). In addition, MP spectra exhibited a weak signal at mass 433 kDa, which could be attributed to the formation of complexes presenting 1:2 and 2:1 stoichiometries. Finally, the MP data showed the identification of macromolecular complexes with a mass of 577 kDa potentially corresponding to 2:2 stoichiometry. However, MP signal intensities showed that the 1:1 stoichiometry represented the near entirety of the complex formed compared to higher stoichiometries.

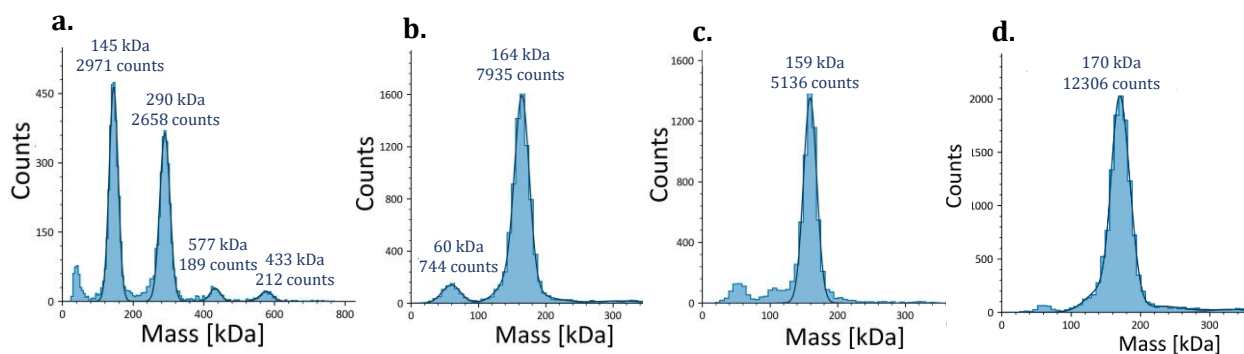


Figure 10.1. Mass photometry data for **a.** SIL-IFX and NATI mixture at $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, **b.** NATI and **c.** SIL-IFX at $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ individually. **d.** Incubation of NATI and SIL-ADM both at $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

To ensure that the peak at 290 kDa did not contain NATI or infliximab dimers, both proteins were analyzed individually and did not show dimeric forms (Figure 10.1.b-c). Plus, the adalimumab antibody was shown to be inert in the presence of NATI in Figure 10.1.d. After

incubation of NATI and SIL-ADM, the MP data resulted in a single signal at 170 kDa. Therefore, the results highlight that NATI targets the infliximab F_{ab} but not the adalimumab F_{ab} , although both antibodies are anti-TNF- α . This could be explained by the differences in the amino acid sequence of the two mAbs in the F_{ab} region, with infliximab having a murine sequence and adalimumab being a humanized antibody.

The MP data indicated that the interaction between NATI and infliximab resulted mainly in a 1:1 stoichiometry. One crucial consideration is the bivalence of both compounds due to their IgG1 nature. Hence, in the presence of NATI, infliximab can exist in either an unliganded, singly liganded, or doubly liganded form, as represented in Figure 10.2. In its singly liganded form, infliximab can be bound to a NATI on one F_{ab} and still be active, meaning that it can still bind its other arm to TNF- α .

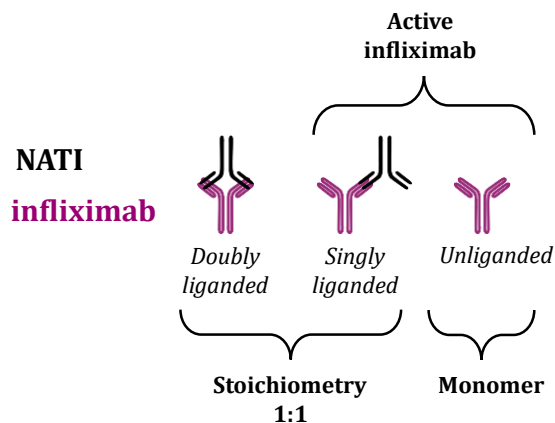


Figure 10.2. Forms of binding of the mAbs for a 1:1 stoichiometry.

10.3.1.b. Equilibrium assessment

A kinetic study of the complexation process was performed by incubating NATI and infliximab in PBS for different incubation times up to 60 min (Figure 10.3.a). The relative proportion of each of the 4 monitored peaks showed that the equilibrium state seemed to be reached after 3 min of incubation. Beyond this time, we can assume that the system is stable and will not reorganize. The results also highlight that the other forms of complexes remained systematically below 4 % regardless of the incubation time. Plus, the evolution of the proportions of each species was evaluated with different initial molar proportions of NATI and infliximab. These data support the fact that NATI and infliximab will interact with their F_{ab} regions, leading mostly to 1:1 complexes, which can include singly liganded and doubly liganded mAbs.

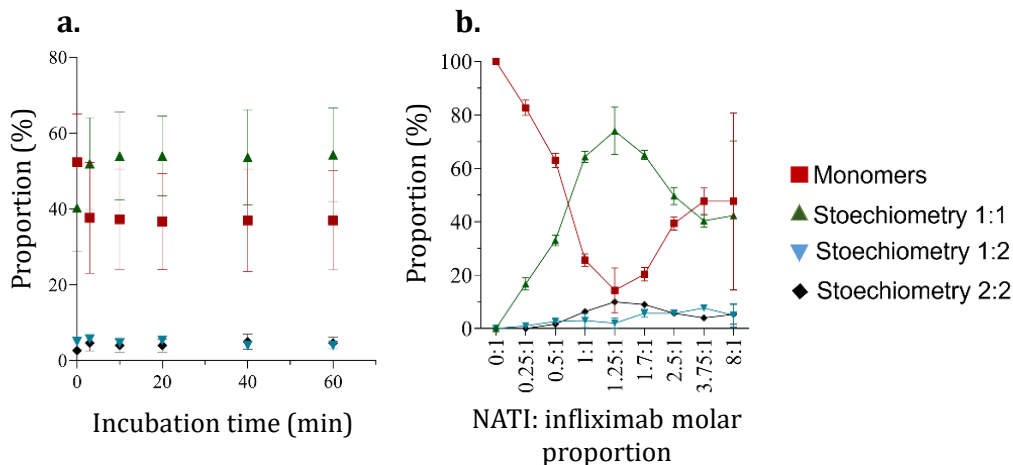


Figure 10.3.a. Kinetic study of SIL-IFX/NATI complexation. SIL-IFX and NATI fixed at $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS, acquisition by mass photometry after different incubation times ($n=3$, error bars represent the standard deviation). **b.** Evolution of species' proportion with different initial molar proportions ($n=3$, error bars represent the standard deviation).

10.3.2. CE-MS/MS for K_d determination of infliximab/NATI interaction

The affinity between neutralizing-antibody-to-infliximab (NATI) and infliximab was assessed using the workflow depicted in Figure 10.4. The approach was derived from a competitive screening assay. Infliximab and NATI were added to the model serum and incubated at 37°C for 1 hour. The MP experiments had shown that equilibrium was reached before this time.

Then, the amount of active infliximab (i) that did not form complexes with NATI is quantified. An internal standard, consisting of stable-isotope labeled adalimumab (SIL-ADM), was also added to the serum in order to account for possible losses during sample preparation and/or analysis. Adalimumab is also an anti-TNF- α mAb that was not affected by NATI neutralization; thus, it could be extracted simultaneously with the active infliximab. After extraction and digestion of the purified infliximab and adalimumab antibodies, capillary electrophoresis hyphenated by mass spectrometry (CE-MS/MS) was used to monitor the surrogate peptides of Table 10.1, using analytical conditions recently developed by our group [270].

The objective was to link the MS signal of active infliximab to accurately assess the dissociation constant of the infliximab/NATI interaction. The first step was therefore to establish the absolute quantification of active SIL-IFX (in purple) using SIL-ADM (in orange). This was verified by determining the concentration range where the MS response of the surrogate peptides achieves linearity. Next, the relationship between active SIL-IFX concentration and the K_d was determined. Finally, the workflow was applied to the IgG-enriched serum for K_d determination.

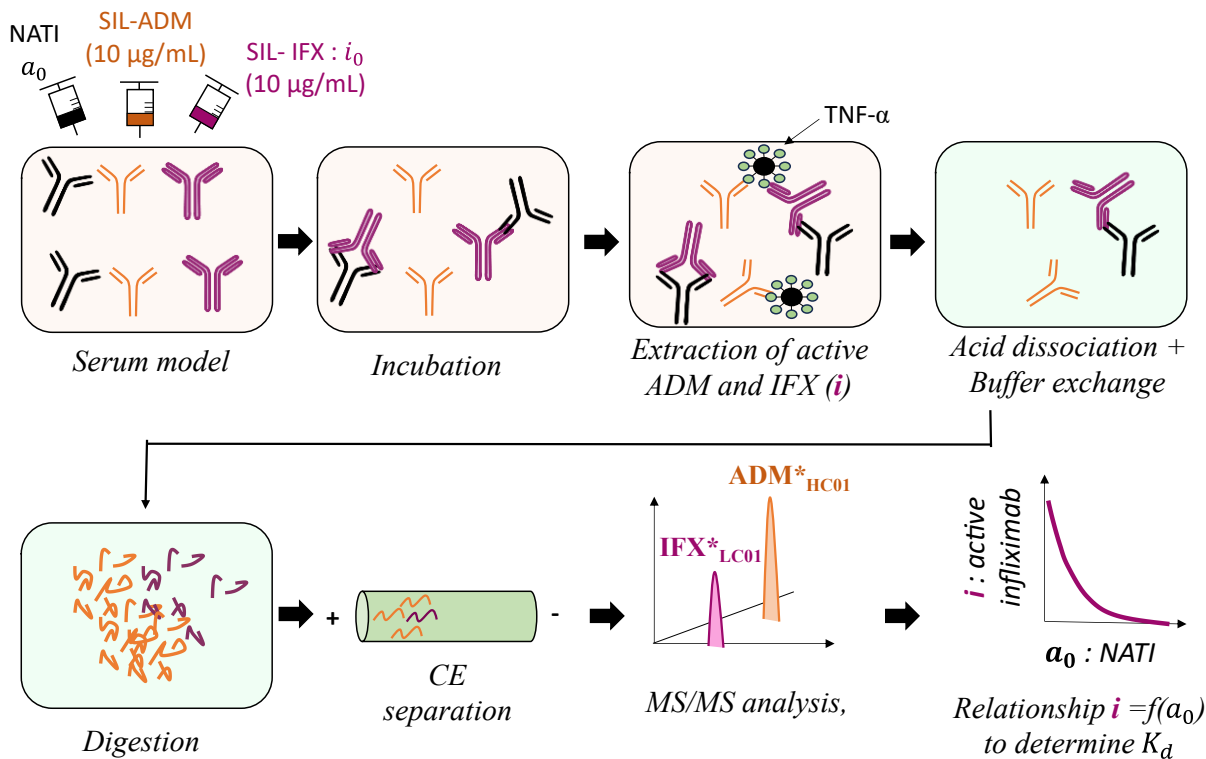


Figure 10.4. Workflow for the K_d determination of infliximab/NATI complex, using CE-MS/MS analysis.

10.3.2.a Quantification of active infliximab

The characteristics of the absolute quantification of infliximab were first evaluated without the presence of NATI. The selectivity of the method was verified by analyzing serum samples spiked with SIL-IFX and SIL-ADM only. After CE-MS/MS analysis, the two surrogate peptides IFX*_{LC01} and ADM*_{HC01} exhibited significant different mobilities, leading to their consistent separation in CZE (Figure 10.S1). In addition, no interference was observed in the extracted ion electropherograms of the two peptides.

Consequently, the linearity between the ratio (r) of the surrogate peptides measured by CE-MS/MS, and the concentration of active SIL-IFX was investigated in Figure 10.5. Good repeatability and linearity ($r^2=0.982$) were achieved over the range of 1-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Therefore, the results highlight that the quantification of active infliximab is possible in these concentration ranges. The intercept is very close to zero and can be neglected.

For the following experiments, as described in the Figure 10.4, the SIL-IFX and SIL-ADM were added systematically at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (i_0). We define $r_0 = 1$ as the ratio when no NATI is present in the serum. Thus, in the subsequent experiments, depending on the initial concentration of NATI (a_0) in serum, the concentration of remaining active infliximab (i) will vary in the range 0 - 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and can be quantified using this linear relationship.

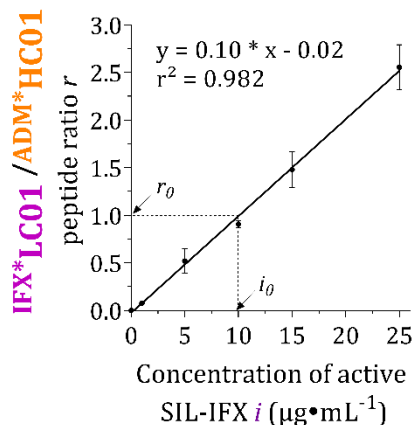


Figure 10.5. Linearity of the IFX*LC01 / ADM*HC01 peptide ratio with the concentration of SIL-IFX (0-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
 Concentration of SIL-ADM fixed at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. $r^2 = 0.982$, $n = 3$.

10.3.2.b. Interaction between infliximab and NATI paratopes

The affinity assessed in this work corresponds to the interaction of the paratopes on the F_{ab} region of infliximab and NATI. Table 10.2 presents the concentrations of active (free) and bound F_{ab} paratopes when infliximab and NATI are introduced into the same serum. Bobrovnik *et al.* (2003) described a similar paratope interaction study after measuring the absorbance of an antibody in an ELISA plate after complexation with its antigen [283]. As their study was based on an antigen-antibody interaction, they took into account the bivalency of the antibody, but not the antigen. It was possible to adapt their mathematical model to ours (antigen being the bivalent NATI).

Table 10.2. Complexation reaction of infliximab and NATI paratopes when introduced in a solution.

State	Paratope (SIL-IFX) +	Paratope (NATI) \leftrightarrow	Liganded paratopes
Initial	$2i_0$	$2a_0$	0
Equilibrium	$2i_0 - x$	$2a_0 - x$	x

a_0 the initial concentration of NATI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
 i_0 the initial concentration of SIL-IFX ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
 x the concentration of liganded paratopes ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

The term “ x ” defines the concentration of total bound infliximab/NATI paratopes at equilibrium. Consequently, “ p ” represents the probability that a paratope of infliximab is neutralized:

$$p = \frac{x}{2i_0} \quad (10.2)$$

Thus, the probability of active infliximab paratope is $(1 - p)$. For an entire infliximab to be fully neutralized, both of F_{ab} paratopes must be bound to NATI, resulting in the product of the two “ p ” probabilities, assuming independent events. The probability that infliximab is fully neutralized is

$$p^2 = \left(\frac{x}{2i_0}\right)^2 \quad (10.3)$$

The probability of having active infliximab with at least one paratope free (unliganded or singly liganded) is also equal to the probability of extracting active infliximab during the affinity purification step described in Figure 10.4.

$$1 - p^2 = \frac{i}{i_0} \quad (10.4)$$

Using equation (10.3) and the linearity between r and i established in Figure 10.5, we can conclude that:

$$1 - \left(\frac{x}{2i_0}\right)^2 = \frac{r}{r_0} \quad (10.5)$$

Solving for x , and using numerical values for $i_0 (= 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ and $r_0 (= 1)$, one establishes

$$x = 2i_0 \sqrt{1 - \frac{r}{r_0}} = 20\sqrt{1 - r} \quad (10.6)$$

10.3.2.c Determination of K_d using CE-MS/MS analysis

Based on the law of mass action, the dissociation constant of infliximab/NATI paratope interactions can be defined as:

$$K_d = \frac{(2a_0 - x)(2i_0 - x)}{x} \quad (10.7)$$

Equation (10.6) has been further transposed into equation (10.7), still using the numerical value 1 for r_0 , resulting in the establishment of the following expression:

$$\frac{a_0}{K_d} = \frac{\sqrt{1 - r}}{2(1 - \sqrt{1 - r})} \quad (10.8)$$

Detailed calculations are given in the supporting information. Note that the equation (10.8) was established with the hypothesis that $2a_0 \gg x$, which means that the initial concentration of NATI must be higher than the concentration of the formed complexes. Bobrovnik *et al.* (2003) have suggested that this equation is valid even if the condition $2a_0 \gg i_0$ is difficult to observe, especially because the plot of equation (10.8) will minimize the associated errors. The small values of a_0 will have little effect on the linear regression [283].

The objective was to assess with CE-MS/MS the ratio denoted as r , of standard serum solutions containing NATI (a_0 : 0 – 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), alongside fixed concentrations of infliximab (i_0) and SIL-ADM. The graph of the IFX*_{LC01}/ADM*_{HC01} surrogate peptide ratios is depicted in Figure 10.6 and shows a progressive decline with higher concentrations of NATI. This phenomenon indicates the diminishing biological activity of infliximab due to the neutralizing effect of NATI, which consequently hinders its extraction during the purification process.

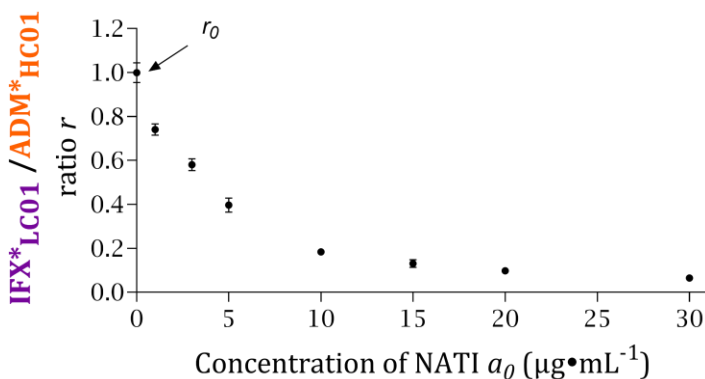


Figure 10.6. Ratio between SIL-IFX/SIL-ADM CE-MS/MS signals as function of the initial concentration of neutralizing-antibodies-to-infliximab (NATI, a_0) added to serums. Error bars represent the standard deviation among the triplicates.

The results presented in Figure 10.6 highlight crucial information on the infliximab/NATI complexation. At equimolar molar concentration ($i_0 = a_0 = 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), it appears that approximately 80 % of the infliximab antibodies were fully neutralized by the NATI (both paratope bound) and therefore not extracted by TNF- α . This could suggest that under native conditions, the majority of NATI/infliximab interactions occur in a doubly liganded form (Figure 10.2).

It is important to note that, in order to derive the affinity dissociation constant K_d from the CE-MS/MS analysis, we considered that the extraction of the active infliximab from the mixture using TNF- α functionalized beads did not readjust the equilibrium of the NATI/SIL-IFX neutralization. Equilibrium readjustment was found to be negligible in a previous study for another antigen/antibody complex after extraction in ELISA plates [282]. This property was explained by the nanomolar affinity of the interactions between infliximab and NATI or TNF- α . Consequently, equation (10.8) was used to calculate the apparent K_d , by plotting a_0/K_d as a function of the initial concentration of NATI a_0 , as shown in Figure 10.7. K_d corresponds to the inverse of the slope and was found to be 14.8 ± 1.2 nM. The error was calculated as the 95 % confidence interval of the slope.

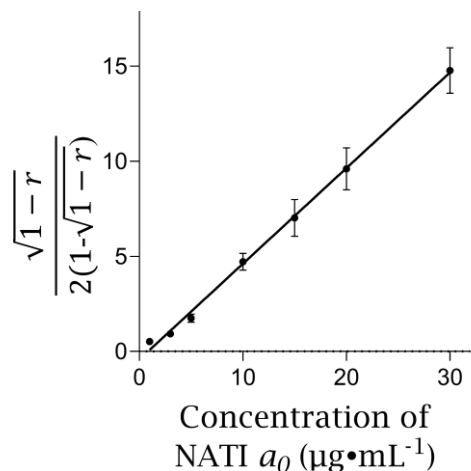


Figure 10.7. Plot of a_0/K_d calculated using equation (10.8) as a function of the initial concentration of NATI a_0 . Linear relationship ranging from 0 to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. $r^2 = 0.973$. $Y = 0.45 \cdot X - 0.23$. Error bars represent the standard deviation among the triplicates.

The information provided by the manufacturer of NATI indicated a K_d value of 1.8 nM for the monovalent intrinsic affinity between NATI and infliximab, which represents a non-negligible deviation, although it also reflects a strong affinity. We believe that the difference originates from the design of the workflows. The affinity corresponds to the strength of the interaction of a single paratope of infliximab with a paratope of a NATI. The manufacturer evaluated the monovalent intrinsic affinity after functionalization of infliximab on a solid plate. Here, the strategy was performed in a native environment, which may have different structural conformation, and thus imply different binding forces. Moreover, the K_d calculated in this paper reflects the average binding strength of all paratopes with infliximab existing in mixed valences of F_{ab} region. Indeed, we could suggest that the intrinsic affinity of a local infliximab(paratope)/NATI(paratope) interaction might differ slightly depending on whether the compounds are singly liganded or doubly liganded [293].

Overall, this methodology provides valuable insight into the interaction between infliximab and NATI while minimizing artifacts and preserving the native state of the components. The strategy maintains the liquid diffusion of both antibodies, without any labeling or surface-functionalization during the complexation. Another advantage of this approach is that it focuses on the quantification of unbound drugs, and the complexes are not the primary target of the method. In addition, the strategy incorporates an internal standard, to account for losses during sample preparation, thereby improving the reproducibility of the method.

10.4. Conclusions

The study demonstrated a novel label-free and immobilization-free method for determining the dissociation constant between a mAb and its neutralizing anti-antibody. The approach utilized capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) and an internal standard to eliminate bias during manipulation and analysis, enabling precise characterization of the remaining active infliximab by absolute quantification. MS quantification using a peptide-centric approach has proven its validity and efficiency in several applications. The use of tandem MS/MS facilitated the accurate identification of surrogate peptides. Plus, the quantification of unbound compounds minimized errors associated with maintaining complex integrity. A robust mathematical model compatible with CE-MS/MS data was developed to relate the concentration of remaining active infliximab to the apparent dissociation constant. To our knowledge, CE-MS/MS has never been used to determine the dissociation constant between therapeutic mAbs and their corresponding anti-drug antibodies. We applied this strategy to a specific NATI of IgG1 type, as it represents the majority of immunogenic responses of patients treated with infliximab, in order to provide a proof-of-concept of the CE-MS/MS analytical strategy [294].

The developed approach therefore calculates the apparent K_d between two paratopes in a native environment which represents relevant information about the immunogenic response of a drug. The mathematical model assumed a binomial distribution of monovalently versus divalently occupied antibodies. It was further assumed equal recognition of singly liganded and unliganded infliximab on TNF- α . Those assumptions, although currently widely used for K_d assessment, could require further investigation to assure their validity in the considered system [295]. Plus, the accuracy of the strategy should be assessed through multiple batches of infliximab and NATI. Overall, we believe that the configuration of the proposed approach could lead to novel information's on biological interactions and illustrates the need of diverse analytical methodologies for better understanding of biological processes. The broader implications of this approach could lead to advances in characterizing therapeutic drugs.

10.5. Supporting information

10.5.1. Figures

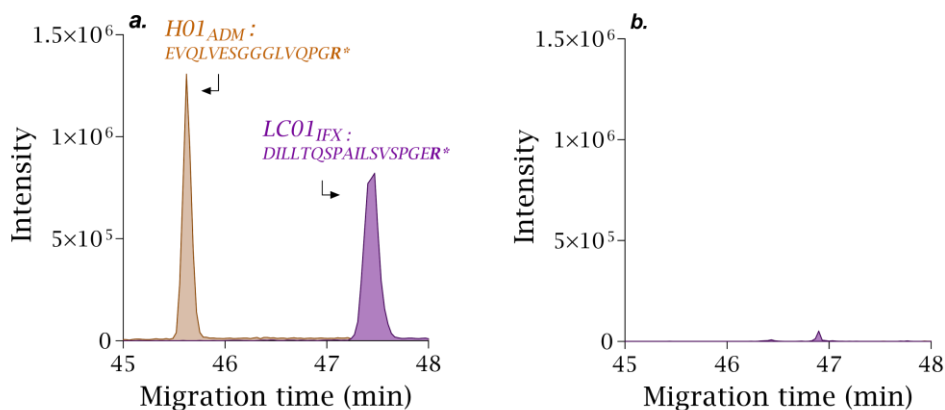


Figure 10.S1. Extracted ion electropherograms (EIE) illustrating the two selected prototypic peptides of SIL-ADM and SIL-IFX **a.** Blank serum spiked with the two SILs ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, no NATI) revealing no interference on the EIE signal with monitoring of SIL-IFX and SIL-ADM. **b.** Zero of normal serum extracted and analyzed, without any of the 3 compounds.

10.5.2. Additional discussion on mathematical model

Strategy for K_d determination after extraction and CE-MS/MS analysis of unbound SIL-infliximab post-incubation with neutralizing anti-infliximab.

If $2a_0 \gg x$, according to Bobrovnik *et al.* [283], the law of mass action becomes :

$$\frac{K_d}{a_0} = \frac{2(2i_0 - x)}{x} \quad (\text{S10.1})$$

Whith $i_0 = r_0/0.1$ and using the equation (10.6) established in the manuscript, one obtains:

$$\frac{K_d}{a_0} = \frac{2\left(\frac{2r_0}{0.1} - \frac{2r_0}{0.1} \sqrt{1 - \frac{r}{r_0}}\right)}{2\frac{r_0}{0.1} \sqrt{1 - \frac{r}{r_0}}} \quad (\text{S10.2})$$

Finally, after algebraic manipulation, the equation (S10.2) becomes:

$$\frac{a_0}{K_d} = \frac{\sqrt{1 - \frac{r}{r_0}}}{2\left(1 - \sqrt{1 - \frac{r}{r_0}}\right)} \quad (\text{S10.3} = 10.8)$$

Appendix 10.S2. Is the hypothesis $2a_0 \gg x$ valid?

The equation (S10.3) was obtained considering that the initial number of paratopes of NATI is in excess of bound paratopes at equilibrium. This condition can be difficult to reach for small values of a_0 . Bobrovnik *et al.* (2000) explained in a study that plotting Y as a function of a_0 will limit the errors associated with conditions where $2a_0 \gg x$ is difficult to observe [283]. This can be explained by the fact that the linear regression slope will mainly be affected by the high values of a_0 , and not

the lowest. In this study, the K_d was determined plotting (S10.3) for a_0 ranging from 1 to 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and was found to be 14.8 ± 1.2 nM. As the linearity is sufficient ($r^2 > 0.97$) and the replicates are close to the curve, the slope does not vary much even without small a_0 , as represented Figure 10.S2.

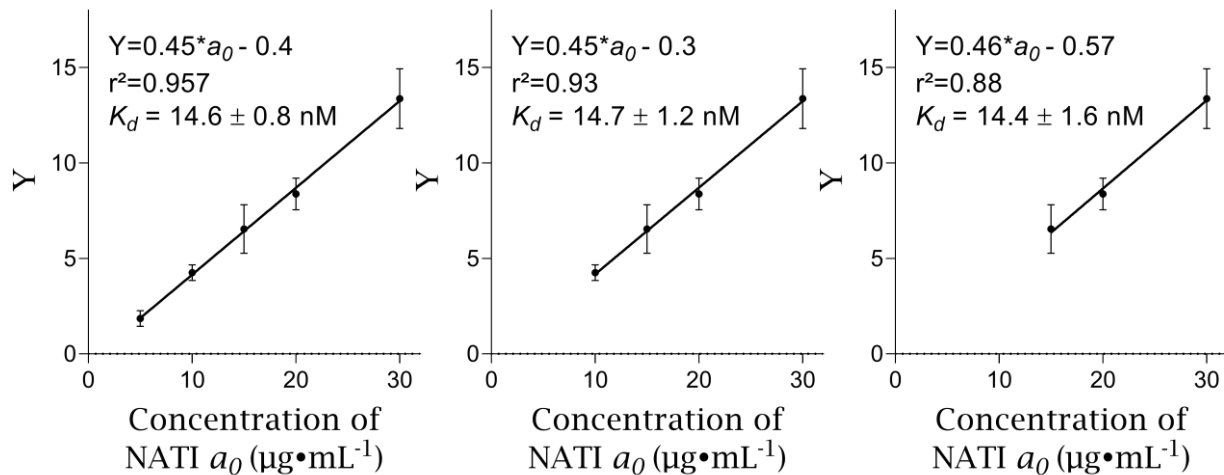


Figure 10.S2. Evolution of the slope, and thus the K_d , according to the data taken into account.

CHAPITRE 11.

QUANTIFICATION SIMULTANEE DE L'INFLIXIMAB ET DE SES ANTICORPS IMMUNOGENES DANS LE SERUM PAR CE-MS/MS

Préambule

Lors d'un suivi clinique de patients traités par mAb, il est important de suivre la concentration de l'anticorps thérapeutique biodisponible, ainsi que la concentration des anticorps anti-médicaments que l'organisme a pu développer. Ces analyses quantitatives s'effectuent généralement à l'aide de techniques d'immunodosages, comme les tests ELISA. Cependant, la configuration de ces dosages implique de quantifier les protéines séparément, via des analyses distinctes. Ces doubles quantifications entraînent la multiplication du temps d'analyse, mais aussi le risque d'erreurs. Les méthodes analytiques permettant l'obtention de plusieurs informations d'un échantillon à partir d'une seule analyse sont donc extrêmement attirantes. L'objectif de ce chapitre a été de démontrer la capacité de la méthodologie CE-MS/MS pour la quantification simultanée de l'infliximab et de NATI à partir de matrices biologiques.

Les parties II et III de ce manuscrit ont décrit l'utilisation d'une stratégie d'analyse peptidique par CE-MS/MS pour la quantification absolue de l'infliximab dans du sérum, par utilisation d'un standard interne, le SIL-IFX. Cependant, le chapitre 10 précédent a démontré que la présence de NATI actifs dans le sérum de départ, lorsqu'on y ajoute du SIL-IFX, entraîne immédiatement la complexation de ces deux composés. Ainsi, après extraction spécifique par TNF- α , seuls les SIL-IFX libres pourront être extraits. Cela a pu être observé dans des travaux réalisés par El Amrani *et al.* (2019), qui ont noté une réduction du signal de leur standard interne lorsque les patients présentaient une production d'anticorps anti-infliximab [296]. Cette baisse de signal peut donc être utilisée pour détecter de manière fiable la présence de NATI dans le sérum, comme présenté dans le chapitre 10. Cette détection permet alors de signaler immédiatement à l'utilisateur que la quantification d'infliximab ne peut plus être déduite du signal du SIL-IFX, puisque ce dernier dépend de la concentration de NATI.

L'objectif de ces travaux de ce dernier chapitre 11 fut donc de mettre à profit les pertes de SIL-IFX incontrôlées en présence de NATI pour développer une stratégie analytique capable de quantifier simultanément l'infliximab et le NATI dans du sérum.

Les travaux présentés dans le chapitre qui suit sont rédigés en anglais car ils font l'objet d'une publication scientifique en cours de finalisation dans une démarche de diffusion scientifique. Ils seront ainsi soumis à une revue scientifique à comité de lecture.

Simultaneous quantification of infliximab and corresponding anti-drug antibodies in serum using capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry

Tessa Reinert, Pascal Houzé, Nathalie Mignet, Aynur Naghizade, Lola Alez-Martin, Armand Leclerc, Yannis-Nicolas Francois, Rabah Gahoual

Publication in preparation

Abstract:

Infliximab, a TNF- α -inhibiting monoclonal antibody, has demonstrated efficacy in treating chronic inflammatory immune disorders. However, some patients develop an autoimmune response to this therapy and produce neutralizing anti-infliximab antibodies (NATI), that target the active site of infliximab. This leads to reduced pharmacological activity of the drug. During infliximab treatment, physicians need to periodically quantify the remaining levels of the drug in the patient's bloodstream to adjust subsequent doses. Additionally, they must assess NATI levels to modify clinical treatment if an immunogenic response has occurred. Immunoassays are commonly used for these quantifications, but they require separate methods for analyzing the two compounds. In addition, these assays produce false positive and false negative results that can bias clinical decisions.

This paper introduces a promising method using CE-MS/MS method for the simultaneous quantification of infliximab and its NATI in serum. The approach employs a competitive screening assay in which isotopically stable labeled infliximab (SIL-IFX) is introduced into the serum, attracted by any remaining NATI. Thus, bound SIL-IFX will be unable to bind the TNF- α ligand. The decrease in SIL-IFX concentration was quantified using SIL-adalimumab (SIL-ADM) as an internal standard. This reduction was then correlated with the concentration of NATI based on the binding characteristics of these compounds. Simultaneously, the method allowed for the absolute quantification of infliximab. The article presents the evaluation of the method and its application to 13 serums from patients with Crohn's disease who were undergoing infliximab treatment. This innovative approach provides a novel means for monitoring patients following antibody-based treatments, enhancing the follow-up care process.

11.1 Introduction

Infliximab is a chimeric monoclonal antibody that specifically binds to TNF- α , a key mediator of the inflammation associated with Crohn's disease [228]. However, a significant proportion of patients (~30 %) receiving this biopharmaceutical product shows loss of therapeutic response either immediately or after a few weeks of treatment [297]. Part of this therapeutic failure has been correlated with an immunogenic response leading to the development of natural antibodies against infliximab [165,277,298,299]. Indeed, the 25 % murine sequence of infliximab has been

implicated in promoting the drug's immunogenicity, which varies among patients [300]. In a review by Strand *et al.* (2017), it was observed that the development of anti-infliximab antibodies (ATI) occurred in frequencies ranging from 3 % to 83 % among patients treated for Crohn's disease [60]. In particular, ATI can target the variable part of infliximab, called neutralizing antibodies to infliximab (NATI), and interfere with the drug's ability to bind to TNF- α . Consequently, this reduced drug efficacy may result in loss of therapeutic response, necessitating increased drug dosages or the consideration of alternative treatments. Therefore, several gastroenterology societies have reported the need to monitor drug-targeted antibodies during patient follow-up [301,302].

Numerous analytical techniques have been developed to quantify anti-drug antibodies (ADA). Typically, ADA assays rely on a relative signal readout after ADA complexation with the drug using a surface-based ligand-binding assay (LBA), such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [170,303,304] or surface plasmon resonance (SPR) [305–307]. However, the immobilization procedures required for these techniques can mask relevant epitopes. Recently, homogeneous mobility shift assay (HMSA), and capillary mobility shift displacement assay were introduced to allow complexation in solution, and assess weak drug-protein interactions [59,308,309]. For the clinical follow-up of patients treated with biotherapeutics, immunogenicity is usually assessed on a case-by-case basis, only when patients show unexpectedly low drug levels or a decrease in clinical response. This requires additional manipulations of patient serums, which needs a dedicated assay and may introduce bias. The lack of analytical methods that allow the simultaneous quantification of therapeutic mAb and ADA might explain why the identification of immunogenic reactions is not routinely performed, even though they are important predictors of poor treatment response.

The present article is devoted to the development of a capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS/MS) method for the simultaneous quantification of the therapeutic mAb infliximab, and its corresponding NATI from serum samples. The quantification of NATI was performed indirectly by measuring the loss of stable isotope labeled infliximab (SIL-IFX) captured by free NATI after introduction to serum. Simultaneously, the fraction of active infliximab extracted from the serum was quantified using CE-MS/MS analysis. The method was first applied to serum samples spiked with known concentrations of IFX and NATI in order to investigate the characteristics of the developed CE-MS/MS analytical strategy. Finally, the analytical strategy was applied to 13 serum samples from patients with Crohn's disease and treated with infliximab.

11.2 Materials and methods

▪ **Chemicals.** The chemicals used were of high purity grade and purchased from Merck Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) if not stated otherwise. Isotopically labeled internal standards of infliximab (SIL-IFX) and adalimumab (SIL-ADM) were labeled on arginine and lysine (13C6; 15N4) and supplied by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Infliximab (IFX, Remicade®) is purchased from the manufacturer (Merck Sharp and Dohme). As a standard for the NATI, a full-length human anti-idiotypic antibody against IFX, clone AbD17841_hIgG1) was obtained as 0.5 mg·mL⁻¹ in PBS solution from BioRad Laboratories (California, U.S.A). RapiGest SF surfactant was purchased from Waters (Milford, MA). Streptavidin M-280 Dynabeads™ was obtained from ThermoFisher Scientific Invitrogen (Carlsbad, CA) and TNF- α biotinylated from R&D System, Biotechne. Sequencing-grade modified trypsin was purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA). PBS was purchased from Gibco ThermoFisher (Waltham, MA, USA). Blank serums were obtained from the French Institute of Blood (Paris, France).

▪ **Standard solutions.** Standard solutions for calibration curves for infliximab quantification were prepared from blank serum spiked with a constant concentration of SIL-ADM and SIL-IFX (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and increasing concentrations of infliximab ranging from 0.5 to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Standard solutions for calibration curves for NATI quantification were prepared from blank serum spiked with a constant concentration of SIL-ADM and SIL-IFX (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ each) and increasing concentrations of NATI (range 1-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Samples were incubated for 1h at 20°C.

Quality control (QC) samples were prepared from blank serum spiked with IFX (0, 5 or 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and NATI (1-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The samples were incubated for 1 h to allow the formation of the IFX and NATI complexes. Then, SIL-ADM and SIL-IFX were added (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ each) and the sample was again left at 20°C for 1h for the remaining NATI to complex with SIL-IFX.

▪ **Patient serums.** Serum samples were obtained from 13 patients provided by Saint-Louis Hospital (Paris, France). Eligible patients were diagnosed with Crohn's disease for at least 3 months and were receiving periodic IFX injections. 100 μL of serums per patient were collected, followed by the addition of SIL-ADM and SIL-IFX (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ each).

▪ **Sample preparation.** The preparation of serum samples was identical to that recently published by our group [270]. Briefly, affinity purification of all anti-TNF α antibodies in the serum (IFX, SIL-IFX, and SIL-ADM) was performed with Streptavidin M-280 Dynabeads™ functionalized with biotinylated TNF- α . The ferromagnetic beads was added to the serum and incubated at 20°C for 1h. The beads were then washed with PBS to remove the serum. Acidic dissociation of the mAb from TNF- α was performed using 50 μL of MeOH/H₂O/FA:48.5/48.5/3 % solution. The supernatants were pooled and dried for 2 h. The sample was reconstituted in 50

mM ammonium bicarbonate. This step followed a denaturation-reduction-alkylation-digestion workflow commonly used for monoclonal antibody digestion of peptides. Peptide digests were finally dried before being diluted in 5 μ L ammonium acetate, 100 mM, pH 4.

- **CE-MS/MS analysis.** A CESI8000® Capillary Electrophoresis system (Sciex separations, Darmstadt, Germany) was hyphenated to a 5600 TTOF mass spectrometer (Sciex Darmstadt, Germany) thanks to a porous tip sheathless interface. CE-MS/MS analysis was performed following a previously described method [270]. Briefly, 68 nL of sample were injected in the CE capillary and the separation was carried out applying a +23 kV voltage on the bare fused silica capillary (total length 100 cm; 30 μ m i.d.) filled with 10 % acetic acid. MS detection was performed in ion positive mode over the range 100 – 2000 m/z . Experiments MS/MS were performed in Top20 information-dependent acquisition (IDA, Sciex), with a total duty cycle of 1.9 s. Data were analyzed using Skyline® software [209].

Quantification was based on monitoring three proteotypic peptides: infliximab (IFX), SIL-infliximab (SIL-IFX), and SIL-adalimumab (SIL-ADM) (Table 11.1). The surrogate peptides were proteotypic and had no known post-translational modification. They were first predicted using in silico trypsin digestion and blasted with a human database to ensure their specificity. Quantification relied on the area of the precursor signals after MS/MS confirmation (Figure 11.S1).

- **Comparison study.** QC and the 13 serum samples from patients treated with infliximab were analyzed using the CE-MS/MS strategy for both quantification of infliximab and NATI. Results were then compared using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The Promonitor® IFX kit was used to quantify infliximab. When the concentrations exceeded the analytical performance range of this kit (14 μ g·mL⁻¹), the serums were diluted by 600. The Promonitor® anti-IFX kit was used for NATI quantification after dilution of all serums by 2. The correlation between the ELISA and CE-MS/MS quantification results was established using linear regression analysis.

Table 11.1. Ions of surrogate's peptides for IFX, SIL-IFX and SIL-ADM

<i>Peptide sequence</i>	<i>Name</i>	<i>Analyte</i>	<i>Used as</i>	<i>Precursor (m/z)</i>	<i>Product ions (m/z)</i>
DILLTQSPAILSVPGER	IFX _{LC01}	IFX	Quantifier	948.52	y9- 957.53; y8- 844.45; y7- 731.36; y6-644.33; y5-545.26
DILLTQSPAILSVPGER* (¹³ C, ¹⁵ N)	IFX* _{LC01}	SIL-IFX	Quantifier	953.53	y9- 967.54; y8- 854.34; y7- 741.37; y6-654.34; y5-555.27
EVQLVESGGGLVQPGR* (¹³ C, ¹⁵ N)	ADM* _{HC01}	SIL-ADM	IS	817.94	y8- 909.45; y7- 746.39; y6- 645.34; y5-498.27; y4-441.25

11.3 Results and discussions

The workflow for the simultaneous quantification of active infliximab (b_0) and neutralizing antibodies to infliximab (NATI) from the serum (a_0) is presented in Figure 11.1. El Armani *et al.* (2019) recently described a strategy using SIL-ADM and SIL-IFX for the quantification of NATI in serum [296]. That strategy was adapted to be compatible with CE-MS/MS.

After collection of serum containing active infliximab and NATI, two stable isotope-labeled mAbs, SIL-IFX and SIL-ADM, both of which are anti-TNF- α antibodies, were added and incubated. The majority of patient-derived NATIs are of the IgG1 type and are therefore bivalent. In the presence of active NATI, a paratope of the F_{ab} region of SIL-IFX will bind to a paratope of NATI, preventing its extraction based on TNF- α affinity interaction.

This purification step extracts all active anti-TNF- α antibodies, that have at least one available binding site paratope in the F_{ab} region capable of interacting with TNF- α . Subsequent tryptic digestion of the purified antibodies generates peptides that are separated by CE and analyzed by mass spectrometry. The SIL-ADM antibody does not interact with any other IgG present in the serum and serves as an internal standard to account for the loss of both SIL-IFX and infliximab during sample preparation/analysis. The MS approach is based on DDA (*Data Dependent Acquisition*), which allows monitoring of multiple peptides, including the surrogate peptides specific to the three anti-TNF- α agents used for quantification (Table 11.1).

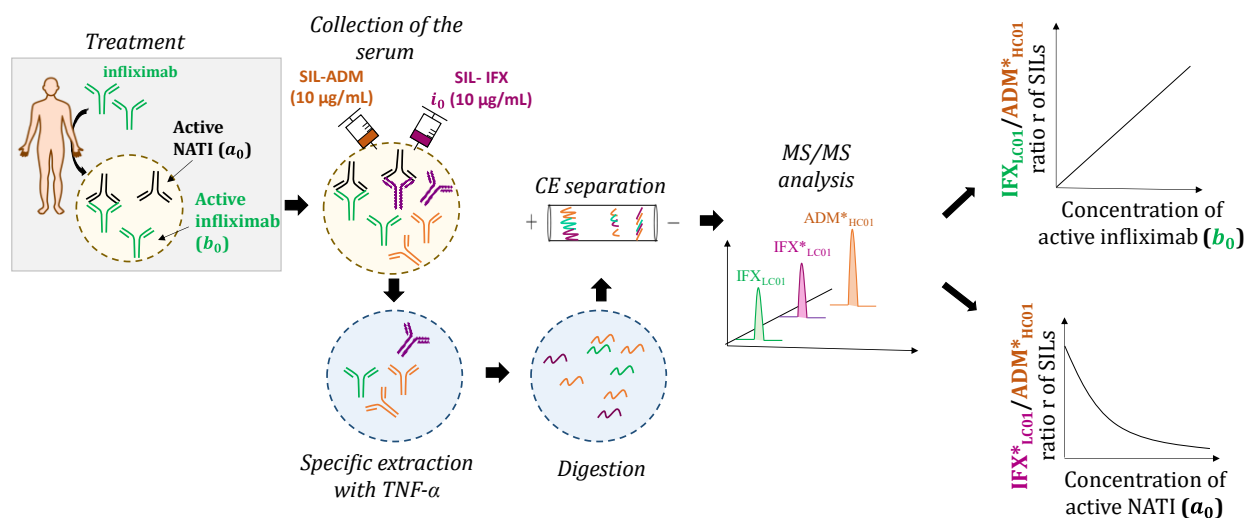


Figure 11.1. Principle of simultaneous quantification of infliximab and infliximab-neutralizing antibodies in human serum by CE-MS/MS analysis.

11.3.1. Quantification of infliximab

Absolute quantification of active infliximab in serum was performed using standards of infliximab spiked serums. These standards did not contain NATI, ensuring that the amount of infliximab

spiked into these samples (designated as " b_0 ") represented the active amount. Our research group has recently published a CE-MS/MS method for the absolute quantification of infliximab, using SIL-IFX as an internal standard [270]. However, if patients had developed an immunogenic response in the form of NATI, these antibodies would bind to the spiked SIL-IFX, and thus interfere with the quantification of infliximab. To address this issue, the quantification required the use of an antibody internal standard that is unaffected by the presence of NATI, and that can be extracted by TNF- α functionalized beads. Thus, SIL-ADM was identified as a suitable choice.

After digestion of the mAbs and CE-MS/MS analysis, the two surrogate peptides, one from infliximab (IFX_{LC01}) and the other from SIL-ADM (ADM*_{HC01}), exhibited significantly different mobilities, leading to their consistent separation in CZE (Figure 11.S1). The peptide fragment fingerprint was verified using MS/MS data, confirming the presence of characteristic fragment ions (Figure 11.S2). CE-MS/MS analysis of standards samples showed a linear relationship ($r^2 = 0.994$) for active infliximab concentrations ranging from 1-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ as depicted in Figure 11.2.

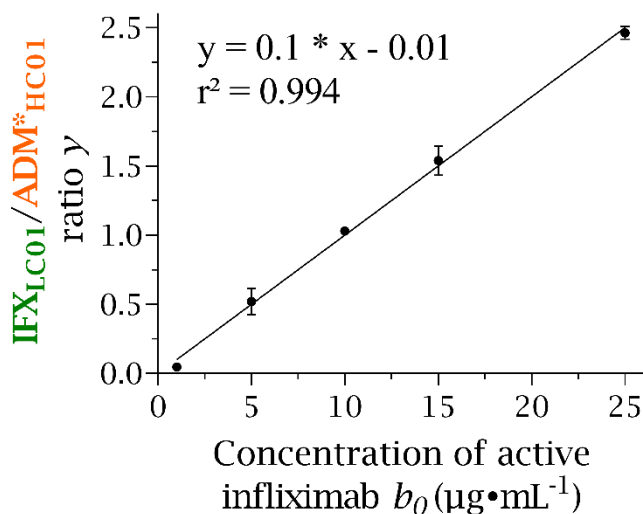


Figure 11.2. Linearity of the IFX_{LC01} / ADM*_{HC01} peptide ratio with the concentration of infliximab (1-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Concentration of SIL-ADM fixed at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. $r^2 = 0.994$, $n = 3$ Error bars represent the standard deviation of triplicates. $r^2=0.994$.

11.3.2. NATI quantification development

The approach was adapted from a recent publication by El Amrani *et al.* (2019), which observed a correlation between the quantification of NATI in serum and the extent of SIL-IFX loss [296]. Increasing the initial concentration of NATI in the serum resulted in an increase in the amount of SIL-IFX paratopes bound to NATI. This binding led to a reduction of the SIL-IFX signal observed by mass spectrometry.

In a recent work, our group demonstrated the possibility of establishing a relationship between the measured peptide ratio IFX*_{LC01}/ADM*_{HC01} (designated as " r ") and the initial

concentration of NATI (denoted as “ a_0 ”) in serum. This correlation was derived using equation (11.1), which was introduced and elaborated upon in Chapter 10. The formulation of this equation was based on the law of mass action, considering that SIL-IFX, which has two paratopes, can be extracted during the purification step while being singly liganded by NATI or being unliganded.

$$\frac{a_0}{K_d} = \frac{\sqrt{1-\frac{r}{r_0}}}{2(1-\sqrt{1-\frac{r}{r_0}})} \quad (11.1)$$

With r_0 , the IFX*_{LC01}/ ADM*_{HC01} ratio obtained after applying the workflow (Figure 11.1) to a blank serum without NATI, and spiked only with the SILs, which was found to be equal to 1.

K_d corresponds to the dissociation affinity constant of a paratope of SIL-IFX and an IgG1 NATI compound, which was found to be equal to 14.8 ± 1.2 nM (see Chapter 10). This dissociation constant was established in conditions strictly identical to those used in this work. The NATI/SIL-IFX interaction was performed in serum, label-free and functionalization-free.

Therefore, by measuring the ratio r of the SIL-IFX and SIL-ADM surrogate peptide signals by CE-MS/MS and inserting this value into equation (11.1), it is possible to directly quantify the initial amount of NATI (a_0). This was applied to 7 concentrations of NATI (1 to 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) added to model serum, followed by the addition of the SILs (workflow of the Figure 11.1, without IFX). Subsequent CE-MS/MS analysis led to the determination of the ratio “ r ” of each sample. The back-calculation of these NATI-spiked serum standards using equation (11.1) resulted in an average bias from the nominal concentration of less than 20 % (dotted lines) in the range of 1 to 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 11.3). The method was also applied on 3 replicates of model serum without NATI, and systematically measured a back-calculation of less than 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The results highlight that the detection of NATI in serum is possible in the concentration range commonly found in patients treated with infliximab [296,310].

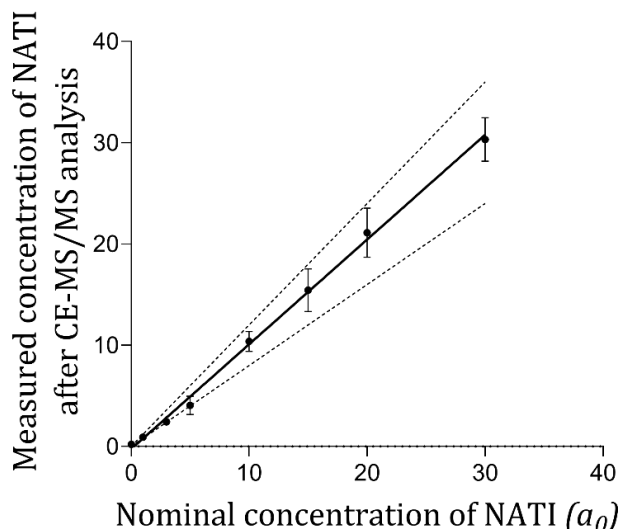


Figure 11.3. Bias from nominal concentration of NATI a_0 calculated with equation (11.1) after CE-MS/MS measurement of r for standards in serum.

The strategy presented here offers a distinct advantage by enabling the detection of NATI in serum without the need to extract it from the biological matrix. This feature represents a significant workflow benefit, especially considering the challenging nature of purifying such compounds. Some strategies require maintaining the interaction of the NATI with its antigen throughout the process, including washing steps and separation methods [310,311]. The approach proposed here allows an absolute quantification of the remaining SIL-IFX that did not interact with the NATI, using CE-MS/MS analysis.

11.3.3. Simultaneous quantification of IFX and NATI in model serum samples

To evaluate the ability of the CE-MS/MS method to simultaneously determine the concentrations of active infliximab and NATI, quality controls (QC) with known initial concentrations of these both compounds were prepared in model serums. The QC were then incubated for 1 h to allow complex formation. The objective was to quantify the remaining concentrations of actives agents, that had not interacted with each other. Subsequently, the two SILs were introduced into the QC, and the workflow illustrated in Figure 11.1 was executed to quantify the residual amounts of active infliximab (b_0) and NATI (a_0). The results of this process are presented in Figure 11.4.

For the quantification of active infliximab, the IFX_{LC01}/ADM^*_{HC01} ratio (y) was determined from the CE-MS/MS data of the QCs. The concentration of active infliximab (b_0) was determined using the linear relationship established in Figure 11.2. The QC were prepared with two different starting concentrations of infliximab: $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 11.4.a) or $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 11.4.b), and initial concentration of NATI ($0 - 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A clear trend emerged from the measured (b_0). As

the initial concentration of NATI increased, the level of (b_0) decreased. This suggests that NATI specifically targets the CDR region of infliximab, resulting in its inability to be extracted with the TNF- α ferromagnetic beads.

Simultaneously, the $IFX^*_{LC01}/ADM^*_{HC01}$ ratio (r) was determined from the same CE-MS/MS data. The concentration of the remaining unbound NATI (a_0) was calculated using equation (11.1). When the active infliximab (b_0) is still present in the serum, the concentration of NATI (a_0) is observed to be close to zero. This outcome indicates that all of the initial NATI has interacted with infliximab during the first incubation and is therefore unable to bind to SIL-IFX during the second incubation. In contrast, when only negligible levels of (b_0) are detected, the measured (a_0) showed a significant increase.

The results are consistent with cohort studies that have found similar correlations between infliximab levels and autoimmune antibodies in patients. The presence of NATI has been shown to be typically associated with low levels of active infliximab [312,313]. These results from QC samples underscore the ability of the method to simultaneously quantify infliximab and NATI in serum, using CE-MS/MS. This ability holds great potential for enhancing the monitoring and understanding of these critical components.

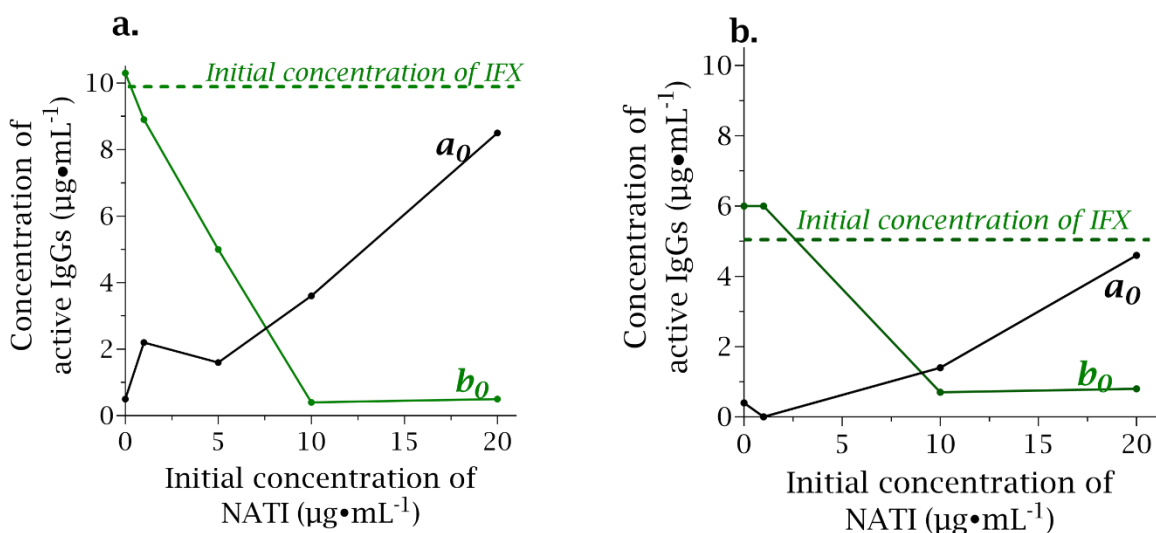


Figure 11.4. Evolution of calculated (a_0) and (b_0) values after CE-MS/MS analyses of normal serum spiked with infliximab (a. $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ or b. $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and NATI ($0-20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

11.3.4. Patients' serums analysis

Finally, the method was applied to serum samples from a group of 13 patients diagnosed with Crohn's disease and undergoing infliximab treatment. After the collection of these serum, they were spiked with SIL-IFX and SIL-ADM, both added at a concentration of $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. After incubation of the serum for 1 hour, the sample preparation steps outlined in Figure 11.1 were executed, and subsequently, the prepared samples were subjected to analysis using CE-MS/MS. The signal of the three surrogate peptides for infliximab, SIL-IFX and SIL-ADM (Table 11.1) were monitored.

First, the y -ratio was determined for the 13 patients, to quantify the active infliximab concentration (b_0). The same 13 serum samples were concomitantly analyzed in a commercially available IFX-ELISA assay, which is a widely used technique for quantifying the concentration of infliximab. The comparison of CE-MS/MS and ELISA analyses, shown in Figure 11.5, exhibited a good correlation ($R^2 = 0.923$) between the two techniques. As previously observed by our group or other studies, the ELISA assay seems to underestimate the concentration of active infliximab, probably because this technique requires two distinct interactions of IFX, one with the plate, and the other with the detection reagent [175,270].

The same CE-MS/MS data collected for each analysis of the 13 serums of patients led to the determination of the r -ratio. The r values were then inserted into equation (11.1) for (a_0) determination, still using K_d equal to 14.8 nM. The same 13 samples were also analyzed using anti-IFX ELISA for NATI quantification. Figure 11.5.b shows the comparison of the measured concentrations of NATI of these serums by the CE-MS/MS strategy and the ELISA assay. The results showed that the serum of two patients (red dots), analyzed in duplicate, was positive for NATI in both assay techniques, with NATI levels in CE-MS/MS of 2.63 ± 0.8 and $8.6 \pm 1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. In the remaining 11 serum samples, no active NATI was detected by either assay technique.

It should be noted that the anti-IFX ELISA assay provides semi-quantitation of NATI in arbitrary units ($\text{UA}\cdot\text{mL}^{-1}$). In our specific study, the NATI used as a calibrator was of the IgG1 isotype with a molecular mass of approximately 150 kDa, as previously documented in related research [310]. Since most NATI interactions with infliximab are mainly through IgG1 and IgG4 forms in immune system, we adopted the value of 150 kDa to convert the NATI concentration into international units (IU) [314,315]. Plus, this underlines an interesting aspect of the approach, as it allows the detection of all neutralizing antibodies-to-infliximab IgG by CE-MS/MS without knowing their amino acid sequence. This indirect approach is particularly interesting as anti-drug antibodies can exist in polyclonal forms specific to each patient, and therefore do not exist as universal antibodies.

Another interesting aspect shown in Figure 11.5 is the level of infliximab in the two patients with non-negligible levels of NATI (red dots). As shown in Figure 11.5.a, infliximab was found at negligible levels ($< 0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in both serums. In contrast, no NATI was detected in any of the other 11 serums from patients with detectable levels of active infliximab. This indicates a strong correlation between the two quantitative data, which has already been reported in the literature [298]. Therefore, the comparison of the quantification of infliximab (b_0) and NATI (a_0) obtained either simultaneously by CE-MS/MS or by two different ELISA assays led to an adequate correlation and confirmed the validity of the CE-MS/MS results.

The concentrations measured by this method correspond to the biologically active ones. The approach quantifies the amount of infliximab able to bind to TNF- α , and the amount of NATI able to dissimulate the CDR region of infliximab by binding to it. Antibodies-to-infliximab directed against other regions of infliximab, such as its F_c portion, will not prevent the extraction of SIL-IFX and will therefore not be detected. In addition, if the serum contains already formed infliximab/NATI complexes, the approach will not quantify them.

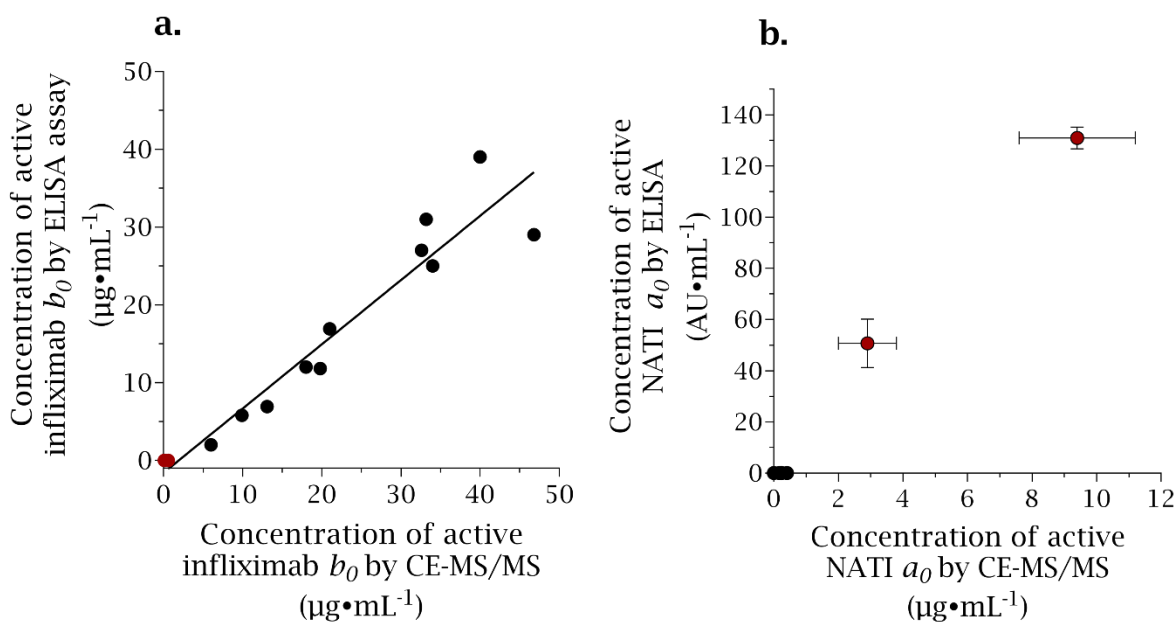


Figure 11.5.a. Concentration of active IFX a_0 in 13 serums of Crohn's disease patients analyzed by ELISA assay or CE-MS/MS method. Linear regression line plotted. **b.** Concentration of active NATI b_0 in serum of 13 Crohn's disease patients analyzed by ELISA assay or CE-MS/MS method. Error bars represent duplicate values.

11.4. Conclusions

This article demonstrates the simultaneous quantification of biologically active therapeutic monoclonal antibodies and their neutralizing antibodies to infliximab (NATI) IgG using CE-MS/MS analysis. The absolute values of infliximab was shown to be possible in the range of 1-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The method was also shown to be suitable for the detection of NATI over a concentration range of 1-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. These two concentration ranges cover the concentrations commonly found in the serum of patients treated with infliximab. For both quantifications, the use of an isotope labeled internal standard added at the beginning of the sample process enabled to account for the sample preparation losses. The ability for simultaneous quantification was demonstrated with the analysis of 13 serum from patients with Crohn's disease and treated with infliximab, illustrating two patients with high levels of NATI and indistinguishable concentrations of infliximab.

In this article, the quantification of NATI was based on a statistical model previously presented in a recent work (Chapter 10). This model considers the bivalency of the mAbs and led to the determination of the dissociation constant (K_d) of the infliximab/NATI interaction under conditions strictly identical to those reproduced in this article. Although the assumptions resulting from this model could benefit from further experimental research, we believe that it is the most appropriate for the SIL-IFX/NATI interaction performed in this study. Model serum containing different batches of NATI and isotypes could be analyzed through this workflow to establish the ability of the approach to detect and quantify them and to ensure its suitability for routine use.

An interesting advantage of this approach is its versatility. It could be used to simultaneously quantify other drugs and anti-drug antibodies (nADA) in serum for other mAb-based treatments. The only conditions would be to provide the adequate antigen for affinity purification and to determine the dissociation constant associated with drug/nADA binding. In addition, another mAb with identical antigen as target should be used to account for losses in sample preparation/analysis. The strategy was demonstrated here for CE-MS analysis but could undoubtedly be applied to LC-MS as well. Therefore, this method offers several advantages. It could streamline the analysis process by reducing the time required for sample preparation compared to quantification methods that require separate assays. It could also facilitate a deeper understanding of the interplay and relationship between the mAb and its immune response. The simultaneous quantification method has the potential to enhance patient monitoring and improve immunogenicity assessment.

11.5. Supporting information

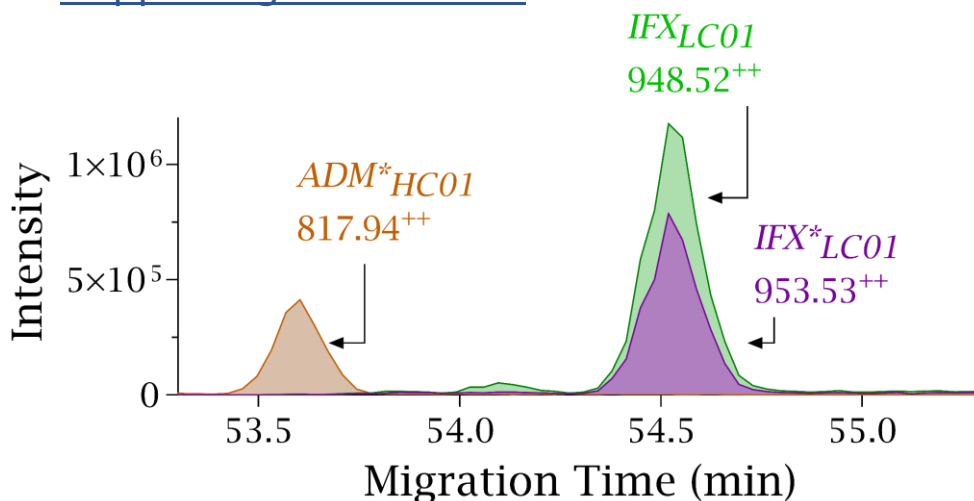
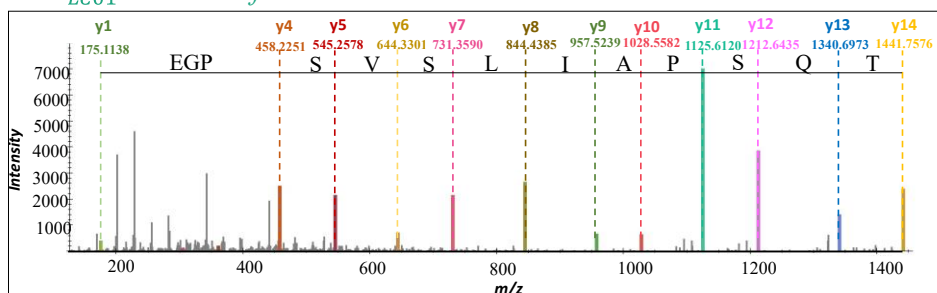
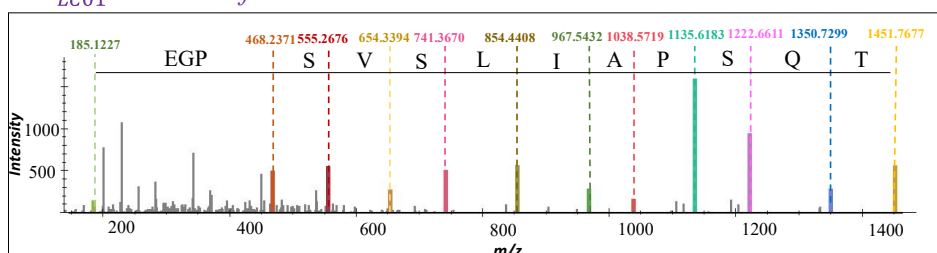


Figure 11.S1. Extracted ion electropherograms (EIE) illustrating the three surrogate prototypic peptides of infliximab (IFX_{LC01}, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), SIL-IFX (IFX*_{LC01}, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and SIL-ADM (ADM*_{HC01}, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) from a CE-MS/MS analysis of model serum spiked.

IFX_{LC01} : MS/MS of ion 948.52



*IFX*_{LC01} : MS/MS of ion 953.53*



*ADM*_{HC01} : MS/MS of ion 817.94*

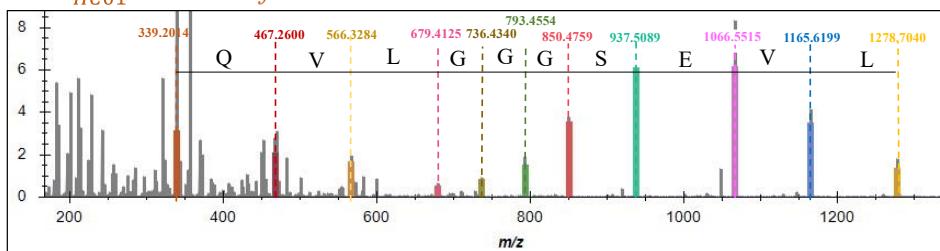


Figure 11.S2. MS/MS spectra collected after CID fragmentation of infliximab, SIL-IFX and SIL-ADM surrogate peptides in a same DDA analysis of model serum spiked with the compounds.

11.6. Discussions additionnelles

Ce chapitre a abordé le développement et l'application de la méthode CE-MS/MS pour quantifier simultanément l'infliximab et le NATI d'une matrice biologique. De plus, comme présenté dans les parties II et III de ce manuscrit de thèse, les données CE-MS/MS de l'analyse du digest peptidique permettent également la détermination des proportions de PTM de l'infliximab induites dans l'organisme du patient. Pour résumer, les informations simultanées obtenues en appliquant la stratégie CE-MS/MS, selon le protocole illustré dans la Figure 11.6 et détaillé dans la section "Matériel et Méthodes" de ce chapitre 11, sont les suivantes :

- **La quantification de NATI** sur une gamme de concentration de 1 à 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La détermination du rapport (r) $\text{IFX}^*_{\text{LC01}} / \text{ADM}^*_{\text{HC01}}$ permet de remonter à la concentration (a_0) de NATI. Cette quantification est d'autant plus intéressante qu'elle ne nécessite pas de connaître la séquence du NATI, ce qui est intéressant au vu de la polyclonalité de ces anticorps immunitaires.

À noter que cette quantification a nécessité au préalable la détermination de la constante de dissociation apparente entre le paratope d'un NATI et un de l'infliximab. Ce K_d a été déterminé dans le chapitre 10 pour des conditions natives des anticorps, sans marquage ou fixation sur surface solide. Il s'agit d'un NATI de type IgG1 qui a été utilisé, puisqu'il s'agit de l'isotype majoritaire dans le cas de traitements par infliximab. L'approche et le modèle mathématique établis dans le chapitre 10 reposent sur des hypothèses probabilistes, considérant par exemple que toutes les interactions infliximab/NATI sont indépendantes. Cette approche préliminaire a mené à la détermination du K_d de l'interaction infliximab/NATI dans des conditions strictement identiques à celles appliquées dans le chapitre 11. Cette constante était donc la plus adaptée pour décrire l'interaction considérée dans le chapitre 11. Ainsi, la quantification de NATI est basée sur l'incorporation de cette valeur de K_d dans la loi d'action de masse. Dans les perspectives de ces travaux, il serait judicieux d'appliquer cette méthode quantitative à d'autres lots de NATI, et potentiellement à des mélanges de différents isotypes (IgG, IgM...) afin d'assurer la pertinence de l'approche d'un point de vue clinique. Les premiers résultats de l'analyse de patients traités par de l'infliximab sont néanmoins prometteurs et encourageants.

- **La quantification d'infliximab** sur une gamme de concentration de 0,22 à 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cela est réalisé en intégrant les signaux MS des peptides IFX_{LC01} (infliximab) et $\text{IFX}^*_{\text{LC01}}$ (SIL-IFX). La validation de cette quantification est décrite dans le chapitre 8 de ce manuscrit. Si la méthode détecte simultanément une concentration non négligeable de NATI ($> 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), alors la quantification peut être effectuée en utilisant le signal de SIL-ADM, introduit systématiquement en début de méthode, et en établissant le rapport (y), pour normaliser la concentration d'infliximab.

L'étude présentée dans le chapitre 11 a démontré que la substitution du SIL-IFX par le SIL-ADM en tant qu'étalon interne permet toujours la quantification de l'infliximab dans le sérum.

▪ **La caractérisation de certaines PTM de l'infliximab apparues *in vivo*** lorsque sa concentration dans le sérum dépasse $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. L'intégration du signal d'un peptide présentant une PTM et du peptide non modifié homologue permet d'établir leur proportion. Comme décrit dans le chapitre 7, il est possible d'appliquer la stratégie de normalisation à ces proportions pour déterminer les PTM apparues seulement lors de l'administration de l'infliximab au patient. Cette normalisation, qui nécessite également le suivi des PTM du SIL-IFX, n'est pas affectée par l'ajout du SIL-ADM.

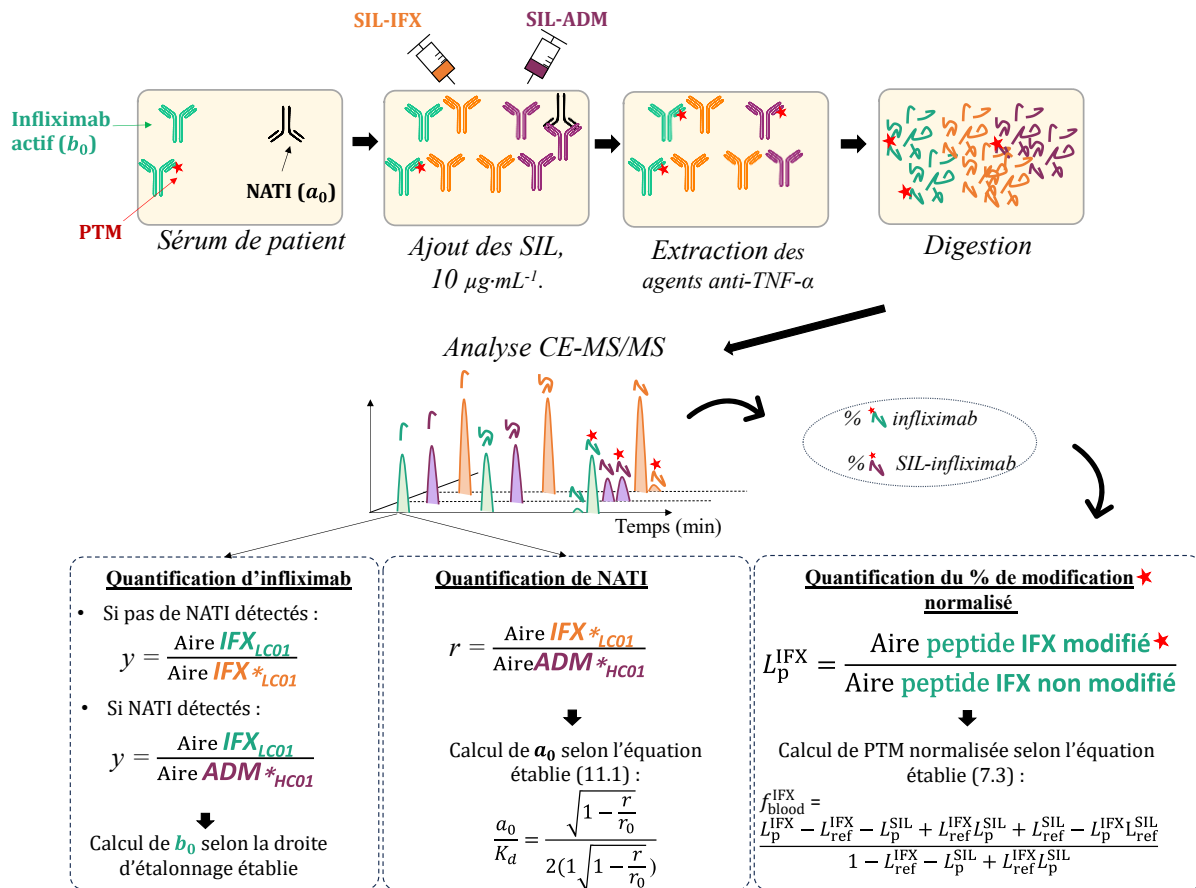


Figure 11.6. Représentation schématique du protocole final menant à la multi-caractérisation d'un sérum d'un patient traité avec de l'infliximab. L'étoile rouge représente une PTM sur un acide aminé de l'infliximab, dont la quantification est souhaitée.

Par conséquent, au moyen d'une seule analyse en CE-MS/MS d'un échantillon de sérum, il est possible de réaliser les trois quantifications mentionnées précédemment. Il faut également réaliser les **gammes étalons dans la matrice modèle**, nécessaires aux quantifications d'infliximab et de SIL-IFX. Ces gammes d'étalonnages internes doivent présenter des concentrations fixes de SIL-ADM et croissantes d'infliximab et de SIL-IFX. La normalisation des PTM nécessite également des échantillons de « références ». Les données CE-MS/MS obtenues suite à l'analyse de la

gamme étalon peuvent être utilisées pour établir les valeurs L_{ref}^{IFX} et L_{ref}^{SIL} . Comme exposé dans le chapitre 11, l'analyse CE-MS/MS des 13 échantillons de sérum de patients a permis la quantification de l'infliximab et du NATI. À partir de ces mêmes données CE-MS/MS, il a également été possible de déterminer les PTM survenues sur certains sites pendant l'administration de l'infliximab. Nous avons récapitulé dans la Table 11.2 les niveaux de *deaN* et *isoD* de l'infliximab issu de ces patients.

La stratégie analytique pourrait donc être utilisée afin de **corrélér l'apparition de certaines PTM** de l'infliximab dans la circulation sanguine de patients, **à la concentration d'infliximab biodisponible b_0 , au développement de NATI a_0** , à la clairance du traitement thérapeutique dans l'organisme ou encore **à la réponse clinique du patient**. Plusieurs études ont déjà démontré que certaines PTM ont un impact direct ou indirect sur l'immunogénicité d'un traitement à base de mAbs [61,316]. Certaines structures glycaniques ont été identifiées comme immunogènes, à l'instar du galactose- α 1,3-galactose. Une corrélation a été établie entre les patients présentant des réactions sévères au traitement et la présence d'anticorps dirigés contre cette structure [317]. Bien que l'impact des autres PTM sur l'immunogénicité soit moins établi que celui des glycosylations [318], il est néanmoins suggéré qu'un changement local de charge ou d'hydrophobie induit par certaines PTM, favorise la formation d'agrégats susceptibles de déclencher des réactions immunitaires [319,320]. Une étude a également corréler certaines déamidations, oxydations, et isomérisations avec l'apparition d'anticorps anti-médicament [61,317].

Ces assertions restent encore peu établies et sont probablement spécifiques à certains mAbs et à certaines PTM. L'analyse des 13 sérums de patients a mené à l'identification de deux sérums présentant une concentration élevée de NATI, mais plus aucun infliximab actif. Par conséquent, il n'a pas été possible de déterminer la structure du traitement thérapeutique pour ces échantillons. On peut envisager que l'infliximab ait subi des modifications dans sa région CDR, altérant ainsi son interaction avec le TNF- α , et conduisant au développement de NATI ciblant cette partie spécifique. Cette hypothèse n'est pour le moment pas vérifiée, mais l'application de la stratégie analytique pourrait contribuer à une meilleure compréhension des processus de réponse immunitaire et du devenir des anticorps thérapeutiques. Il serait intéressant d'obtenir des échantillons de sérum de patients avant le déclenchement de la réponse immunitaire afin de caractériser les PTM de l'infliximab à ce stade précoce.

Sur les PTM *hotspots* suivies dans le cadre de cette étude, seulement deux se produisent *in vivo*, et ce de manière corrélée avec le temps de résidence du traitement. Pour l'instant, rien n'indique que ces PTM aient un impact sur l'efficacité du traitement (liaison antigène, CDC, ADCC, recyclage...) ou sur le développement de l'immunogénicité. En conséquence, la méthode aurait tout intérêt à être appliquée sur une analyse de cohorte plus étendue, afin de réaliser des affirmations statistiques.

Partie IV – Implémentation de la quantification de l'immunogénicité par CE-MS/MS
Chapitre 11 – CE-MS/MS pour la quantification d'infliximab, de ses PTM et de ses anti-mAbs

Table 11.2. Concentration de NATI, d'infliximab, et proportions de certaines deaN et isoD de l'infliximab apparues in vivo. Informations obtenues simultanément après une analyse CE-MS/MS, pour 13 sérums de patients atteints de la maladie de Crohn et traités avec de l'infliximab.

Patient considéré	Concentration de NATI ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentration d' infliximab ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Temps de résidence de l' infliximab (jours)	Niveau de PTM (déamidation ou isomérisation) apparues lors de l'administration (%)												
				N ⁵⁷ (HC07)	N ³⁸⁷ (HC38)	N ¹³⁷ (LC10)	N ¹⁵⁸ (LC13)	N ⁴¹ (LC04)	N ²¹⁰ (LC18)	N ¹⁰¹ (HC13)	N ²⁷⁹ (HC24)	N ²⁸⁹ (HC24)	N ³¹⁸ (HC27)	D ⁴⁰⁴ (HC39)	D ²⁸³ (HC24)	
N°1	12.1	0.9	16													
N°2	6.2	0.8														
N°3	< 1	28.5	58	31	2	-3	1	1	8	-3	1	-1	2	-2	2	
N°4	< 1	10.1	55	31	8	1	0	-1	9	-2	0	0	1	1	6	
N°5	< 1	12.7	56	40	14	-1	1	2	7	1	-1	1	-1	3	-1	
N°6	< 1	6.4	55	60	12	0	1	3	0	1	1	1	2	0	1	
N°7	< 1	34.0	21	18	-2	0	0	-2	-2	0	0	-1	-1	1	1	
N°8	< 1	7.4	56	25	6	0	1	7	-3	1	0	-1	2	-1	3	
N°9	< 1	42.0	14	5	2	-1	0	-14	5	1	0	0	2	2	-2	
N°10	< 1	18.1	28	10	9	1	2	10	0	-2	0	-1	1	0	-3	
N°11	< 1	31.0	14	7	-5	1	2	-2	6	-1	0	0	0	3	-2	
N°12	< 1	8.4	56	22	-2	0	1	0	6	0	1	2	0	0	1	
N°13	< 1	16.7	54	39	7	1	2	1	2	3	1	0	1	2	0	

CONCLUSION GÉNÉRALE
ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ces travaux fut de mettre en place une méthode analytique utilisant le **couplage CE-ESI-MS/MS** pour l'obtention de multiples informations de sérums issus de patients traités par de l'infliximab, un mAb thérapeutique.

La première partie de ce manuscrit fut consacrée dans un premier temps à une brève présentation des **anticorps monoclonaux**. En particulier, l'infliximab, sa structure et ses mécanismes d'action ont été décrits. L'impact de certaines PTM sur l'activité biologique de plusieurs protéines a été discuté, mettant en lumière l'intérêt de leur caractérisation. Puis, une introduction bibliographique du couplage électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse a été présentée. L'utilisation de ce couplage pour caractériser structurellement les mAbs à travers diverses applications et stratégies a permis de souligner l'intérêt de la CE comme méthode séparative. En particulier, la séparation des PTM impliquant un faible incrément de masse permet leur identification. Enfin, l'intérêt thérapeutique d'un suivi quantitatif des mAbs administrés a été décrit, ainsi que les méthodes actuelles s'y prêtant. Une introduction à l'immunogénicité et à son suivi clinique est également décrite dans cette partie introductive.

Cette recherche bibliographique a permis de mettre en évidence trois types d'informations suggérées comme importantes lors d'un suivi clinique de patient traité avec un mAb thérapeutique. Les deux premières informations sont les **concentrations résiduelles biodisponibles du mAb en question, ainsi que d'anticorps anti-mAb, après administration**. Ces informations quantitatives sont régulièrement obtenues en clinique, par des immunodosages, et permettent de définir la dose à administrer pour la fois suivante, ainsi que de décider d'un changement de thérapie. Étant donné que ces quantités fluctuent entre les patients de manière pour le moment encore trop inconnue, leur contrôle ne permet que l'ajustement du traitement, et non pas la prédiction ou compréhension de la réponse clinique. Ainsi, les recherches bibliographiques ont permis d'émettre la suggestion que la structure primaire de l'anticorps thérapeutique, et plus particulièrement les **PTM se produisant post-administration**, peut aider à mieux appréhender ces incertitudes. De plus, des études ont mis en avant un manque de précision, des effets de matrices et d'interférences sur les immunodosages couramment utilisés, menant à des erreurs de diagnostic. La multiplication des protocoles et manipulations nécessaires lors de différentes méthodes analytiques peut également entraîner des erreurs supplémentaires. Ainsi, cette première partie du manuscrit a permis de prendre connaissance des **défis actuels du suivi de mAbs thérapeutiques**, et de proposer une solution analytique s'affranchissant de certaines problématiques. Les travaux présentés dans ce manuscrit sont en grande partie concentrés sur le développement de méthode permettant la caractérisation des PTM conjointement à la quantification de l'infliximab issu de sérum. Puis, le dernier chapitre présente la montée en complexité avec la quantification simultanée d'anticorps anti-infliximab.

Le couplage CE-ESI-MS/MS étant bien établi au laboratoire, en particulier pour la caractérisation structurale des mAbs suivant une **stratégie bottom-up**, il n'a pas été nécessaire de procéder aux développements techniques de ce couplage. En revanche, l'application de cette caractérisation était pour le moment restreinte aux mAbs issus de leur formulation. Ainsi, une attention particulière à la purification d'infliximab issu de matrice sérique a été nécessaire, tout en considérant les aspects inhérents au couplage CE-MS/MS menant à la caractérisation des PTM, conjointement à la quantification de l'infliximab. Il a fallu conserver la spécificité de l'extraction, limiter les sels résiduels et optimiser les conditions de séparation électrophorétique afin de garantir une résolution suffisante des PTM tout en maintenant une limite de quantification compétitive avec ce qui est atteint par les immunodosages. Afin de **quantifier de manière absolue** l'infliximab de la matrice sérique, le même anticorps marqué a été choisi comme étalon interne, et fut ajouté avant la purification. Puis, l'objectif de la méthodologie analytique étant d'être capable de définir les PTM apparues dans l'organisme du patient, **une stratégie de normalisation**, s'affranchissant des modifications apparaissant lors de la préparation d'échantillons, a été établie. Cette stratégie ne requiert pas de manipulations supplémentaires de l'échantillon en question, et repose sur un modèle mathématique qui a été établi durant ce projet.

Après avoir mis en place la méthodologie quantitative de la concentration d'infliximab, et de certaines PTM post-administration, elle a été validée sur des sérums modèles dopés avec de l'infliximab. Puis, il a été possible de l'appliquer sur des sérums issus de patients atteints de la maladie de Crohn et traités avec de l'infliximab. Les résultats ont permis **d'identifier des modifications structurales in vivo de l'infliximab**, et de les corrélérer au temps de résidence dans l'organisme du patient. En outre, ces PTM ont pu être identifiées comme dépendantes de la localisation du résidu concerné.

Alors, afin de définir dans un premier temps si ces dégradations structurales étaient propres à l'anticorps, ou au produit commercial correspondant, une étude de dégradation prédictive a été réalisée sur le **produit original ou des biosimilaires**. Dans un premier temps, il a fallu s'assurer que **la dégradation in vitro** mimait correctement l'environnement *in vivo*, et donc prédisait convenablement les PTM post-administration. Les résultats ont montré que les mêmes sites d'acides aminés de l'infliximab dégradés dans les sérums de patients l'étaient pour les différents produits de l'infliximab, et ce linéairement avec le temps. D'autres études préliminaires ont été réalisées afin d'investiguer les facteurs influençant les PTM post-administration. Toutes ces expériences ont été réalisées sur la même stratégie analytique CE-MS/MS que celle développée partie II, et ont montré la capacité de la méthode à prédire des modifications structurales d'un mAb thérapeutique post-administration.

Enfin, il a été envisagé de modifier la stratégie pour, conjointement aux deux précédentes informations, quantifier des anticorps immunogènes neutralisant la partie variable de l'infliximab

(NATI). La seule modification apportée fut l'ajout d'un autre anticorps marqué, aussi dirigé contre le TNF- α , le SIL-adalimumab. Dans un premier temps, ce nouveau standard interne a illustré la possibilité de changer d'étalon pour la quantification d'infliximab dans un sérum de patient, s'il s'y trouve des NATI actifs. Simultanément, la stratégie permet de détecter la présence de NATI et sa quantification indirecte. Les résultats préliminaires présentés dans cette dernière partie ont montré le potentiel de la méthode à **quantifier le NATI dans la matrice sérique, conjointement aux deux autres informations.**

Plusieurs **perspectives** pourraient donc être pertinentes pour la suite du projet. Dans un premier temps, il serait intéressant de valider la méthode présentée dans le dernier chapitre, tant sur la quantification d'infliximab, mais aussi de NATI. En particulier, la quantification de NATI repose sur des modèles qui ont cherché à restreindre les biais et hypothèses de la méthodologie, et qui nécessiteraient d'être appliqués à d'avantages de standards afin de garantir la fiabilité des résultats, pour le moment prometteurs. L'analyse de sérums de 13 patients traités par de l'infliximab a permis des conclusions encourageantes et bénéficierait d'être appliquée à un plus grand nombre d'échantillons.

Aussi, il est envisageable de ne plus se restreindre à la caractérisation des PTM *hotspots*, mais d'établir une plus large **caractérisation non ciblée** de modifications post-administration. D'autres PTM pourraient être cherchées et quantifiées. Il semblerait également pertinent d'appliquer la méthode sur une cohorte de patients plus large que celle réalisée lors de ce projet. L'analyse d'une cohorte conséquente permettrait potentiellement de conclure sur les effets des PTM post-administration sur l'évolution des concentrations de NATI et d'infliximab. Ce suivi pourrait également indiquer s'il existe une corrélation entre l'apparition de PTM et la réponse clinique du patient.

Il semble enfin pertinent de souligner la **versatilité de la méthodologie analytique** développée ici. En effet, en ne modifiant aucune procédure de la préparation d'échantillon, la méthode est adaptée à l'extraction et à l'analyse d'autres anticorps anti-TNF- α . Des essais préliminaires d'un stage de master M2 ont montré la possibilité d'extraire de l'adalimumab, un autre anticorps anti-TNF- α utilisé contre la maladie de Crohn, et ce en utilisant le même protocole. En particulier, cela semble intéressant dans le cas de bithérapies, ou lors d'un changement de traitement thérapeutique vers l'adalimumab lorsqu'un patient développe une immunogénicité face à l'infliximab. Il peut être intéressant de suivre la concentration simultanée de ces deux mAbs thérapeutiques dans ce cas. Ainsi, la méthode CE-MS/MS permettrait en théorie d'atteindre cet objectif.

Par ailleurs, en changeant le TNF- α fonctionnalisé sur les billes ferromagnétiques par d'autres antigènes, il semble possible d'extraire et de purifier du sérum d'autres mAbs thérapeutiques. Il pourrait être envisagé de greffer sur les billes de purification différents antigènes menant alors à l'extraction simultanée de plusieurs mAbs thérapeutiques. Les premiers résultats d'un autre stage de M2 sur ces aspects semblent indiquer cette possibilité.

En conclusion, la stratégie CE-MS/MS offre trois caractéristiques clés pour le suivi clinique des patients sous traitement d'anticorps monoclonaux, en une seule analyse d'un échantillon sérique (sous couvert d'avoir établi également une gamme étalon). Actuellement, le suivi clinique de ces individus s'effectue par deux types d'immunodosages (un pour la quantification du mAb et un pour l'immunogénicité). D'un point de vue économique et de mise en place, considérant seulement ces informations quantitatives, il apparaît pour le moment compliqué d'instaurer la procédure en routine à l'hôpital, bien que certains hôpitaux aient fait l'acquisition de spectromètres de masse. En particulier, la séparation par électrophorèse capillaire, bien que permettant un bon recouvrement de séquence avec la séparation simultanée de glycanes, d'*isoD*, de *deaN* et d'autres peptides, reste une stratégie séparative moins robuste que la chromatographie liquide quand elle est couplée à la MS. Cependant, il ne faudrait pas sous-estimer l'intérêt d'obtenir simultanément ces informations quantitatives et structurales pour garantir la fiabilité des conclusions biologiques. Par conséquent, dans un premier temps, il serait judicieux d'appliquer cette approche à des études de cohortes de patients. Cette démarche permettrait de déterminer si le suivi des PTM de l'infliximab est pertinent ou non lors d'une prise en charge clinique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Fanning, L.J., Connor, A.M. and Wu, G.E. **1996**, Development of the Immunoglobulin Repertoire, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1 (79), 1–14.
- [2] Köhler, G. and Milstein, C. **1975**, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 5517 (256), 495–497.
- [3] Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H. and Ueda, N. **2018**, Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents – Comparison among therapeutic TNF- α antagonists, *Cytokine*, (101), 56–63.
- [4] Buss, N.A., Henderson, S.J., McFarlane, M., Shenton, J.M. and de Haan, L. **2012**, Monoclonal antibody therapeutics: history and future, *Current Opinion in Pharmacology*, 5 (12), 615–622.
- [5] Weiner, G.J. **2015**, Building better monoclonal antibody-based therapeutics, *Nature Reviews Cancer*, 6 (15), 361–370.
- [6] Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. -i., Tsukamoto, H. and Shimoda, T. **2010**, Transmembrane TNF- : structure, function and interaction with anti-TNF agents, *Rheumatology*, 7 (49), 1215–1228.
- [7] Doorduijn, D.J., Heesterbeek, D.A.C., Ruyken, M., de Haas, C.J.C., Stapels, D.A.C., Aerts, P.C., Rooijackers, S.H.M. and Bardeol, B.W. **2021**, Polymerization of C9 enhances bacterial cell envelope damage and killing by membrane attack complex pores. *PLoS Pathog*, 18 (8), 1010758
- [8] Grevys, A. *et al.* **2018**, A human endothelial cell-based recycling assay for screening of FcRn targeted molecules, *Nature Communications*, 1 (9), 621.
- [9] Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T. and Yamaguchi, T. **2010**, Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR, *The Journal of Immunology*, 4 (184), 1968–1976.
- [10] Roopenian, D.C. and Akilesh, S. **2007**, FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age, *Nature Reviews Immunology*, 9 (7), 715–725.
- [11] Toh, W.H., Louber, J., Mahmoud, I.S., Chia, J., Bass, G.T., Dower, S.K., Verhagen, A.M. and Gleeson, P.A. **2019**, FcRn mediates fast recycling of endocytosed albumin and IgG from early macropinosomes in primary macrophages, *Journal of Cell Science*, jcs.235416.
- [12] Beyer, B., Schuster, M., Jungbauer, A. and Lingg, N. **2018**, Microheterogeneity of Recombinant Antibodies: Analytics and Functional Impact, *Biotechnology Journal*, 1 (13), 1700476.
- [13] Lyubarskaya, Y., Houde, D., Woodard, J., Murphy, D. and Mhatre, R. **2006**, Analysis of recombinant monoclonal antibody isoforms by electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for streamlining characterization of recombinant monoclonal antibody charge heterogeneity, *Analytical Biochemistry*, 1 (348), 24–39.
- [14] Zheng, J.Y. and Janis, L.J. **2006**, Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298, *International Journal of Pharmaceutics*, 1–2 (308), 46–51.
- [15] Tran, J.C. *et al.* **2016**, Automated Affinity Capture and On-Tip Digestion to Accurately Quantitate *in Vivo* Deamidation of Therapeutic Antibodies, *Analytical Chemistry*, 23 (88), 11521–11526.
- [16] Huang, L., Lu, J., Wroblewski, V.J., Beals, J.M. and Riggan, R.M. **2005**, In Vivo Deamidation Characterization of Monoclonal Antibody by LC/MS/MS, *Analytical Chemistry*, 5 (77), 1432–1439.
- [17] Schmid, I. *et al.* **2018**, Assessment of susceptible chemical modification sites of trastuzumab and endogenous human immunoglobulins at physiological conditions, *Communications Biology*, 1 (1), 28.
- [18] Vlasak, J. *et al.* **2009**, Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody, *Analytical Biochemistry*, 2 (392), 145–154.
- [19] Hintersteiner, B., Lingg, N., Janzek, E., Mutschlechner, O., Loibner, H. and Jungbauer, A. **2016**, Microheterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies is governed by changes in the surface charge of the protein, *Biotechnology Journal*, 12 (11), 1617–1627.

- [20] Wakankar, A.A., Liu, J. u. n., VanderVelde, D., Wang, Y.J., Shire, S.J. and Borchardt, R.T. **2007**, The effect of cosolutes on the isomerization of aspartic acid residues and conformational stability in a monoclonal antibody, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7 (96), 1708–1718.
- [21] Gahoual, R., Beck, A., François, Y.-N. and Leize-Wagner, E. **2016**, Independent highly sensitive characterization of asparagine deamidation and aspartic acid isomerization by sheathless CZE-ESI-MS/MS: Characterization of Asn and Asp PTMs by CZE-ESI-MS, *Journal of Mass Spectrometry*, 2 (51), 150–158.
- [22] Eakin, C.M., Miller, A., Kerr, J., Kung, J. and Wallace, A. **2014**, Assessing analytical methods to monitor isoAsp formation in monoclonal antibodies, *Frontiers in Pharmacology*, (5).
- [23] Wakankar, A.A., Borchardt, R.T., Eigenbrot, C., Shia, S., Wang, Y.J., Shire, S.J. and Liu, J.L. **2007**, Aspartate Isomerization in the Complementarity-Determining Regions of Two Closely Related Monoclonal Antibodies, *Biochemistry*, 6 (46), 1534–1544.
- [24] Hinterholzer, A., Stanojlovic, V., Regl, C., Huber, C.G., Cabrele, C. and Schubert, M. **2021**, Detecting aspartate isomerization and backbone cleavage after aspartate in intact proteins by NMR spectroscopy, *Journal of Biomolecular NMR*, 1 (75), 71–82.
- [25] Kim, Y.H., Berry, A.H., Spencer, D.S. and Stites, W.E. **2001**, Comparing the effect on protein stability of methionine oxidation versus mutagenesis: steps toward engineering oxidative resistance in proteins, *Protein Engineering, Design and Selection*, 5 (14), 343–347.
- [26] Bertolotti-Ciarlet, A. *et al.* **2009**, Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to FcRn and Fcγ receptors, *Molecular Immunology*, 8–9 (46), 1878–1882.
- [27] Wang, W. *et al.* **2011**, Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies, *Molecular Immunology*, 6–7 (48), 860–866.
- [28] Mo, J., Yan, Q., So, C.K., Soden, T., Lewis, M.J. and Hu, P. **2016**, Understanding the Impact of Methionine Oxidation on the Biological Functions of IgG1 Antibodies Using Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 19 (88), 9495–9502.
- [29] Stracke, J. *et al.* **2014**, A novel approach to investigate the effect of methionine oxidation on pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies, *mAbs*, 5 (6), 1229–1242.
- [30] Liu, L. **2015**, Antibody Glycosylation and Its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (104), 1866–1884.
- [31] Aebi, M. **2013**, N-linked protein glycosylation in the ER, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 11 (1833), 2430–2437.
- [32] Bieberich, E. **2014**, Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins, in R.K. Yu and C.-L. Schengrund (eds) *Glycobiology of the Nervous System*. New York, NY: Springer New York (Advances in Neurobiology), 47–70.
- [33] Fisher, P., Thomas-Oates, J., Wood, A.J. and Ungar, D. **2019**, The N-Glycosylation Processing Potential of the Mammalian Golgi Apparatus, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, (7), 157.
- [34] Hanson, Q.M. and Barb, A.W. **2015**, A Perspective on the Structure and Receptor Binding Properties of Immunoglobulin G Fc, *Biochemistry*, 19 (54), 2931–2942.
- [35] Lund, J., Toshiyuki, T., Noriko, T., Sarmay, G., Yoji, A. and Jefferis, R. **1990**, A protein structural change in aglycosylated IgG3 correlates with loss of huFcγRI and hufcγR111 binding and/or activation, *Molecular Immunology*, 11 (27), 1145–1153.
- [36] Walker, M.R., Lund, J., Thompson, K.M. and Jefferis, R. **1989**, Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing FcγRI and/or FcγRII receptors, *Biochemical Journal*, 2 (259), 347–353.
- [37] Ferrara, C. *et al.* **2011**, Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc RIII and antibodies lacking core fucose, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 31 (108), 12669–12674.
- [38] Aufses, A.H. **2001**, The history of Crohn’s disease, *Crohns Disease*, 1 (81).

- [39] Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.-F. and Peyrin-Biroulet, L. **2017**, Crohn's disease, *The Lancet*, 10080 (389), 1741–1755.
- [40] Feldmann, M. and Steinman, L. **2005**, Design of effective immunotherapy for human autoimmunity, *Nature*, 7042 (435), 612–619.
- [41] Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G. and Tak, P.P. **2008**, Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review, *Pharmacology & Therapeutics*, 2 (117), 244–279.
- [42] Kindler, V., Sappino, A.-P., Grau, G.E., Piguët, P.-F. and Vassalli, P. **1989**, The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection, *Cell*, 5 (56), 731–740.
- [43] Carlos, T.M. and Harlan, J.M. **1994**, Leukocyte-endothelial adhesion molecules, *Blood*, 7 (84), 2068–2101.
- [44] Kuijpers, T.W., Hakkert, B.C., Hart, M.H. and Roos, D. **1992**, Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8., *The Journal of Cell Biology*, 3 (117), 565–572.
- [45] Afa Crohn-RCH-France **2020**, Quelle est la fréquence de la maladie de Crohn ? Available at: <https://www.afa.asso.fr/maladie-inflammatoire-chronique-de-lintestin/comprendre-la-maladie/maladie-de-crohn/frequence-maladie-crohn/#:~:text=En%20France%2C%20la%20fr%C3%A9quence%20de, affecte%20%C3%A9galement%20les%20%20sexes.>
- [46] Brennan, F. **1989**, Inhibitory effect of tnf-alpha; antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis, *The Lancet*, 8657 (334), 244–247.
- [47] Elliott, M.J. *et al.* **1993**, Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α , *Arthritis & Rheumatism*, 12 (36), 1681–1690.
- [48] Kaymakcalan, Z., Sakorafas, P., Bose, S., Scesney, S., Xiong, L., Hanzatian, D.K., Salfeld, J. and Sasso, E.H. **2009**, Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor, *Clinical Immunology*, 2 (131), 308–316.
- [49] Caspersen, S. *et al.* **2008**, Infliximab for Inflammatory Bowel Disease in Denmark 1999–2005: Clinical Outcome and Follow-Up Evaluation of Malignancy and Mortality, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11 (6), 1212–1217.
- [50] Barthel, H.R., Gille, T., Halbsguth, A. and Kramer, M. **2005**, Successful treatment with adalimumab in infliximab-resistant crohn's disease, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 9 (20), 1464–1465.
- [51] van Vollenhoven, R. **2003**, Treatment with infliximab (Remicade) when etanercept (Enbrel) has failed or vice versa: data from the STURE registry showing that switching tumour necrosis factor blockers can make sense, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 12 (62), 1195–1198.
- [52] Knight, D.M. *et al.* **1993**, Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody, *Molecular Immunology*, 16 (30), 1443–1453.
- [53] Eur Med Agency EMA **2009**, *Remicade EPAR - Product information*. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/remicade> (Accessed: 21 July 2023).
- [54] Legrand, P. **2022**, *Développement analytique combiné à l'approche prédictive ASAP pour l'étude de la stabilité de produits pharmaceutiques chimiques et biologiques*. Thèse de Chimie. Université Paris-Cité.
- [55] Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X.-Y., Shealy, D. and Wagner, C. **2002**, Binding and Functional Comparisons of Two Types of Tumor Necrosis Factor Antagonists, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2 (301), 418–426.
- [56] Eissner, G., Kolch, W. and Scheurich, P. **2004**, Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 5 (15), 353–366.
- [57] Berns, M. and Hommes, D.W. **2016**, Anti-TNF- α therapies for the treatment of Crohn's disease: the past, present and future, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2 (25), 129–143.
- [58] Harashima, S. *et al.* **2001**, Outside-to-Inside Signal Through the Membrane TNF- α Induces E-Selectin (CD62E) Expression on Activated Human CD4⁺ T Cells, *The Journal of Immunology*, 1 (166), 130–136.
- [59] Bendtzen, K. **2015**, Immunogenicity of Anti-TNF- α Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection, *Frontiers in Immunology*, (6).
- [60] Strand, V. *et al.* **2017**, Immunogenicity of Biologics in Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review, *BioDrugs*, 4 (31), 299–316.

- [61] Kuriakose, A., Chirmule, N. and Nair, P. **2016**, Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications, *Journal of Immunology Research*, (2016), 1–18.
- [62] Soga, T. and Heiger, D.N. **2000**, Amino Acid Analysis by Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 6 (72), 1236–1241.
- [63] Whitmore, C.D. and Gennaro, L.A. **2012**, Capillary electrophoresis-mass spectrometry methods for tryptic peptide mapping of therapeutic antibodies: CE and CEC, *Electrophoresis*, 11 (33), 1550–1556.
- [64] Le-Minh, V., Tran, N.T., Makky, A., Rosilio, V., Taverna, M. and Smadja, C. **2019**, Capillary zone electrophoresis-native mass spectrometry for the quality control of intact therapeutic monoclonal antibodies, *Journal of Chromatography A*, (1601), 375–384.
- [65] Pacáková, V. and Štulík, K. **1997**, Capillary electrophoresis of inorganic anions and its comparison with ion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1–2 (789), 169–180.
- [66] Timerbaev, A.R. **2004**, Capillary electrophoresis of inorganic ions: An update, *Electrophoresis*, 23–24 (25), 4008–4031.
- [67] Lu, T., Klein, L.J., Ha, S. and Rustandi, R.R. **2020**, High-Resolution capillary electrophoresis separation of large RNA under non-aqueous conditions, *Journal of Chromatography A*, (1618), 460875.
- [68] Beckers, J.J. **1973**, Isotachopheresis : some fundamental aspects, Thèse, *Technische Hogeschool Eindhoven*.
- [69] Larsson, M. and Lutz, E.S. **2000**, Transient isotachopheresis for sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-mass spectrometry for peptide analysis, *Electrophoresis*, 14 (21), 2859–2865.
- [70] Stock, L.G., Wildner, S., Regl, C., Gadermaier, G., Huber, C.G. and Stutz, H. **2018**, Monitoring of Deamidation and Lanthionine Formation in Recombinant Mugwort Allergen by Capillary Zone Electrophoresis (CZE)-UV and Transient Capillary Isotachopheresis-CZE-Electrospray Ionization-TOF-MS, *Analytical Chemistry*, 20 (90), 11933–11940.
- [71] Thompson, T.J., Foret, Frantisek., Vouros, Paul. and Karger, B.L. **1993**, Capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry: improvement of protein detection limits using on-column transient isotachopheretic sample preconcentration, *Analytical Chemistry*, 7 (65), 900–906.
- [72] Abdul Keyon, A.S., Guijt, R.M., Bolch, C.J.S. and Breadmore, M.C. **2014**, Transient isotachopheresis-capillary zone electrophoresis with contactless conductivity and ultraviolet detection for the analysis of paralytic shellfish toxins in mussel samples, *Journal of Chromatography A*, (1364), 295–302.
- [73] Hjertén, S. **1967**, Free zone electrophoresis, *Chromatographic Reviews*, 2 (9), 122–219.
- [74] Domon, B. **2006**, Mass Spectrometry and Protein Analysis, *Science*, 5771 (312), 212–217.
- [75] Perreault, H. and Lattová, E. **2011**, Mass Spectrometry, in *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, 669–677.
- [76] Bonvin, G., Schappler, J. and Rudaz, S. **2012**, Capillary electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry interfaces: Fundamental concepts and technical developments, *Journal of Chromatography A*, (1267), 17–31.
- [77] Staub, A., Giraud, S., Saugy, M., Rudaz, S., Veuthey, J.-L. and Schappler, J. **2010**, CE-ESI-TOF/MS for human growth hormone analysis, *Electrophoresis*, 2 (31), 388–395.
- [78] Vuorensola, K., Kokkonen, J., Sirén, H. and Ketola, R.A. **2001**, Optimization of capillary electrophoretic-electrospray ionization-mass spectrometric analysis of catecholamines, *Electrophoresis*, 20 (22), 4347–4354.
- [79] Lee, E.D., Mück, W., Henion, J.D. and Covey, T.R. **1989**, Liquid junction coupling for capillary zone electrophoresis/ion spray mass spectrometry, *Biological Mass Spectrometry*, 9 (18), 844–850.
- [80] Maxwell, E.J. and Chen, D.D.Y. **2008**, Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 1 (627), 25–33.
- [81] Ramautar, R., Heemskerk, A.A.M., Hensbergen, P.J., Deelder, A.M., Busnel, J.-M. and Mayboroda, O.A. **2012**, CE–MS for proteomics: Advances in interface development and application, *Journal of Proteomics*, 13 (75), 3814–3828.
- [82] Bonvin, G., Veuthey, J.-L., Rudaz, S. and Schappler, J. **2012**, Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling, *Electrophoresis*, 4 (33), 552–562.
- [83] Höcker, O., Montealegre, C. and Neusüß, C. **2018**, Characterization of a nanoflow sheath liquid interface and comparison to a sheath liquid and a sheathless porous-tip interface for CE-ESI-MS in positive and negative ionization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 21 (410), 5265–5275.

- [84] Gahoual, R., Leize-Wagner, E., Houzé, P. and François, Y. **2019**, Revealing the potential of capillary electrophoresis/mass spectrometry: the tipping point, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *SI* (33), 11–19.
- [85] Tie, C., Zhang, D.-W., Chen, H.-X., Song, S.-L. and Zhang, X.-X. **2012**, Study of the electrical connection mechanism of sheathless interface for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: Electro-connection of sheathless CE/MS interface, *Journal of Mass Spectrometry*, *11* (47), 1429–1434.
- [86] Wilm, M. and Mann, M. **1996**, Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source, *Analytical Chemistry*, *1* (68), 1–8.
- [87] King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C. and Olah, T. **2000**, Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *11* (11), 942–950.
- [88] Karas, M., Bahr, U. and Dülcks, T. **2000**, Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *6–7* (366), 669–676.
- [89] Smith, R.W. **2013**, Mass Spectrometry, in *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Elsevier, 603–608.
- [90] Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. **1989**, Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Science*, *4926* (246), 64–71.
- [91] Mellon, F.A. **2003**, Mass Spectrometry | Principles and Instrumentation, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 3739–3749.
- [92] Thomas, S.N. **2019**, Mass spectrometry, in *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. Elsevier, 171–185.
- [93] Paizs, B. and Suhai, S. **2005**, Fragmentation pathways of protonated peptides, *Mass Spectrometry Reviews*, *4* (24), 508–548.
- [94] Boesl, U. **2017**, Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics: Time-Of-Flight Mass Spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, *1* (36), 86–109.
- [95] Wagner, E. **2004**, *Nouvelles approches de la spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de biomolécules : Applications à la protéomique*. Thèse de Chimie. Université de Strasbourg
- [96] Gomes, F.P. and Yates, J.R. **2019**, Recent trends of capillary electrophoresis-mass spectrometry in proteomics research, *Mass Spectrometry Reviews*, *6* (38), 445–460.
- [97] Kaplon, H. and Reichert, J.M. **2021**, Antibodies to watch in 2021, *mAbs*, *1* (13), 1860476.
- [98] Weinreich, D.M. *et al.* **2021**, REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19, *New England Journal of Medicine*, *3* (384), 238–251.
- [99] Beck, A., Wurch, T., Bailly, C. and Corvaia, N. **2010**, Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies, *Nature Reviews Immunology*, *5* (10), 345–352.
- [100] Xu, Y. *et al.* **2019**, Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies, *mAbs*, *2* (11), 239–264.
- [101] van Erp, E.A., Luytjes, W., Ferwerda, G. and van Kasteren, P.B. **2019**, Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease, *Frontiers in Immunology*, (10), 548.
- [102] Janin-Bussat, M.-C., Tonini, L., Huillet, C., Colas, O., Klinguer-Hamour, C., Corvaia, N. and Beck, A. **2013**, Cetuximab Fab and Fc N-Glycan Fast Characterization Using IdeS Digestion and Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry, in A. Beck (ed.) *Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), 93–113.
- [103] Stavenhagen, K., Gahoual, R., Dominguez Vega, E., Palmese, A., Ederveen, A.L.H., Cutillo, F., Palinsky, W., Bierau, H. and Wuhrer, M. **2019**, Site-specific N- and O-glycosylation analysis of atacept, *mAbs*, *6* (11), 1053–1063.
- [104] Liu, H., Gaza-Bulsecu, G., Faldu, D., Chumsae, C. and Sun, J. **2008**, Heterogeneity of Monoclonal Antibodies, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *7* (97), 2426–2447.
- [105] Fekete, S., Guillaume, D., Sandra, P. and Sandra, K. **2016**, Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals, *Analytical Chemistry*, *1* (88), 480–507.
- [106] Beck, A. *et al.* **2019**, Cutting-edge multi-level analytical and structural characterization of antibody-drug conjugates: present and future, *Expert Review of Proteomics*, *4* (16), 337–362.
- [107] Zhang, H., Cui, W. and Gross, M.L. **2014**, Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies, *FEBS Letters*, *2* (588), 308–317.

- [108] Gahoual, R., Busnel, J.-M., Wolff, P., François, Y.N. and Leize-Wagner, E. **2014**, Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *4* (406), 1029–1038.
- [109] Lechner, A., Giorgetti, J., Gahoual, R., Beck, A., Leize-Wagner, E. and François, Y.-N. **2019**, Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016–2018, *Journal of Chromatography B*, (1122–1123), 1–17.
- [110] Gahoual, R., Beck, A., Leize-Wagner, E. and François, Y.-N. **2016**, Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products, *Journal of Chromatography B*, (1032), 61–78.
- [111] Dadouch, M., Ladner, Y. and Perrin, C. **2021**, Analysis of Monoclonal Antibodies by Capillary Electrophoresis: Sample Preparation, Separation, and Detection, *Separations*, *1* (8), 4.
- [112] Aebersold, R. and Mann, M. **2003**, Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, *6928* (422), 198–207.
- [113] Scriba, G.K.E. and Psurek, A. **2009**, Separation of Peptides by Capillary Electrophoresis, in Schmitt-Kopplin P (ed.) *Capillary Electrophoresis. Methods In Molecular Biology*TM. Humana Press, 24.
- [114] Thiede, B., Höhenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F. and Jungblut, P.R. **2005**, Peptide mass fingerprinting, *Methods*, *3* (35), 237–247.
- [115] Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S. and Gatto, G.J. **2005**, Protein Posttranslational Modifications : The Chemistry of Proteome Diversifications, *Angewandte Chemie International Edition*, *45* (44), 7342–7372.
- [116] Witze, E.S., Old, W.M., Resing, K.A. and Ahn, N.G. **2007**, Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry, *Nature Methods*, *10* (4), 798–806.
- [117] Olsen, J.V. and Mann, M. **2013**, Status of Large-scale Analysis of Post-translational Modifications by Mass Spectrometry, *Molecular & Cellular Proteomics*, *12* (12), 3444–3452.
- [118] Zhao, J., Peng, W., Dong, X. and Mechref, Y. **2021**, Analysis of NIST Monoclonal Antibody Reference Material Glycosylation Using the LC–MS/MS-Based Glycoproteomic Approach, *Journal of Proteome Research*, *1* (20), 818–830.
- [119] Bobaly, B., D’Atri, V., Goyon, A., Colas, O., Beck, A., Fekete, S. and Guillaume, D. **2017**, Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. II – Enzymatic and chemical sample preparation, *Journal of Chromatography B*, (1060), 325–335.
- [120] León, I.R., Schwämmle, V., Jensen, O.N. and Sprenger, R.R. **2013**, Quantitative Assessment of In-solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis, *Molecular & Cellular Proteomics*, *10* (12), 2992–3005.
- [121] Yu, Y.-Q., Gilar, M., Lee, P.J., Bouvier, E.S.P. and Gebler, J.C. **2003**, Enzyme-Friendly, Mass Spectrometry-Compatible Surfactant for In-Solution Enzymatic Digestion of Proteins, *Analytical Chemistry*, *21* (75), 6023–6028.
- [122] Formolo, T. *et al.* **2015**, Determination of the NISTmAb Primary Structure, in J.E. Schiel, D.L. Davis, and O.V. Borisov (eds) *ACS Symposium Series*. Washington, DC: American Chemical Society, 1–62.
- [123] Giansanti, P., Tsiatsiani, L., Low, T.Y. and Heck, A.J.R. **2016**, Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin, *Nature Protocols*, *5* (11), 993–1006.
- [124] Switzar, L., Giera, M. and Niessen, W.M.A. **2013**, Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, *Journal of Proteome Research*, *3* (12), 1067–1077.
- [125] Krokhin, O.V., Antonovici, M., Ens, W., Wilkins, J.A. and Standing, K.G. **2006**, Deamidation of -Asn-Gly-Sequences during Sample Preparation for Proteomics: Consequences for MALDI and HPLC-MALDI Analysis, *Analytical Chemistry*, *18* (78), 6645–6650.
- [126] Kori, Y., Patel, R., Neill, A. and Liu, H. **2016**, A conventional procedure to reduce Asn deamidation artifacts during trypsin peptide mapping, *Journal of Chromatography B*, (1009–1010), 107–113.
- [127] Li, X., Cournoyer, J.J., Lin, C. and O’Connor, P.B. **2008**, Use of 18O Labels to Monitor Deamidation during Protein and Peptide Sample Processing, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *6* (19), 855–864.
- [128] Gaza-Bulsecu, G., Li, B., Bulsecu, A. and Liu, H. **2008**, Method to Differentiate Asn Deamidation That Occurred Prior to and during Sample Preparation of a Monoclonal Antibody, *Analytical Chemistry*, *24* (80), 9491–9498.

- [129] Cao, M. **2019**, An Automated and Qualified Platform Method for Site-Specific Succinimide and Deamidation Quantitation Using Low-pH Peptide Mapping, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10.
- [130] Jiang, P., Li, F. and Ding, J. **2020**, Development of an efficient LC-MS peptide mapping method using accelerated sample preparation for monoclonal antibodies, *Journal of Chromatography B*, (1137), 121895.
- [131] Yin, Z., Zhao, W., Tian, M., Zhang, Q., Guo, L. and Yang, L. **2014**, A capillary electrophoresis-based immobilized enzyme reactor using graphene oxide as a support via layer by layer electrostatic assembly, *The Analyst*, 8 (139), 1973–1979.
- [132] Zhang, L., Luo, S. and Zhang, B. **2016**, Glycan analysis of therapeutic glycoproteins, *mAbs*, 2 (8), 205–215.
- [133] Zaia, J. **2013**, Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry of Carbohydrates, in N. Volpi and F. Maccari (eds) *Capillary Electrophoresis of Biomolecules*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), 13–25.
- [134] Bunz, S.-C., Rapp, E. and Neusüss, C. **2013**, Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry of APTS-Labeled Glycans for the Identification of Unknown Glycan Species in Capillary Electrophoresis/Laser-Induced Fluorescence Systems, *Analytical Chemistry*, 21 (85), 10218–10224.
- [135] Simpson, S.L., Quirino, J.P. and Terabe, S. **2008**, On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 1–2 (1184), 504–541.
- [136] Kitagawa, F. and Otsuka, K. **2014**, Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, (1335), 43–60.
- [137] Zhu, G., Sun, L. and Dovichi, N.J. **2016**, Dynamic pH junction preconcentration in capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry for proteomics analysis, *The Analyst*, 18 (141), 5216–5220.
- [138] Biacchi, M., Bhajun, R., Saïd, N., Beck, A., François, Y.N. and Leize-Wagner, E. **2014**, Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface, *Electrophoresis*, 20 (35), 2986–2995.
- [139] Gennaro, L.A., Salas-Solano, O. and Ma, S. **2006**, Capillary electrophoresis–mass spectrometry as a characterization tool for therapeutic proteins, *Analytical Biochemistry*, 2 (355), 249–258.
- [140] Gahoual, R., Burr, A., Busnel, J.-M., Kuhn, L., Hammann, P., Beck, A., François, Y.-N. and Leize-Wagner, E. **2013**, Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs*, 3 (5), 479–490.
- [141] Dada, O.O., Zhao, Y., Jaya, N. and Salas-Solano, O. **2017**, High-Resolution Capillary Zone Electrophoresis with Mass Spectrometry Peptide Mapping of Therapeutic Proteins: Peptide Recovery and Post-translational Modification Analysis in Monoclonal Antibodies and Antibody–Drug Conjugates, *Analytical Chemistry*, 21 (89), 11236–11242.
- [142] Eur Med Agency EMA **2014**, *Guideline on Similar Biological Medicinal Products*, CHMP43704. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/10/WC500176768.pdf (Accessed: 5 May 2023).
- [143] Gahoual, R., Biacchi, M., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., Beck, A., Leize-Wagner, E. and François, Y.N. **2014**, Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs*, 6 (6), 1464–1473.
- [144] Corti, A. and Curnis, F. **2011**, Isoaspartate-dependent molecular switches for integrin–ligand recognition, *Journal of Cell Science*, 4 (124), 515–522.
- [145] Robinson, N.E. and Robinson, A.B. **2001**, Molecular clocks, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 3 (98), 944–949.
- [146] Halley, J. *et al.* **2020**, An Industry Perspective on Forced Degradation Studies of Biopharmaceuticals: Survey Outcome and Recommendations, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1 (109), 6–21.
- [147] Lu, X., Machiesky, L.A., De Mel, N., Du, Q., Xu, W., Washabaugh, M., Jiang, X.-R. and Wang, J. **2020**, Characterization of IgG1 Fc Deamidation at Asparagine 325 and Its Impact on Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity and Fc γ RIIIa Binding, *Scientific Reports*, 1 (10), 383.
- [148] Gahoual, R., Heidenreich, A.-K., Somsen, G.W., Bulau, P., Reusch, D., Wuhrer, M. and Habeger, M. **2017**, Detailed Characterization of Monoclonal Antibody Receptor Interaction Using Affinity Liquid Chromatography Hyphenated to Native Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 10 (89), 5404–5412.

- [149] Lew, C., Gallegos-Perez, J.-L., Fonslow, B., Lies, M. and Guttman, A. **2015**, Rapid Level-3 Characterization of Therapeutic Antibodies by Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of Chromatographic Science*, 3 (53), 443–449.
- [150] Mo, J., Tymiak, A.A. and Chen, G. **2012**, Structural mass spectrometry in biologics discovery: advances and future trends, *Drug Discovery Today*, 23–24 (17), 1323–1330.
- [151] Faserl, K., Sarg, B. and Lindner, H.H. **2020**, Application of CE-MS for the analysis of histones and histone modifications, *Methods*, (184), 125–134.
- [152] Heemskerk, A.A.M., Busnel, J.-M., Schoenmaker, B., Derks, R.J.E., Klychnikov, O., Hensbergen, P.J., Deelder, A.M. and Mayboroda, O.A. **2012**, Ultra-Low Flow Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Improved Ionization Efficiency in Phosphoproteomics, *Analytical Chemistry*, 10 (84), 4552–4559.
- [153] Wada, R., Matsui, M. and Kawasaki, N. **2019**, Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms, *mAbs*, 2 (11), 350–372.
- [154] Gahoual, R., Busnel, J.-M., Beck, A., François, Y.-N. and Leize-Wagner, E. **2014**, Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 18 (86), 9074–9081.
- [155] Kammeijer, G.S.M., Jansen, B.C., Kohler, I., Heemskerk, A.A.M., Mayboroda, O.A., Hensbergen, P.J., Schappler, J. and Wuhler, M. **2017**, Sialic acid linkage differentiation of glycopeptides using capillary electrophoresis – electrospray ionization – mass spectrometry, *Scientific Reports*, 1 (7), 3733.
- [156] Giorgetti, J. *et al.* **2018**, Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis – Mass spectrometry: Assessment and method validation, *Talanta*, (178), 530–537.
- [157] Giorgetti, J., Beck, A., Leize-Wagner, E. and Francois, Y. **2020**, Combination of intact, middle-up and bottom-up levels to characterize 7 therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis – Mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (182), 113107.
- [158] Bejan-Angoulvant, T. and Alexandre, J. **2019**, Mécanismes d'action et toxicités potentielles des anticorps monoclonaux, *médecine/sciences*, 12 (35), 1114–1120.
- [159] Hemperly, A. and Vande Casteele, N. **2018**, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Infliximab in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease, *Clinical Pharmacokinetics*, 8 (57), 929–942.
- [160] Eur Med Agency EMA **2011**, *Guideline on bioanalytical method validation*. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf, 2011. (Accessed: 16 October 2021).
- [161] Food Drug Adm FDA **2018**, *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> (Accessed: 5 May 2023).
- [162] Kaza, M., Karaźniewicz-Łada, M., Kosicka, K., Siemiątkowska, A. and Rudzki, P.J. **2019**, Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse?, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (165), 381–385.
- [163] Josephy, P.D., Eling, T. and Mason, R.P. **1982**, The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates., *Journal of Biological Chemistry*, 7 (257), 3669–3675.
- [164] Wolbink, G.J. **2005**, Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 5 (64), 704–707.
- [165] Sono, K., Yamada, A., Yoshimatsu, Y., Takada, N. and Suzuki, Y. **2012**, Factors associated with the loss of response to infliximab in patients with Crohn's disease, *Cytokine*, 2 (59), 410–416.
- [166] Cahuzac, H. and Devel, L. **2020**, Analytical Methods for the Detection and Quantification of ADCs in Biological Matrices, *Pharmaceuticals*, 12 (13), 462.
- [167] Dopatka, H.D. and Giesendorf, B. **1992**, Single point quantification of antibody by ELISA without need of a reference curve, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 6 (6), 417–422.
- [168] Domínguez, M., Moreno, I. and Toraño, A. **2019**, Quantitation of monoclonal antibody by capture ELISA based on initial enzyme activity rate, *Journal of Immunological Methods*, (474), 112645.

- [169] Žak, M.M. *et al.* **2021**, Development and characterization of a quantitative ELISA to detect anti-SARS-CoV-2 spike antibodies, *Heliyon*, 12 (7), e08444.
- [170] Wadhwa, M., Knezevic, I., Kang, H.-N. and Thorpe, R. **2015**, Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility, *Biologicals*, 5 (43), 298–306.
- [171] Gunn, G.R., Sealey, D.C.F., Jamali, F., Meibohm, B., Ghosh, S. and Shankar, G. **2016**, From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals, *Clinical and Experimental Immunology*, 2 (184), 137–146.
- [172] Hennig, C., Rink, L., Fagin, U., Jabs, W.J. and Kirchner, H. **2000**, The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs, *Journal of Immunological Methods*, 1–2 (235), 71–80.
- [173] Urban, P.L. **2016**, Quantitative mass spectrometry: an overview, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2079 (374), 20150382.
- [174] Jiang, L., He, L. and Fountoulakis, M. **2004**, Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis, *Journal of Chromatography A*, 2 (1023), 317–320.
- [175] El Amrani, M., van den Broek, M.P.H., Göbel, C. and van Maarseveen, E.M. **2016**, Quantification of active infliximab in human serum with liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a tumor necrosis factor alpha -based pre-analytical sample purification and a stable isotopic labeled infliximab bio-similar as internal standard: A target-based, sensitive and cost-effective method, *Journal of Chromatography A*, (1454), 42–48.
- [176] Damen, C.W.N., Derissen, E.J.B., Schellens, J.H.M., Rosing, H. and Beijnen, J.H. **2009**, The bioanalysis of the monoclonal antibody trastuzumab by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after immuno-affinity purification from human serum, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 5 (50), 861–866.
- [177] Li, K.W., Gonzalez-Lozano, M.A., Koopmans, F. and Smit, A.B. **2020**, Recent Developments in Data Independent Acquisition (DIA) Mass Spectrometry: Application of Quantitative Analysis of the Brain Proteome, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, (13), 564446.
- [178] Barbier Saint Hilaire, P., Rousseau, K., Seyer, A., Dechaumet, S., Damont, A., Junot, C. and Fenaille, F. **2020**, Comparative Evaluation of Data Dependent and Data Independent Acquisition Workflows Implemented on an Orbitrap Fusion for Untargeted Metabolomics, *Metabolites*, 4 (10), 158.
- [179] Kettenbach, A.N., Rush, J. and Gerber, S.A. **2011**, Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope–labeled synthetic peptides, *Nature Protocols*, 2 (6), 175–186.
- [180] McCabe, A., Dolled-Filhart, M., Camp, R.L. and Rimm, D.L. **2005**, Automated Quantitative Analysis (AQUA) of In Situ Protein Expression, Antibody Concentration, and Prognosis, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 24 (97), 1808–1815.
- [181] Johnson, J. *et al.* **2021**, Construction of à la carte QconCAT protein standards for multiplexed quantification of user-specified target proteins, *BMC Biology*, 1 (19), 195.
- [182] Brun, V., Dupuis, A., Adrait, A., Marcellin, M., Thomas, D., Court, M., Vandenesch, F. and Garin, J. **2007**, Isotope-labeled Protein Standards, *Molecular & Cellular Proteomics*, 12 (6), 2139–2149.
- [183] Barr, J.R. *et al.* **1996**, Isotope dilution--mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I, *Clinical Chemistry*, 10 (42), 1676–1682.
- [184] Wang, X., Liang, Y., Liu, L., Shi, J. and Zhu, H.-J. **2016**, Targeted absolute quantitative proteomics with SILAC internal standards and unlabeled full-length protein calibrators (TAQSI) : Novel targeted absolute quantitative proteomics (TAQSI), *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 5 (30), 553–561.
- [185] Auclair, J. and Rathore, A.S. **2021**, The Multi-Attribute Method (MAM) for the Characterization of Biopharmaceuticals, *LCGC North America*, 28–32.
- [186] Butré, C.I., D’Atri, V., Diemer, H., Colas, O., Wagner, E., Beck, A., Cianferani, S., Guillarme, D. and Delobel, A. **2023**, Interlaboratory Evaluation of a User-Friendly Benchtop Mass Spectrometer for Multiple-Attribute Monitoring Studies of a Monoclonal Antibody, *Molecules*, 6 (28), 2855.

- [187] Wei, C., Su, D., Wang, J., Jian, W. and Zhang, D. **2018**, LC–MS Challenges in Characterizing and Quantifying Monoclonal Antibodies (mAb) and Antibody-Drug Conjugates (ADC) in Biological Samples, *Current Pharmacology Reports*, *1* (4), 45–63.
- [188] Chiu, H.-H., Tsai, Y.-J., Lo, C., Lin, C.-H., Tsai, I.-L. and Kuo, C.-H. **2022**, Development of an efficient mAb quantification assay by LC-MS/MS using rapid on-bead digestion, *Analytica Chimica Acta*, (1193), 339319.
- [189] Guo, X., Fillmore, T.L., Gao, Y. and Tang, K. **2016**, Capillary Electrophoresis–Nanoelectrospray Ionization–Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry via a True Sheathless Metal-Coated Emitter Interface for Robust and High-Sensitivity Sample Quantification, *Analytical Chemistry*, *8* (88), 4418–4425.
- [190] Faserl, K., Kremser, L., Müller, M., Teis, D. and Lindner, H.H. **2015**, Quantitative Proteomics Using Ultralow Flow Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, *9* (87), 4633–4640.
- [191] Ni, W., Dai, S., Karger, B.L. and Zhou, Z.S. **2010**, Analysis of Isoaspartic Acid by Selective Proteolysis with Asp-N and Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, *17* (82), 7485–7491.
- [192] Vatsa, S. **2022**, In silico prediction of post-translational modifications in therapeutic antibodies, *mAbs*, *1* (14), 2023938.
- [193] Pisupati, K. *et al.* **2017**, Biosimilarity under stress: A forced degradation study of Remicade® and Remsimab™, *mAbs*, *7* (9), 1197–1209.
- [194] Reichert, J.M. **2012**, Marketed therapeutic antibodies compendium, *mAbs*, *3* (4), 413–415.
- [195] Kaplon, H., Crescioli, S., Chenoweth, A., Visweswaraiiah, J. and Reichert, J.M. **2023**, Antibodies to watch in 2023, *mAbs*, *1* (15), 2153410.
- [196] Peng, X. *et al.* **2015**, Development and Validation of LC–MS/MS Method for the Quantitation of Infliximab in Human Serum, *Chromatographia*, *7–8* (78), 521–531.
- [197] El Amrani, M., Donners, A.A.M., Hack, C.E., Huitema, A.D.R. and van Maarseveen, E.M. **2019**, Six-step workflow for the quantification of therapeutic monoclonal antibodies in biological matrices with liquid chromatography mass spectrometry – A tutorial, *Analytica Chimica Acta*, (1080), 22–34.
- [198] Faserl, K., Sarg, B., Gruber, P. and Lindner, H.H. **2018**, Investigating capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of common post-translational modifications, *Electrophoresis*, *9–10* (39), 1208–1215.
- [199] Pieper, R. *et al.* **2003**, The human serum proteome: Display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins, *Proteomics*, *7* (3), 1345–1364.
- [200] Hagman, C., Ricke, D., Ewert, S., Bek, S., Falchetto, R. and Bitsch, F. **2008**, Absolute Quantification of Monoclonal Antibodies in Biofluids by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, *4* (80), 1290–1296.
- [201] Huse, K., Böhme, H.-J. and Scholz, G.H. **2002**, Purification of antibodies by affinity chromatography, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *3* (51), 217–231.
- [202] Kleinnijenhuis, A.J., Ingola, M., Toersche, J.H., van Holthoon, F.L. and van Dongen, W.D. **2016**, Quantitative bottom up analysis of infliximab in serum using protein A purification and integrated μ LC-electrospray chip IonKey MS/MS technology, *Bioanalysis*, *9* (8), 891–904.
- [203] Gou, M.-J., Nys, G., Cobraiville, G., Demelenne, A., Servais, A.-C. and Fillet, M. **2020**, Hyphenation of capillary zone electrophoresis with mass spectrometry for proteomic analysis: Optimization and comparison of two coupling interfaces, *Journal of Chromatography A*, (1618), 460873.
- [204] Naghdi, E., Moran, G.E., Reinau, M.E., De Malsche, W. and Neusüß, C. **2023**, Concepts and recent advances in microchip electrophoresis coupled to mass spectrometry: Technologies and applications, *Electrophoresis*, *1–2* (44), 246–267.
- [205] Hirayama, A., Abe, H., Yamaguchi, N., Tabata, S., Tomita, M. and Soga, T. **2018**, Development of a sheathless CE-ESI-MS interface, *Electrophoresis*, *11* (39), 1382–1389.
- [206] Reinert, T., Beck, A., Houzé, P., Gahoual, R. and Francois, Y.-N. **2022**, CE-MS methods for the characterization of monoclonal antibodies, in *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Proteomics and Metabolomics*. Wiley-Ramautar, R. & Chen, D. D. Y., 281–312.
- [207] Present, D.H., Mayer, L. and Braakman, T. **1999**, Infliximab for the Treatment of Fistulas in Patients with Crohn’s Disease, *The New England Journal of Medicine*, *8*.

- [208] Batot, C. **2004**, *Evaluation de l'efficacité structurale d'un anticorps monoclonal anti-tnfalpha, l'infliximab, dans la polyarthrite rhumatoïde*. Thèse en médecine. Université de Nancy.
- [209] Pino, L.K., Searle, B.C., Bollinger, J.G., Nunn, B., MacLean, B. and MacCoss, M.J. **2020**, The Skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics, *Mass Spectrometry Reviews*, 3 (39), 229–244.
- [210] Gonzalez-Quintela, A., Alende, R., Gude, F., Campos, J., Rey, J., Meijide, L.M., Fernandez-Merino, C. and Vidal, C. **2008**, Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities: Serum immunoglobulin levels in adults, *Clinical & Experimental Immunology*, 1 (151), 42–50.
- [211] Liang, S. *et al.* **2013**, Structural Basis for Treating Tumor Necrosis Factor α (TNF α)-associated Diseases with the Therapeutic Antibody Infliximab, *Journal of Biological Chemistry*, 19 (288), 13799–13807.
- [212] Patton, A., Mullenix, M.C., Swanson, S.J. and Koren, E. **2005**, An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen, *Journal of Immunological Methods*, 1–2 (304), 189–195.
- [213] Burich, M.A., AuBuchon, J.P. and Anderson, H.J. **1986**, Evaluation of rapid antibody dissociation techniques, *Immunohematology*, 4 (2), 76–80.
- [214] Shukla, D., Zamolo, L., Cavallotti, C. and Trout, B.L. **2011**, Understanding the Role of Arginine as an Eluent in Affinity Chromatography via Molecular Computations, *The Journal of Physical Chemistry B*, 11 (115), 2645–2654.
- [215] Roberts, C.J. **2014**, Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control, *Trends in Biotechnology*, 7 (32), 372–380.
- [216] Joshi, V., Shivach, T., Kumar, V., Yadav, N. and Rathore, A. **2014**, Avoiding antibody aggregation during processing: Establishing hold times, *Biotechnology Journal*, 9 (9), 1195–1205.
- [217] Kailemia, M.J., Ruhaak, L.R., Lebrilla, C.B. and Amster, I.J. **2014**, Oligosaccharide Analysis by Mass Spectrometry: A Review of Recent Developments, *Analytical Chemistry*, 1 (86), 196–212.
- [218] Patel, K. and Borchardt, R.T. **1990**, Chemical pathways of peptide degradation. III. Effect of primary sequence on the pathways of deamidation of asparaginyl residues in hexapeptides, *Pharmaceutical Research*, 8 (07), 787–793.
- [219] Kato, K., Nakayoshi, T., Kurimoto, E. and Oda, A. **2020**, Mechanisms of Deamidation of Asparagine Residues and Effects of Main-Chain Conformation on Activation Energy, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (21), 7035.
- [220] Kim, Y., Yeo, I., Kim, H., Son, M. and Kim, Y. **2020**, Preparation of Tissue Samples for Large-scale Quantitative Mass Spectrometric Analysis, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4 (25), 551–561.
- [221] Ren, D., Pipes, G.D., Liu, D., Shih, L.-Y., Nichols, A.C., Treuheit, M.J., Brems, D.N. and Bondarenko, P.V. **2009**, An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins, *Analytical Biochemistry*, 1 (392), 12–21.
- [222] Kawasue, S., Sakaguchi, Y., Koga, R., Yoshida, H. and Nohta, H. **2020**, Assessment method for deamidation in proteins using carboxylic acid derivatization-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (181), 113095.
- [223] Lu, L. *et al.* **2022**, In vitro/in vivo degradation analysis of trastuzumab by combining specific capture on HER2 mimotope peptide modified material and LC-QTOF-MS, *Analytica Chimica Acta*, (1225), 340199.
- [224] Colombel, J.F. *et al.* **2010**, Infliximab, Azathioprine, or Combination Therapy for Crohn's Disease, *New England Journal of Medicine*, 15 (362), 1383–1395.
- [225] Neurath, M.F. **2014**, Cytokines in inflammatory bowel disease, *Nature Reviews Immunology*, 5 (14), 329–342.
- [226] Balkwill, F. **2009**, Tumour necrosis factor and cancer, *c a n c e r*, 11.
- [227] Van Deventer, S.J. **1997**, Tumour necrosis factor and Crohn's disease., *Gut*, 4 (40), 443–448.
- [228] Adegbola, S.O., Sahnan, K., Warusavitarne, J., Hart, A. and Tozer, P. **2018**, Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease, *International Journal of Molecular Sciences*, 8 (19), 2244.
- [229] Sandborn, W.J. *et al.* **2001**, Etanercept for active Crohn's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Gastroenterology*, 5 (121), 1088–1094.

- [230] D’Haens, G. *et al.* **2018**, Increasing Infliximab Dose Based on Symptoms, Biomarkers, and Serum Drug Concentrations Does Not Increase Clinical, Endoscopic, and Corticosteroid-Free Remission in Patients With Active Luminal Crohn’s Disease, *Gastroenterology*, 5 (154), 1343-1351.e1.
- [231] Hanauer, S.B. *et al.* **2002**, Maintenance infliximab for Crohn’s disease: the ACCENT I randomised trial, *The Lancet*, (359), 9.
- [232] Mitoma, H. *et al.* **2008**, Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor α -expressing cells: Comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab, *Arthritis & Rheumatism*, 5 (58), 1248–1257.
- [233] Oude Munnink, T., Henstra, M., Segerink, L., Movig, K. and Brummelhuis-Visser, P. **2016**, Therapeutic drug monitoring of monoclonal antibodies in inflammatory and malignant disease: Translating TNF- α experience to oncology, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 4 (99), 419–431.
- [234] Filip, B., Maja, N., Severine, V., Gert, V.A., Geert, D.H., An, C. and Paul, R. **2003**, Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn’s Disease, *The New England Journal of Medicine*, 8.
- [235] Gupta, S., Jiskoot, W., Schöneich, C. and Rathore, A.S. **2022**, Oxidation and Deamidation of Monoclonal Antibody Products: Potential Impact on Stability, Biological Activity, and Efficacy, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4 (111), 903–918.
- [236] Lux, A., Yu, X., Scanlan, C.N. and Nimmerjahn, F. **2013**, Impact of Immune Complex Size and Glycosylation on IgG Binding to Human Fc γ Rs, *The Journal of Immunology*, 8 (190), 4315–4323.
- [237] Shinkawa, T. *et al.* **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, *Journal of Biological Chemistry*, 5 (278), 3466–3473.
- [238] Dashivets, T., Stracke, J., Dengl, S., Knaupp, A., Pollmann, J., Buchner, J. and Schlothauer, T. **2016**, Oxidation in the complementarity-determining regions differentially influences the properties of therapeutic antibodies, *mAbs*, 8 (8), 1525–1535.
- [239] Steenholdt, C., Bendtzen, K., Brynskov, J., Thomsen, O.Ø. and Ainsworth, M.A. **2014**, Clinical Implications of Measuring Drug and Anti-Drug Antibodies by Different Assays When Optimizing Infliximab Treatment Failure in Crohn’s Disease: Post Hoc Analysis of a Randomized Controlled Trial, *American Journal of Gastroenterology*, 7 (109), 1055–1064.
- [240] Dodig, S. **2009**, Interferences in quantitative immunochemical methods, *Biochimica Medica*, 50–62.
- [241] Saracevic, A., Dukic, L. and Simundic, A.-M. **2019**, Haemolysis and lipemia interfere with resistin and myeloperoxidase BioVendor ELISA assays, *Biochimica medica*, 2 (29), 315–321.
- [242] Rosenkvist, J. and Dybkjaer, E. **1990**, False negative results in anti-HIV ELISA due to insufficient antigen coating of microtitre plates, *Medical Laboratory Sciences*, 4 (47), 353–355.
- [243] Bensimon, A., Heck, A.J.R. and Aebersold, R. **2012**, Mass Spectrometry–Based Proteomics and Network Biology, *Annual Review of Biochemistry*, 1 (81), 379–405.
- [244] Schubert, O.T., Röst, H.L., Collins, B.C., Rosenberger, G. and Aebersold, R. **2017**, Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research, *Nature Protocols*, 7 (12), 1289–1294.
- [245] Legrand, P., Dembele, O., Alamil, H., Lamoureux, C., Mignet, N., Houzé, P. and Gahoual, R. **2022**, Structural identification and absolute quantification of monoclonal antibodies in suspected counterfeits using capillary electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 8 (414), 2699–2712.
- [246] Haselberg, R., Ratnayake, C.K., de Jong, G.J. and Somsen, G.W. **2010**, Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins, *Journal of Chromatography A*, 48 (1217), 7605–7611.
- [247] Gosset-Erard, C., Giorgetti, J., Biacchi, M., Aubriet, F., Leize-Wagner, E., Chaimbault, P. and François, Y.-N. **2022**, Protocol for Etching Bare-Fused Silica Capillaries for Sheathless Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry Coupling, in C. Neustüß and K. Jooß (eds) *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. New York, NY: Springer US (Methods in Molecular Biology), 49–59.

- [248] Mitchell, R.A., Shuster, C., Shahidi, N., Galorport, C., DeMarco, M.L., Rosenfeld, G., Enns, R.A. and Bressler, B. **2016**, The Utility of Infliximab Therapeutic Drug Monitoring among Patients with Inflammatory Bowel Disease and Concerns for Loss of Response: A Retrospective Analysis of a Real-World Experience, *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, (2016), 1–7.
- [249] Tian, G., Wu, Y., Jin, X., Zeng, Z., Gu, X., Li, T., Chen, X., Li, G. and Liu, J. **2022**, The incidence rate and influence factors of hemolysis, lipemia, icterus in fasting serum biochemistry specimens, *Plos One*. Edited by C. Johnson, *1* (17), e0262748.
- [250] Pisupati, K. *et al.* **2017**, A Multidimensional Analytical Comparison of Remicade and the Biosimilar Remsima, *Analytical Chemistry*, *9* (89), 4838–4846.
- [251] Walsh, G. and Jefferis, R. **2006**, Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins, *Nature Biotechnology*, *10* (24), 1241–1252.
- [252] Freeman, K. *et al.* **2016**, Clinical effectiveness and cost-effectiveness of use of therapeutic monitoring of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) inhibitors [LISA-TRACKER® enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, TNF- α -Blocker ELISA kits and Promonitor® ELISA kits] versus standard care in patients with Crohn’s disease: systematic reviews and economic modelling, *Health Technology Assessment*, *83* (20), 1–288.
- [253] Willrich, M.A.V., Murray, D.L., Barnidge, D.R., Ladwig, P.M. and Snyder, M.R. **2015**, Quantitation of infliximab using clonotypic peptides and selective reaction monitoring by LC-MS/MS, *International Immunopharmacology*, *1* (28), 513–520.
- [254] Lee, C., Jeong, M., Lee, J.J., Seo, S., Cho, S.C., Zhang, W. and Jaquez, O. **2017**, Glycosylation profile and biological activity of Remicade® compared with Flixabi® and Remsima®, *mAbs*, *6* (9), 968–977.
- [255] Millán-Martín, S. **2018**, Comparability study for the determination of post-translational modifications of infliximab innovator and biosimilars by automated high-throughput peptide mapping analysis, Thermoscientific, Application note 21850
- [256] Dick, L.W., Mahon, D., Qiu, D. and Cheng, K.-C. **2009**, Peptide mapping of therapeutic monoclonal antibodies: Improvements for increased speed and fewer artifacts, *Journal of Chromatography B*, *3* (877), 230–236.
- [257] Zimmerman, D.W. **2004**, A note on preliminary tests of equality of variances, *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, *1* (57), 173–181.
- [258] Goetze, A.M., Liu, Y.D., Zhang, Z., Shah, B., Lee, E., Bondarenko, P.V. and Flynn, G.C. **2011**, High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans, *Glycobiology*, *7* (21), 949–959.
- [259] Collin, M. and Davison, S. **2019**, Brevetabilité d’un anticorps: Évolution des règles et des pratiques et perspectives, *médecine/sciences*, *12* (35), 1175–1181.
- [260] Mulcahy, A.W., Predmore, Z. and Matke, S. **2014**, The Cost Savings Potential of Biosimilar Drugs in the United States, *Perspective Rand Corporation*. Available at : <http://api.semanticscholar.org/CorpusID:2217939>
- [261] Food Drug Adm FDA **1999**, *Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological Biological Products*. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q6b-specifications-test-procedures-and-acceptance-criteria-biotechnologicalbiological-products> (Accessed: 11 July 2023).
- [262] Douez, E., D’Atri, V., Guillaume, D., Antier, D., Guerriaud, M., Beck, A., Watier, H. and Foucault-Fruchard, L. **2023**, Why is there no biosimilar of Eribix®?, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (234), 115544.
- [263] Jung, S.K. *et al.* **2014**, Physicochemical characterization of Remsima®, *mAbs*, *5* (6), 1163–1177.
- [264] Luo, Q., Joubert, M.K., Stevenson, R., Ketchem, R.R., Narhi, L.O. and Wypych, J. **2011**, Chemical modifications in therapeutic protein aggregates generated under different stress conditions, *The Journal of Biological Chemistry*, *28* (286), 25134–25144.
- [265] Hawe, A., Wiggenhorn, M., van de Weert, M., Garbe, J.H.O., Mahler, H.-C. and Jiskoot, W. **2012**, Forced degradation of therapeutic proteins, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *3* (101), 895–913.
- [266] Yang, N., Tang, Q., Hu, P. and Lewis, M.J. **2018**, Use of In Vitro Systems To Model In Vivo Degradation of Therapeutic Monoclonal Antibodies, *Analytical Chemistry*, *13* (90), 7896–7902.
- [267] Chung, S. *et al.* **2012**, Quantitative evaluation of fucose reducing effects in a humanized antibody on Fc γ receptor binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity activities, *mAbs*, *3* (4), 326–340.

- [268] World Health Org WHO **2022**, *Guidelines on evaluation of biosimilars*. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/guidelines-on-evaluation-of-biosimilars> (Accessed: 11 July 2023).
- [269] Legrand, P., Dufaj, S., Mignet, N., Houzé, P. and Gahoual, R. **2023**, Modeling study of long-term stability of the monoclonal antibody infliximab and biosimilars using liquid-chromatography–tandem mass spectrometry and size-exclusion chromatography–multi-angle light scattering, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1 (415), 179–192.
- [270] Reinert, T., Gahoual, R., Mignet, N., Kulus, A., Allez, M., Houzé, P. and François, Y.-N. **2023**, Simultaneous quantification and structural characterization of monoclonal antibodies after administration using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (233), 115446.
- [271] Chen, M. and Cook, K.D. **2007**, Oxidation Artifacts in the Electrospray Mass Spectrometry of A β Peptide, *Analytical Chemistry*, 5 (79), 2031–2036.
- [272] Kirikoshi, R., Manabe, N. and Takahashi, O. **2017**, Succinimide Formation from an NGR-Containing Cyclic Peptide: Computational Evidence for Catalytic Roles of Phosphate Buffer and the Arginine Side Chain, *International Journal of Molecular Sciences*, 2 (18), 429.
- [273] Kirikoshi, R., Manabe, N. and Takahashi, O. **2018**, Phosphate-Catalyzed Succinimide Formation from Asp Residues: A Computational Study of the Mechanism, *International Journal of Molecular Sciences*, 2 (19), 637.
- [274] Lerch, T.F. *et al.* **2017**, Infliximab crystal structures reveal insights into self-association, *mAbs*, 5 (9), 874–883.
- [275] Abo El Maaty, M.I., Abo-Elkhier, M.M. and Abd Elwahaab, M.A. **2010**, 3D graphical representation of protein sequences and their statistical characterization, *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 21 (389), 4668–4676.
- [276] Baker, M.P. and Jones, T.D. **2007**, Identification and removal of immunogenicity in therapeutic proteins, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2 (10), 219–227.
- [277] Prado, M.S., Bendtzen, K. and Andrade, L.E.C. **2017**, Biological anti-TNF drugs: immunogenicity underlying treatment failure and adverse events, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 9 (13), 985–995.
- [278] Murdaca, G., Negrini, S., Greco, M., Schiavi, C., Giusti, F., Borro, M. and Puppo, F. **2019**, Immunogenicity of infliximab and adalimumab, *Expert Opinion on Drug Safety*, 5 (18), 343–345.
- [279] Eur Med Agency EMA **2017**, Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins. Available at: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-immunogenicity-assessment-therapeutic-proteins-revision-1_en.pdf.
- [280] Joyce, A., Shea, C., You, Z., Gorovits, B. and Lepsy, C. **2022**, Determination of Anti-drug Antibody Affinity in Clinical Study Samples Provides a Tool for Evaluation of Immune Response Maturation, *The AAPS Journal*, 6 (24), 114.
- [281] Svitel, J., Boukari, H., Van Ryk, D., Willson, R.C. and Schuck, P. **2007**, Probing the functional heterogeneity of surface binding sites by analysis of experimental binding traces and the effect of mass transport limitation, *Biophysical Journal*, 5 (92), 1742–1758.
- [282] Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L. and Goldberg, M.E. **1985**, Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of Immunological Methods*, 2 (77), 305–319.
- [283] Bobrovnik, S.A. **2003**, Determination of antibody affinity by ELISA. Theory, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 3 (57), 213–236.
- [284] Bobrovnik, S.A. **2000**, ELISA-based method for determining the affinity of bivalent antibodies of two specificities in a mixture, *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, 3 (72), 133–141.
- [285] Dai, S., Schantz, A., Clements-Egan, A., Cannon, M. and Shankar, G. **2014**, Development of a Method That Eliminates False-Positive Results due to Nerve Growth Factor Interference in the Assessment of Fulranumab Immunogenicity, *The AAPS Journal*, 3 (16), 464–477.
- [286] Hart, M.H., de Vrieze, H., Wouters, D., Wolbink, G.-J., Killestein, J., de Groot, E.R., Aarden, L.A. and Rispens, T. **2011**, Differential effect of drug interference in immunogenicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 1–2 (372), 196–203.
- [287] Rispens, T., Hart, M.H., Ooijevaar-de Heer, P., van Leeuwen, A., Vennegoor, A., Killestein, J., Wolbink, G.-J. and van der Kleij, D. **2013**, Drug interference in immunogenicity assays depends on valency, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (85), 179–185.

- [288] Zhong, Z.D., Dinnogen, S., Hokom, M., Ray, C., Weinreich, D., Swanson, S.J. and Chirmule, N. **2010**, Identification and inhibition of drug target interference in immunogenicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 1–2 (355), 21–28.
- [289] Refeyn **2022**, Characterization of protein interaction equilibria, *Application note*
- [290] Wu, D. and Piszczek, G. **2021**, Rapid Determination of Antibody-Antigen Affinity by Mass Photometry, *Journal of Visualized Experiments*, 168, 61784.
- [291] Soltermann, F., Foley, E.D.B., Pagnoni, V., Galpin, M., Benesch, J.L.P., Kukura, P. and Struwe, W.B. **2020**, Quantifying Protein–Protein Interactions by Molecular Counting with Mass Photometry, *Angewandte Chemie International Edition*, 27 (59), 10774–10779.
- [292] Wu, D. and Piszczek, G. **2020**, Measuring the affinity of protein-protein interactions on a single-molecule level by mass photometry, *Analytical Biochemistry*, (592), 113575.
- [293] Klasse, P.J. **2016**, How to assess the binding strength of antibodies elicited by vaccination against HIV and other viruses, *Expert Review of Vaccines*, 3 (15), 295–311.
- [294] Gorovits, B. **2020**, Current Considerations for Immunoglobulin Isotype Characterization of Antibody Response against Biotherapeutics, *The AAPS Journal*, 6 (22), 144.
- [295] Underwood, P.A. **1993**, Problems and pitfalls with measurement of antibody affinity using solid phase binding in the ELISA, *Journal of Immunological Methods*, 1 (164), 119–130.
- [296] El Amrani, M., Göbel, C., Egas, A.C., Nierkens, S., Hack, C.E., Huitema, A.D.R. and van Maarseveen, E.M. **2019**, Quantification of neutralizing anti-drug antibodies and their neutralizing capacity using competitive displacement and tandem mass spectrometry: Infliximab as proof of principle, *Journal of Translational Autoimmunity*, (1), 100004.
- [297] Lipsky, P.E. *et al.* **2000**, Infliximab and Methotrexate in the Treatment of Rheumatoid Arthritis, *New England Journal of Medicine*, 22 (343), 1594–1602.
- [298] Vande Casteele, N. *et al.* **2015**, The relationship between infliximab concentrations, antibodies to infliximab and disease activity in Crohn’s disease, *Gut*, 10 (64), 1539–1545.
- [299] de Vries, M.K., Wolbink, G.J., Stapel, S.O., de Vrieze, H., van Denderen, J.C., Dijkmans, B.A.C., Aarden, L.A. and van der Horst-Bruinsma, I.E. **2007**, Decreased clinical response to infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with anti-infliximab formation, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 9 (66), 1252–1254.
- [300] Cassinotti, A. and Travis, S. **2009**, Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn’s disease: A critical systematic review, *Inflammatory Bowel Diseases*, 8 (15), 1264–1275.
- [301] Papamichael, K. *et al.* **2019**, Appropriate Therapeutic Drug Monitoring of Biologic Agents for Patients With Inflammatory Bowel Diseases, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9 (17), 1655-1668.e3.
- [302] Feuerstein, J.D. *et al.* **2017**, American Gastroenterological Association Institute Guideline on Therapeutic Drug Monitoring in Inflammatory Bowel Disease, *Gastroenterology*, 3 (153), 827–834.
- [303] Ternant, D., Mulleman, D., Degenne, D., Willot, S., Guillaumin, J.-M., Watier, H., Goupille, P. and Paintaud, G. **2006**, An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Infliximab, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2 (28), 169–174.
- [304] Kopylov, U. *et al.* **2012**, Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies:, *Inflammatory Bowel Diseases*, 9 (18), 1628–1633.
- [305] Beeg, M. *et al.* **2019**, A Surface Plasmon Resonance-based assay to measure serum concentrations of therapeutic antibodies and anti-drug antibodies, *Scientific Reports*, 1 (9), 2064.
- [306] Beeg, M., Burti, C., Allocati, E., Cifardini, C., Banzi, R., Nobili, A., Caprioli, F., Garattini, S. and Gobbi, M. **2021**, Surface plasmon resonance unveils important pitfalls of enzyme-linked immunoassay for the detection of anti-infliximab antibodies in patients’ sera, *Scientific Reports*, 1 (11), 14976.
- [307] Shibata, H., Nishimura, K., Miyama, C., Tada, M., Suzuki, T., Saito, Y. and Ishii-Watabe, A. **2018**, Comparison of different immunoassay methods to detect human anti-drug antibody using the WHO erythropoietin antibody reference panel for analytes, *Journal of Immunological Methods*, (452), 73–77.

- [308] Wang, S.-L., Ohrmund, L., Hauenstein, S., Salbato, J., Reddy, R., Monk, P., Lockton, S., Ling, N. and Singh, S. **2012**, Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum, *Journal of Immunological Methods*, 1–2 (382), 177–188.
- [309] Farçaş, E., Hanson, J., Pochet, L. and Fillet, M. **2018**, Capillary electrophoretic mobility shift displacement assay for the assessment of weak drug-protein interactions, *Analytica Chimica Acta*, (1034), 214–222.
- [310] Hernández-Breijo, B. *et al.* **2016**, Standardization of the homogeneous mobility shift assay protocol for evaluation of anti-infliximab antibodies. Application of the method to Crohn’s disease patients treated with infliximab, *Biochemical Pharmacology*, (122), 33–41.
- [311] Jani, M., Isaacs, J.D., Morgan, A.W., Wilson, A.G., Plant, D., Hyrich, K.L., Chinoy, H. and Barton, A. **2016**, Detection of anti-drug antibodies using a bridging ELISA compared with radioimmunoassay in adalimumab-treated rheumatoid arthritis patients with random drug levels, *Rheumatology*, 11 (55), 2050–2055.
- [312] Steenholdt, C., Bendtzen, K., Brynskov, J., Thomsen, O.Ø. and Ainsworth, M.A. **2011**, Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn’s disease, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 3 (46), 310–318.
- [313] Pękala, A., Filip, R. and Aebisher, D. **2021**, Anti-Drug Antibodies in Patients with Inflammatory Bowel Diseases Treated with Biosimilar Infliximab: A Prospective Cohort Study, *Journal of Clinical Medicine*, 12 (10), 2653.
- [314] Kosmač, M., Avčín, T., Toplak, N., Simonini, G., Cimaz, R. and Šerbec, V.Č. **2011**, Exploring the Binding Sites of Anti-Infliximab Antibodies in Pediatric Patients With Rheumatic Diseases Treated With Infliximab, *Pediatric Research*, 3 (69), 243–248.
- [315] Svenson, M., Geborek, P., Saxne, T. and Bendtzen, K. **2007**, Monitoring patients treated with anti-TNF-biopharmaceuticals: assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies, *Rheumatology*, 12 (46), 1828–1834.
- [316] Harding, F.A., Stickler, M.M., Razo, J. and DuBridge, R. **2010**, The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions, *mAbs*, 3 (2), 256–265.
- [317] Van Beers, M.M.C. and Bardor, M. **2012**, Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins, *Biotechnology Journal*, 12 (7), 1473–1484.
- [318] Harris, R.J. **2005**, Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function, *Developments in Biologicals*, (122), 117–127.
- [319] Rosenberg, A.S. **2006**, Effects of protein aggregates: An immunologic perspective, *The AAPS Journal*, 3 (8), E501–E507.
- [320] Sauerborn, M., Brinks, V., Jiskoot, W. and Schellekens, H. **2010**, Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2 (31), 53–59.

LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS AVEC COMITÉ DE LECTURE

1. Reinert, T., Houzé P., Mignet, N., Francois, Y., Gahoual, R., Post-translational modifications comparative identification and kinetic study of infliximab innovator and biosimilars in serum using capillary electrophoresis tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2023**, 234, 115541, doi: [10.1016/j.jpba.2023.115541](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115541)
2. Reinert, T., Gahoual, R., Mignet, N., Kulus, A., Allez, M., Houzé P., Francois, Y. Simultaneous quantification and structural characterization of monoclonal antibodies after administration using capillary zone electrophoresis tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2023**, 233, 115446, doi: [10.1016/j.jpba.2023.115446](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115446)

CHAPITRE DE LIVRE

1. Reinert, T., Beck, A., Houzé, P., Gahoual, R. & Francois, Y. CE-MS Methods for the Characterization of Monoclonal Antibodies. in *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Proteomics and Metabolomics* (eds. Ramautar, R. & Chen, D. D. Y.) (Wiley, 2022), 281–312 doi:[10.1002/9783527833092.ch11](https://doi.org/10.1002/9783527833092.ch11).

COMMUNICATIONS ORALES

1. **Auteurs** : Tessa Reinert, Pascal Houzé, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *Structural modifications of a monoclonal antibody after administration to patients using CE-MS/MS*
Congrès : Journée de l'UMR 7140, Université de Strasbourg, Strasbourg, 28 avril 2023
2. **Auteurs** : Tessa Reinert, Pascal Houzé, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *Quantification simultanée d'infliximab et d'anticorps anti-infliximab dans du sérum par CE-MS/MS*
Congrès : Congrès Francophone des sciences séparatives SEP23, Paris, 30 mars 2023

3. **Auteurs :** Tessa Reinert, Pascal Houzé, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *Quantification and structural characterization of infliximab by CE-ESI-MS/MS in biological samples*
Congrès : Journée scientifique groupe thématique électrophorèse capillaire de l’Afsep et SCIEX, Paris, 18 octobre 2022

4. **Auteurs :** Tessa Reinert, Pascal Houzé, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *Etude cinétique des modifications structurales d'infliximab après administration aux patients par CE-MS/MS*
Congrès : Analytics, Nantes, 8 septembre 2022

5. **Auteurs :** Tessa Reinert, Pascal Houzé, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *Development of a CZE-ESI-MS/MS method for the study of Infliximab in a biological environment*
Congrès : International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis (MSB), Liège, 5 juillet 2022

6. **Auteurs :** Tessa Reinert, Pascal Houzé, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *Quantification et caractérisation structurale de l'infliximab dans des échantillons biologiques par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse*
Congrès : Congrès Francophone des sciences séparatives SEP21, Paris, 7 octobre 2021

7. **Auteurs :** Tessa Reinert, Pascal Houzé, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *CZE-ESI-MS/MS method for the study of Infliximab in biological environment*
Congrès : Journée de l’UMR 7140, Université de Strasbourg, distanciel, 10 juin 2020

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

1. **Auteurs :** Tessa Reinert, Pascal Houzé, Aynur Naghizade, Sarah Cianferani, Oscar Hernandez-Alba, Yannis-Nicolas Francois, Rabah Gahoual
Titre : *Quantification of anti-infliximab antibodies in human serum using capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry*
Congrès : American Society for Mass Spectrometry (ASMS), Houston, 6 juin 2023

2. **Auteurs :** Tessa Reinert, Pascal Houzé, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *Etude cinétique des modifications structurales d'infliximab après administration aux patients par CE-MS/MS*
Congrès : Congrès Francophone des sciences séparatives SEP23, Paris, 30 mars 2023

3. **Auteurs :** Tessa Reinert, Pascal Houzé, Alexandre Kulus, Rabah Gahoual, Yannis Francois
Titre : *Absolute quantification and structural characterization of infliximab in serum using capillary electrophoresis-mass spectrometry*
Congrès : American Society for Mass Spectrometry (ASMS), Minneapolis, 6 juin 2022

ENSEIGNEMENTS DÉLIVRÉS

Année universitaire 2020 – 2021 (64 HETD)

- Travaux dirigés module « méthodes de chimie organique et inorganique » (niveau Licence 2)
- Travaux dirigés module « méthodes de la chimie physique et analytique » (niveau Licence 2)
- Travaux dirigés module « chimie analytique » (niveau Licence 3)

Année universitaire 2021 – 2022 (64 HETD)

- Travaux dirigés module « chromatographie et spectrométrie de masse » (niveau Licence 3)
- Travaux dirigés module « méthodes de la chimie physique et analytique » (niveau Licence 2)
- Travaux dirigés module « chimie analytique » (niveau Licence 3)

Année universitaire 2022 – 2023(64 HETD)

- Travaux dirigés module « chromatographie et spectrométrie de masse » (niveau Licence 3)
- Travaux dirigés module « chimie analytique » (niveau Licence 3)

AUTRES RESPONSABILITÉS

Co-encadrement de deux stagiaires de M2 de février à juin 2022

Co-encadrement d'une stagiaire de M2 de février à juin 2023

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des peptides de l'infliximab après digestion tryptique

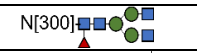




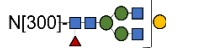


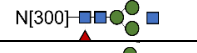
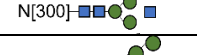
Chaîne lourde (heavy chain HC)

HC01 = EVK
 HC02 = LEESGGGLVQPGGSMK
 HC03 = LSCVASGFIFSNHWMNWVR
 HC04 = QSPEK
 HC05 = GLEWVAEIR
 HC06 = SK
 HC07 = SINSATHYAESVK
 HC08 = GR
 HC09 = FTISR
 HC10 = DDSK
 HC11 = SAVYLQMTDLR
 HC12 = TEDTGVYYCSR
 HC13 =
 NYYGSTYDYWGQGTTLTVSSASTK
 HC14 = GPSVFPLAPSSK
 HC15 = STSGGTAALGCLVK
 HC16 = DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNTK (1mis)
 HC17 = VDK
 HC18 = K
 HC19 = VEPK
 HC20 = SCDK
 HC21 =
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK(1mis)
 HC22 = DTLMISR
 HC23 = TPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 HC24 = FNWYVDGVEVHNAK
 HC25 = TKPR
 HC26 = EEQYNSTYR
 HC27 = VVSVLTVLHQDWLNGK
 HC28 = EYK
 HC29 = CK
 HC30 = VSNK
 HC31 = ALPAIEK
 HC32 = TISK
 HC33 = AK
 HC34 = GQPR
 HC35 = EPQVYTLPPSR
 HC36 = DELTK
 HC37 = NQVSLTCLVK
 HC38 = GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 HC39 = TPPVLDSDGSFFLYSK
 HC40 = LTVDK
 HC41 = SR
 HC42 =
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
 HC43 = LSLSPG

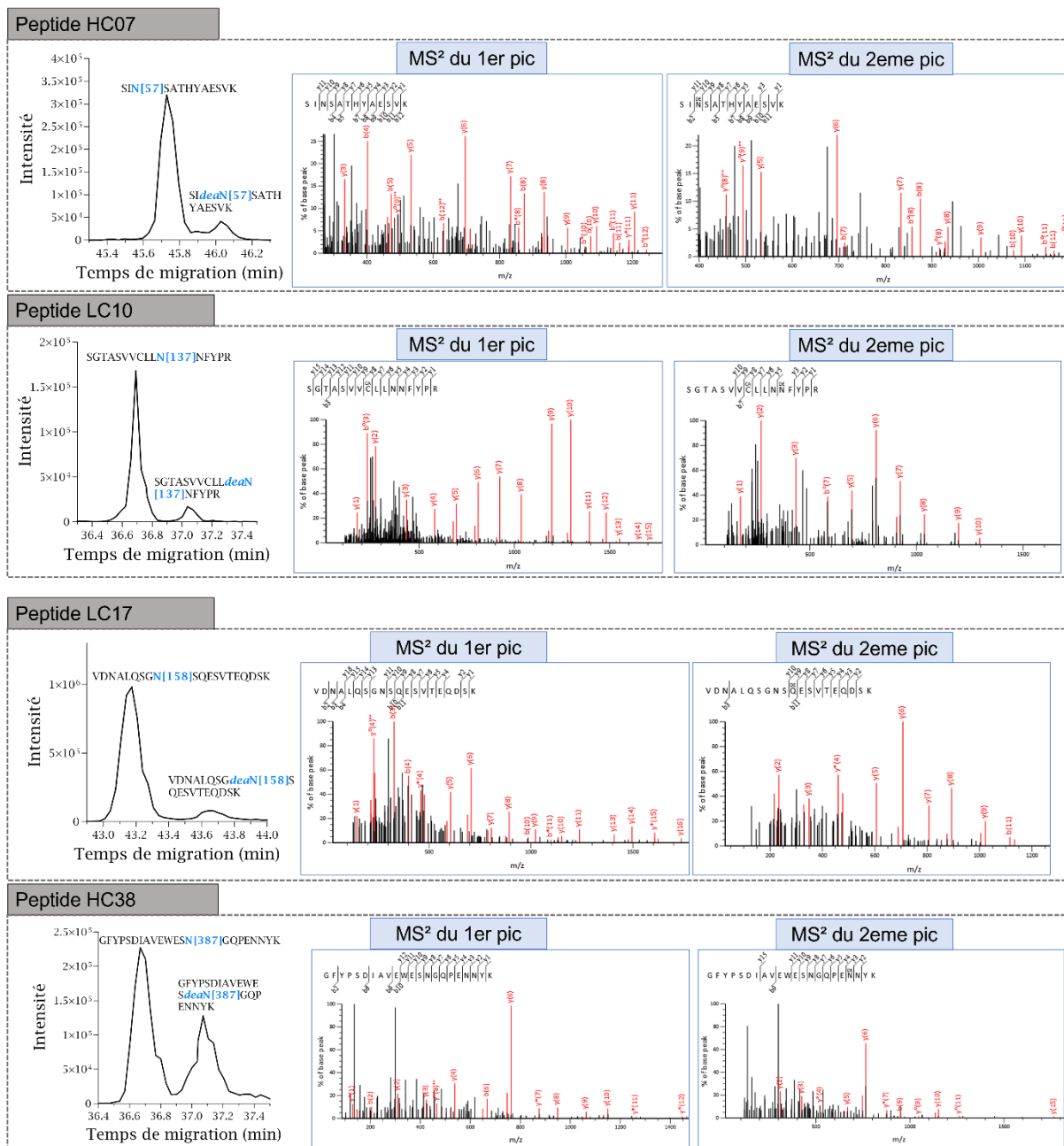
Chaîne légère (light chain LC)

LC01 = DILLTQSPAILSVPGER
 LC02 = VSFSCR
 LC03 = ASQFVGSSIHWHYQQR
 LC04 = TNGSPR
 LC05 = LLIK
 LC06 = YASEMSGIPSR
 LC07 = FSGSGSGTDFTLISINTVESEDIA
 DYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVK
 LC08 = R
 LC09 = TVAAPSVFIFPPSDEQLK
 LC10 = SGTASVCLLNIFYPRK
 LC11 = EAK
 LC12 = VQWK
 LC13 = VDNALQSGNSQESVTEQDSK
 LC14 = DSTYLSSTLTLSK
 LC15 = ADYEK
 LC16 = HK
 LC17 = VYACEVTHQGLSSPVTK
 LC18 = SFNRGEC
 LC19 = GECK

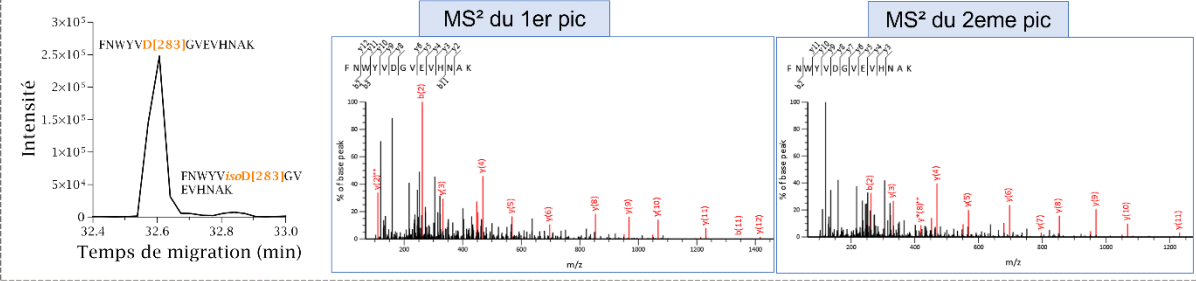
Annexe 2 : Liste des peptides et ions m/z correspondants suivis pour le développement de la caractérisation structurale d'infliximab, tous sont chargés deux fois.

Peptide	Configuration de l'acide aminé	Ion précurseur du peptide (m/z infliximab)	Ion précurseur du peptide (m/z SIL)		
HC07	N57 <i>dea</i> N57	703,849 704,341	707,856 708,348		
HC38	N387 <i>dea</i> N387	1272,569 1273,061	1276,576 1277,068		
LC10	N137 <i>dea</i> N137	899,451 899,947	904,455 904,947		
LC13	N158 <i>dea</i> N158	1068,488 1068,980	1072,495 1072,987		
HC24	D283 <i>iso</i> D283	839,405 839,405	843,405 843,405		
HC39	D404 <i>iso</i> D404	937,464 937,464	941,472 941,472		
HC02	M18 <i>oxi</i> M18	773,382 781,380	777,389 785,387		
HC11	M85 <i>oxi</i> M85	648,834 656,832	653,839 661,836		
HC22	M255 <i>oxi</i> M255	418,221 426,218	423,225 431,222		
HC26	<i>N300 + G0F</i>	1317,527	1322,531		<ul style="list-style-type: none">  Galactose  N-Acetylglucosamine  Mannose  Fucose
	<i>N300 + G1F</i>	1398,553	1403,557		
	<i>N300 + G2F</i>	1479,580	1484,584		
	<i>N300 + G0FN</i>	1215,987	1220,991		
	<i>N300 + G0N</i>	1142,958	1147,962		
	<i>N300 + M5</i>	1203,475	1208,475		

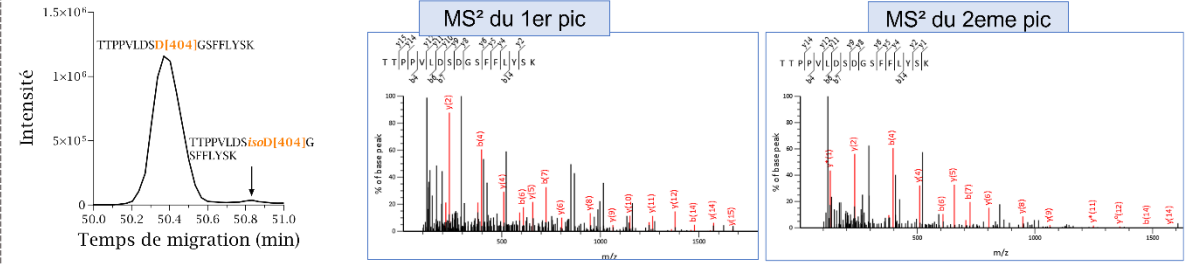
Annexe 3 : spectres MS/MS des principaux peptides (avec et sans PTM) étudiés au long du manuscrit. Spectres obtenus après analyse CE-MS/MS d'infliximab à $19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ issu de sérum. Rouge : ions observés correspondant à un fragment CID du peptide



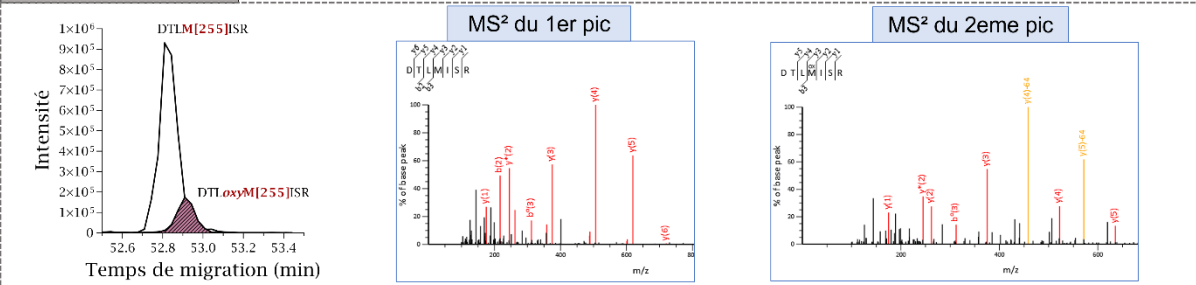
Peptide HC24



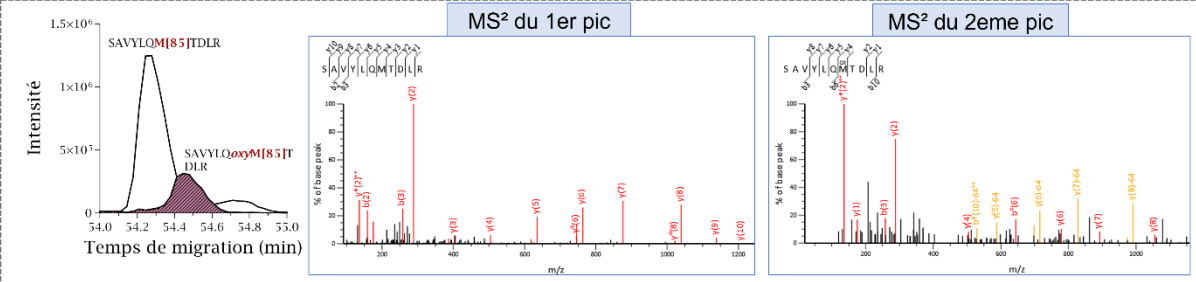
Peptide HC39



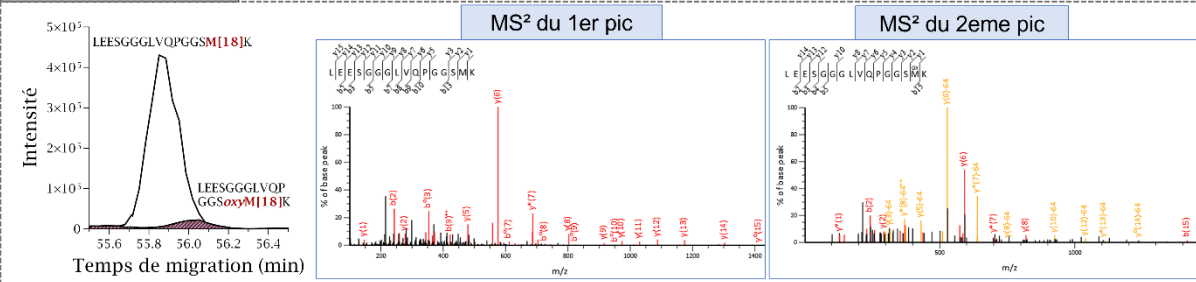
Peptide HC22




Peptide HC11



Peptide HC02



Annexe 4 : Poster présenté à l'ASMS 2022



Absolute quantification and structural characterization of infliximab in serum using Capillary electrophoresis–Mass spectrometry

Tessa REINERT^{1,2}, Pascal HOIZE^{1,3}, Alexandre KULIS¹, Rabah GAHOUAL¹, Yamis-Nicolas FRANÇOIS¹

¹Université de Strasbourg, Laboratoire de Chimie Analytique et de Chimie des Matériaux, 118 Route de l'Industrie, 67037 Strasbourg, France; ²Université de Strasbourg, Laboratoire de Chimie Analytique et de Chimie des Matériaux, 118 Route de l'Industrie, 67037 Strasbourg, France; ³Université de Strasbourg, Laboratoire de Chimie Analytique et de Chimie des Matériaux, 118 Route de l'Industrie, 67037 Strasbourg, France

Introduction

Infliximab is a monoclonal antibody (mAb) widely used for the treatment of chronic inflammatory diseases such as Crohn's disease. It targets TNF- α , a cytokine involved in inflammation, and has a serum half-life of approximately 70 days. To perform their clinical follow-up, analytical methods should be able to quantify the mAb activity in the serum of patients.

Post-Translational Modifications (PTMs) may occur during mAb lifetime. It has been demonstrated that some PTMs can impact the biological activity and clearance of a mAb. This highlights the necessity of having structural information of infliximab along with the concentration in a single analysis, to identify PTMs that impact its pharmacokinetic, and provide an advanced monitoring of Crohn's disease patients.

Here we demonstrate a method based on CE-MS/MS for simultaneous absolute quantification of infliximab in human serum and characterization of its primary structure through a bottom-up strategy.

CE-MS/MS conditions

- Transient isoelectrofocusing (T-IEF)
- Background Electrolyte: Acetic Acid 10%
- Leading Electrolyte: Ammonium acetate

CE-MS/MS quantification

Peptide selection

According to ESI-MS/MS guidelines, different parameters were tested for method validation.

- Logarithmic transformation improved the back-calculated concentration with biases systematically < 15%.
- LOQ: 0.36 ng/mL.
- Quantification not affected by freeze and thaw cycles of the samples (on and off 150 strong 1h in the autosampler).

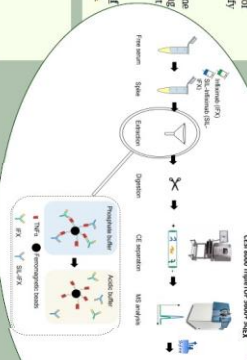
Method Validation

According to ESI-MS/MS guidelines, different parameters were tested for method validation.

- Logarithmic transformation improved the back-calculated concentration with biases systematically < 15%.
- LOQ: 0.36 ng/mL.
- Quantification not affected by freeze and thaw cycles of the samples (on and off 150 strong 1h in the autosampler).

CE-MS/MS method demonstrated successful validation regarding selectivity, accuracy and precision

Analytical workflow



Structural characterization

After separation of the different glycoforms by CE-pillar electrophoresis, mass spectrometry allows their identification by MS and MS/MS.

It is then possible to constitute a glycoform profile, which has been tested for repeatability over 2 series of triplicates (spiked serum at 12 ng/mL of infliximab).

PTMs separation

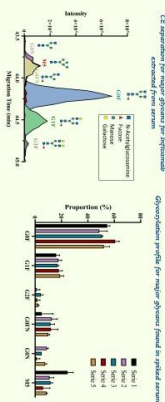
Ion extracted electropherograms obtained after purification from serum.

CE allows a good separation of the main mAb glycoforms.

Glycoform profile

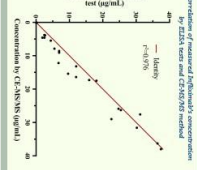
CE separation of major glycoforms performed by CE-pillar electrophoresis, mass spectrometry allows their identification by MS and MS/MS.

It is then possible to constitute a glycoform profile, which has been tested for repeatability over 2 series of triplicates (spiked serum at 12 ng/mL of infliximab).



Concentration by ELISA

Comparison of measured infliximab concentration by ELISA versus CE-MS/MS method.



Patients serum study

CE-MS/MS method was applied on 25 patients with Crohn's disease treated with infliximab.

- Observation of non consistent and unexpected matrix effects using ESI-MS/MS.
- PTMs horizons characterization of each patient was performed.

Conclusion

Quantification of infliximab in human serum using CE-MS/MS method was validated following FDA and EMA guidelines over the range 0.3-5382 ng/mL.

Presence of internal standard in the method allows absolute quantification and stability of the peptide ratio.

9 PTMs of interest were successfully observed, of which 6 were stable over 2 series, for concentration above 5 ng/mL.

References

1. J. L. H. Fraser et al., *The New England Journal of Medicine*, 1998, 239, 570-579.

2. J. L. H. Fraser et al., *The New England Journal of Medicine*, 1998, 239, 570-579.

3. J. L. H. Fraser et al., *The New England Journal of Medicine*, 1998, 239, 570-579.

Acknowledgements

• ANR funding of project Metabolika.

• Saint Louis Hospital for patients' serum donation.

• The SNRS and the ANRS for their interest to attend this meet.

Annexe 5 : Poster présenté à SEP2023

Etude cinétique des modifications structurales d'infliximab après administration aux patients par CE-MS/MS

Tessa REINERT^{1,2}, Pascal HOUZE^{2,3}, Rabah GAHOUAL², Yannis-Nicolas FRANÇOIS¹

¹ Université de Strasbourg / CNRS, UMR 7140 - CMC, Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes, 4 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, France
² Université Paris Cité, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), CNRS UMR8258, Inserm U1267, Faculté de sciences pharmaceutiques et biologiques, Paris, France
³ Laboratoire de Toxicologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris (France)



tessa.reinert@etu.unistra.fr



Introduction

Infliximab: anticorps monoclonal utilisé contre la maladie de Crohn

Administré périodiquement aux patients (temps de demi-vie ≈ 21 jours)

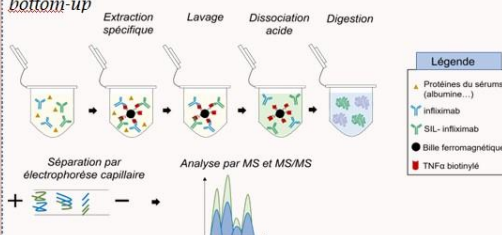
Modifications post-traductionnelles (PTMs): Modifications chimiques de la chaîne latérale de certains acides aminés.

PTMs peuvent affecter la bio activité de l'anticorps^{2,3}

Objectif: évaluer la cinétique de PTMs hotspots de l'infliximab *in vitro* et *in vivo*

Méthode

Le principe consiste à extraire de manière spécifique l'infliximab et son standard interne marqué (SIL-IFX) du sérum. Pour cela, on utilise l'antigène greffé à des billes ferromagnétiques. Analyse par stratégie *bottom-up*



Conditions CE-MS/MS

- CESI8000 et TTOF500
- Isotachophorèse transiente
- Electrolyte meneur: Acétate d'ammonium 100mM
- Electrolyte support: Acide acétique 10%
- Couplage: Shearless
- Source ESI
- Fragmentation CID

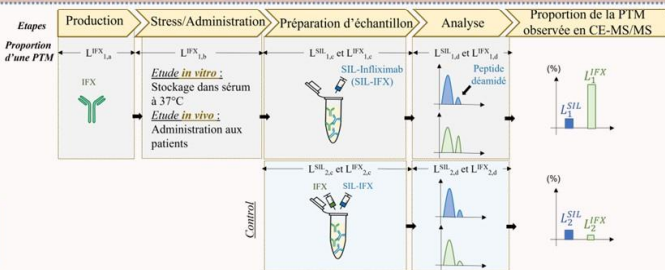
Stratégie de normalisation

Utilisation du standard interne (SIL-IFX) comme marqueur des modifications endogènes issues de la production/préparation d'échantillon

Equation de normalisation des PTMs:

$$I_{L^b}^{IFX} = \frac{L^{IFX}_{1,1} + L^{IFX}_{2,1} + L^{SIL}_{1,1} + L^{SIL}_{2,1}}{L^{IFX}_{1,2} + L^{IFX}_{2,2} + L^{SIL}_{1,2} + L^{SIL}_{2,2}}$$

Normalisation permet de déduire les niveaux de PTMs générés dans l'organisme du patient

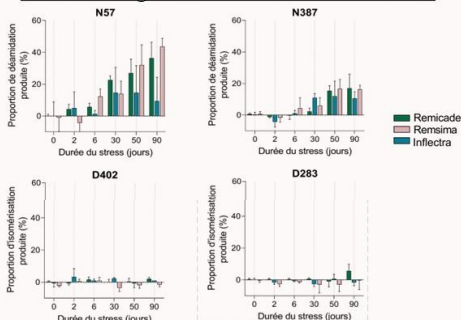


Etude in vitro

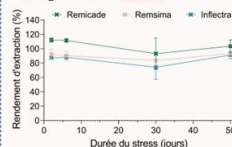
Trois biosimilaires : Remicade®, Inflectra® et Remsima®
Incubation dans du sérum humain sain à 37°C durant 2, 6, 30, 50 et 90 jours.

PTMs étudiées : 4 déamidations d'asparagine (N57 et N387 sur chaîne lourde; N137 et N158 sur chaîne légère) et 2 isomérisations d'aspartate (D283 et D402)

Modifications générées durant l'incubation *in vitro*



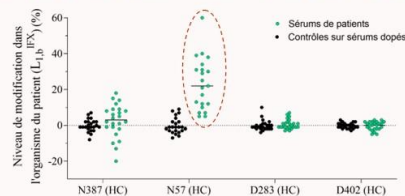
Impact des PTMs sur l'affinité infliximab-TNFα



Utilisation du rendement d'extraction pour déterminer l'impact des PTMs sur l'interaction antigène-anticorps

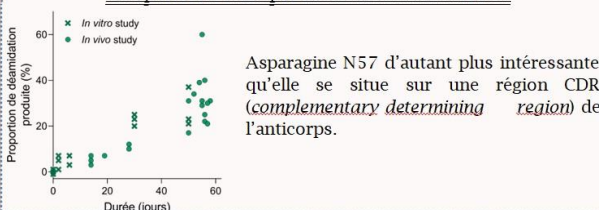
Etude in vivo

24 patients atteints de la maladie de Crohn et traités avec infliximab (Remicade®). Sérums collectés entre 15 et 60 jours après administration du traitement. Puis, ces sérums ont été analysés via la stratégie CE-MS/MS.



Déamidation de N57 observée par analyse CE-MS/MS durant sa résidence dans l'organisme des patients

Comparaison cinétique de la déamidation de N57



Asparagine N57 d'autant plus intéressante qu'elle se situe sur une région CDR (*complementary determining region*) de l'anticorps.

Conclusions

Cette étude décrit une nouvelle stratégie *in vitro* pour prédire les modifications structurales d'anticorps après administration aux patients. Cette méthode repose sur l'analyse CE-MS/MS de digest d'anticorps après leur extraction du sérum. Cette étude a pu mettre en évidence la déamidation d'asparagine sur une zone CDR de l'infliximab, après administration chez des patients atteints de la maladie de Crohn.

Les auteurs vous ont remerciés :
 - L'Hôpital Saint-Louis (Paris) pour les sérums de patients
 - L'ANR pour le financement du projet MAbiN57
 - L'AFSEP pour la bourse dédiée à ce congrès

References:
 1) Blotnick et al. Anti-TNF-α therapies for the treatment of Crohn's disease: the past, the present and future. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2013; 13(10):1015-1024.
 2) Heumann, et al. V. Identification and characterization of post-translational modifications in Omalizumab. *Molecular Aspects of Medicine* 2012; 43(1):105-110.
 3) Blotnick-Claude, A. et al. Impact of methylation on the binding of human IgG1 to FcγR1 and FcγR2. *Molecular Immunology* 2006; 44: 1870-1882 (2006).

Annexe 6 : Poster présenté à l'ASMS 2023

Université Paris Cité
Université de Strasbourg
CITIS

Tessa REINHERT^{1,2}, Pascal HOUZE^{1,3}, Oscar HERNANDEZ ALBA⁴, Sarah CIANFERANI⁴, Yannis Nicolas FRANCOIS⁴, Rabah GAHOUIAE⁴

¹UMR 1254, Laboratoire de Chimie des Polymères et des Matériaux, Université de Strasbourg, 8 allée de la Sphère, 67037 Strasbourg, France
²UMR 1254, Laboratoire de Chimie des Polymères et des Matériaux, Université de Strasbourg, 8 allée de la Sphère, 67037 Strasbourg, France
³UMR 1254, Laboratoire de Chimie des Polymères et des Matériaux, Université de Strasbourg, 8 allée de la Sphère, 67037 Strasbourg, France
⁴UMR 1254, Laboratoire de Chimie des Polymères et des Matériaux, Université de Strasbourg, 8 allée de la Sphère, 67037 Strasbourg, France

Quantification of anti-infliximab antibodies in human serum using capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry

Introduction

Antibodies are important antibody widely used in the treatment of chronic inflammatory diseases that target TNF- α cytokine involved in inflammation. Due to its mouse antibody-derived variable part, infliximab is prone to immunogenicity. In particular, neutralizing antibodies to infliximab (NATI) can be produced by the immune system, altering the efficacy of the drug and the regulation of inflammation, potentially leading to loss of therapeutic response.

NATI quantification is crucial to determine whether patient PK clearance, absence or sudden loss of clinical response must be originating from an immunogenic response. In order to quickly adjust the treatment, serum is a complex mixture composed of a wide variety of natural IgGs, analytical methods for NATI quantification must be specific and sensitive.

Here, we developed a novel method based on capillary electrophoresis coupled to tandem mass spectrometry (CE-MS/MS) for the absolute quantification of NATI in human serum.

Analytical workflow

CE-MS/MS conditions

- Treatment reagent: Acetic Acid 10%
- Background Electrolyte: Acetic Acid 10%
- Leading Electrolyte: Ammonium Acetate pH 4
- Hypoanion: ammonium CE-MS
- ISS-MS MS (Triple TOF 5600)
- CD Fragmentation

Quantification strategy

Competition reaction

Initial	St-ELK	NATI	Complex
R_0	A_0	B_0	X
R_{eq}	A_{eq}	B_{eq}	X_{eq}

NATI quantification:

$$\frac{1}{X_{eq}} = \frac{1}{A_0} + \frac{1}{B_0} - \frac{1}{X_{eq}}$$

Equation of the complex:

$$K_d = \frac{R_{eq} \cdot A_{eq}}{X_{eq}}$$

Equation of the signal:

$$S = \frac{R_{eq}}{K_d} + X_{eq}$$

Equation of the ratio:

$$\frac{S}{X_{eq}} = \frac{R_{eq}}{K_d \cdot X_{eq}} + 1$$

Equation of the ratio of the signal to the concentration:

$$\frac{S}{X_{eq}} = \frac{R_{eq}}{K_d \cdot X_{eq}} + 1$$

When is reached the equilibrium?

The kinetics of complexation was evaluated by mass spectrometry. The measurement of the light scattering signal in a sample after exposure to an incident beam of light, directly proportional to its mass of the substance.

• Non-ideal complexation
• Majority of the complexes formed are of ~250 kDa
• Equilibrium is reached after 2 min incubation

Can the ratio of signal be correlated to the concentration?

valid if the ratio of the MS signals of both SIS is related to the ratio of their concentrations.

Stability

Stability of the ratio of the MS signals of both SIS over time of storage at different temperatures.

Linearity

Linearity of the ratio of the MS signals of both SIS over a wide range of concentrations.

What is the K_d of the complex?

Use of standards for the quantification of NATI in human serum with known concentrations of St-ELK, A₀, B₀, and NATI (B₀) were analyzed using CE-MS/MS workflow.

Fitting of the points according to the (eq.3). The slope is directly linked to 1/K_d.

The obtained K_d is 1.7 nM!

Conclusions

- Quantification of neutralizing antibodies to infliximab in human serum by the CE-MS/MS method.
- This NATI quantification allows for the competition NATI-St-ELK in the serum conditions, without prior fraction of any of these antibodies on a surface, and with an internal standard (St-adalimumab) that accounts for St-infliximab losses during sample preparation → limitation of St-adalimumab.
- Good repeatability of the method.
- No interferences in the extracted IgG fraction.
- Good reproducibility of the method.
- Reference: K_d of Anti-IgG-antibodies (Concentration, antiserum).
- Consideration of single site binding in the model used by the approach.

References

- [1] Tessa Reinhert, Oscar Hernandez Alba, Sarah Cianferani, Yannis Nicolas Francois, Rabah Gahoui, Pascal Houze, Quantification of anti-infliximab antibodies in human serum using capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2023, 123456.
- [2] Tessa Reinhert, Oscar Hernandez Alba, Sarah Cianferani, Yannis Nicolas Francois, Rabah Gahoui, Pascal Houze, Quantification of anti-infliximab antibodies in human serum using capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2023, 123456.
- [3] Tessa Reinhert, Oscar Hernandez Alba, Sarah Cianferani, Yannis Nicolas Francois, Rabah Gahoui, Pascal Houze, Quantification of anti-infliximab antibodies in human serum using capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2023, 123456.
- [4] Tessa Reinhert, Oscar Hernandez Alba, Sarah Cianferani, Yannis Nicolas Francois, Rabah Gahoui, Pascal Houze, Quantification of anti-infliximab antibodies in human serum using capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2023, 123456.
- [5] Tessa Reinhert, Oscar Hernandez Alba, Sarah Cianferani, Yannis Nicolas Francois, Rabah Gahoui, Pascal Houze, Quantification of anti-infliximab antibodies in human serum using capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2023, 123456.

Électrophorèse capillaire-spectrométrie de masse appliquée à l'étude quantitative et structurale d'anticorps monoclonaux après administration

Résumé

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont des glycoprotéines utilisées dans divers domaines médicaux. Cependant, leurs nombreuses micro-hétérogénéités peuvent altérer l'efficacité thérapeutique. L'étude du devenir post-administration des mAbs, d'un point de vue structurel et quantitatif, est cruciale pour mieux comprendre les diverses réponses cliniques des patients. Pour réduire le temps et les erreurs associées à l'utilisation d'un panel de méthodes analytiques orthogonales, il faut développer des stratégies capables d'obtenir de multiples informations simultanément. La spectrométrie de masse s'est imposée comme une méthode essentielle pour la quantification et la caractérisation structurale de biomolécules. Les travaux de ce manuscrit présentent le développement et l'application d'une méthode basée sur le couplage CE-ESI-MS/MS pour quantifier l'infliximab, un mAb thérapeutique, à partir d'une matrice biologique. De manière simultanée, la méthode permet de caractériser la proportion de modifications post-traductionnelles apparues sur le mAb *in vivo*. En outre, cette analyse fournit des informations sur l'immunogénicité apparue.

Mots-clés : Spectrométrie de masse, Electrophorèse capillaire, Anticorps monoclonaux, Quantification, Modifications post-traductionnelles, Immunogénicité, Interactions non-covalentes

Summary

Monoclonal antibodies (mAbs) are glycoproteins used in a variety of medical fields. However, their numerous microheterogeneities can alter therapeutic efficacy. Studying the post-administration outcome of mAbs, from a structural and quantitative point of view, is crucial to better understand the diverse clinical responses of patients. In order to reduce the time and errors associated with using an array of orthogonal analytical methods, it is necessary to develop strategies to obtain multiple informations simultaneously. Mass spectrometry has emerged as an essential method for the quantification and structural characterization of biomolecules. This manuscript presents the development and application of a method based on CE-ESI-MS/MS analysis to quantify a therapeutic mAb, infliximab, from a biological matrix. At the same time, the method enables the characterization of post-translational modifications that have occurred *in vivo* on the mAb. It also provides information on the immunogenicity developed by patients.

Keywords: Mass spectrometry, Capillary electrophoresis, Monoclonal antibodies, Quantification, Post-translational modifications, Immunogenicity, Non-covalent interactions