



HAL
open science

Développement de stratégies bio-analytiques pour l'étude et la détection de formes dégradées d'anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu hospitalier

Cécile Tardif

► **To cite this version:**

Cécile Tardif. Développement de stratégies bio-analytiques pour l'étude et la détection de formes dégradées d'anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu hospitalier. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASF072 . tel-04801053

HAL Id: tel-04801053

<https://theses.hal.science/tel-04801053v1>

Submitted on 25 Nov 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.

Développement de stratégies bioanalytiques pour l'étude et la détection de formes dégradées d'anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu hospitalier

Development of bio-analytical strategies to study and detect degraded forms of therapeutic monoclonal antibodies in hospital context

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°571 : sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Graduate School : Chimie. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **IGPS (Université Paris-Saclay, CNRS)**, sous la direction de **Claire Smadja**, Professeure, et du co-encadrement d'**Emmanuel JACCOULET**, Docteur.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 23 Octobre 2023, par

Cécile TARDIF

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Catherine PERRIN Professeure, Université Montpellier	Présidente du jury
Rabah GAHOUAL Maître de Conférence (HDR), Université Paris-Cité	Rapporteur & Examineur
Julien BOCCARD Maître de Conférence, Université de Genève, Suisse	Rapporteur & Examineur
Marie-Claude MENET Professeur, IUT Chimie Orsay	Examinatrice

Titre : Développement de stratégies bioanalytiques pour l'étude et la détection de formes dégradées d'anticorps monoclonaux thérapeutiques en milieu hospitalier.

Mots clés : Anticorps monoclonaux, Focalisation isoélectrique capillaire en image, Contrôle Qualité, Attributs de Qualité Critiques, Chimiométrie, Contexte hospitalier.

Les anticorps monoclonaux (Acms) représentent une part importante des traitements médicamenteux administrés dans les hôpitaux, notamment en oncologie. Cependant, ces traitements représentent un risque immunologique élevé en raison de leurs instabilités et des différentes dégradations physicochimiques pouvant survenir lors du processus de préparations et de manipulations à l'hôpital. Le contrôle qualité des produits biopharmaceutiques dans les hôpitaux est d'une importance primordiale pour garantir la sécurité des patients et l'efficacité du traitement. Compte-tenu de la multiplication du nombre de traitements à base d'anticorps monoclonaux commercialisés et prescrits, un contrôle analytique hospitalier pré-libératoire est un véritable défi.

Dans un premier temps, une approche associant focalisation isoélectrique capillaire en image (icIEF) et chimiométrie a été développée pour permettre l'identification d'Acms en contexte hospitalier. Puis, afin de détecter les traitements partiellement dégradés avant administration aux patients, trois anticorps (Infliximab, Pembrolizumab et Pertuzumab) ont été soumis à une étude de dégradations forcées et analysés par icIEF couplé à la chimiométrie et plusieurs techniques complémentaires et orthogonales. Enfin, l'impact des dégradations forcées sur l'efficacité des traitements a également été étudiée. Les interactions entre l'Infliximab partiellement dégradé et le TNF- α ont été ainsi évaluées.

Title: Development of bio-analytical strategies to study and detect degraded forms of therapeutic monoclonal antibodies in hospital context

Keywords: Monoclonal Antibodies, Imaged Capillary Isoelectric Focusing, Quality Control, Critical Quality Attributes, Chemometrics, Hospital Context.

Abstract: Monoclonal antibodies (mAbs) are increasingly employed in hospitals particularly, in the field of cancer therapy. However, mAbs treatments represent a high immunological risk due to degradation and instabilities issues that may occur during the compounding process and manipulations at the hospital. Quality control of compounded biopharmaceuticals in hospitals is of paramount importance to ensure patient safety and treatment efficiency (administration of degraded drugs). There is currently no rigorous analytical control in place to ensure the identity and integrity of therapies before patients administration. With an increase in the number of mAb-based medicines being marketed and prescribed, pre-release hospital analytical control is becoming a real challenge.

First, an approach combining image capillary isoelectric focusing (icIEF) and chemometrics was developed to identify mAbs in the hospital environment. Then, three antibodies (Infliximab, Pembrolizumab, and Pertuzumab) were exposed to a forced degradation study and analyzed by icIEF and complementary and orthogonal techniques. Finally, the influence of forced degradation on treatment efficiency was investigated. A case study on the interactions between partially degraded Infliximab and TNF- α was conducted and the potential of three analytical techniques has been evaluated.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, la professeure Claire Smadja, de m'avoir suivi sur ces trois années, mais également pour sa grande gentillesse, son écoute attentive et son implication.

Encore merci de tes précieux conseils scientifiques, d'avoir défendu mon travail, de m'avoir accordé ta confiance pour que je puisse tester mes idées. Je te remercie également de m'avoir donné l'opportunité de présenter lors de conférences et de m'avoir encouragé à échanger aussi avec des partenaires industriels.

Je remercie aussi à mon co-encadrant de thèse, le docteur Emmanuel Jaccoulet, de m'avoir partagé quelques-unes de ses connaissances et sa vision globale du projet.

Je souhaite aussi remercier la professeure Myriam Taverna, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir conseillé sur mes objectifs scientifiques courts et longs termes.

Merci aux rapporteurs et examinateurs, Marie-Claude Menet, Catherine Perrin, Julien Bocard et Rabah Gahoual pour le temps qu'ils auront accordé à mon travail et pour leurs commentaires.

De plus, j'aimerais également remercier le Professeur Frédéric Halgand et le Professeur Ghozlène Mekhloufi pour leurs aides précieuses ces derniers mois de manipulations, nous n'aurions pas pu aller aussi loin dans le projet sans vous.

Merci à Duc Thanh Mai pour ses remarques toujours pertinentes qui m'ont débloqué plus d'une fois et pour son optimisme sans limites, comme il en faudrait plus. Merci également à Thuy Tran Maignan, pour son aide et ses sourires du midi.

Je remercie l'entreprise Biotechne qui a suivi de près mon projet de thèse, et particulièrement Yannick Surroca, Stéphanie Lerat, Laurence Talbot, et Jean-François Bellec.

Merci également à Isabelle Turbica, Maria Lteif, Benjamin Cappe, Racha Majeb, Gilles Diraison, Marie Hennetier et Frédéric Violleau pour nos échanges et leurs interventions au cours mes travaux de thèse.

Je tiens aussi à remercier Sylvie Z., Sylvie L., Lynda, Patricia, Fatiha, Maria et Orane pour leurs aides au quotidien. Merci pour votre rapidité et votre aide. Sans oublier un grand merci pour les nombreux gouters et les moments partagés.

Je tiens également à remercier les anciens et nouveaux doctorants ainsi que les stagiaires que j'ai eus la chance de rencontrer lors de ma thèse : Emilie, Théo, Van Thanh, Bin, Sameh, Charlotte, Camille, Clara et Pauline.

Je tiens maintenant à remercier tout particulièrement Marco et Joanie pour nos fous rires, nos batailles et nos bêtises lors de mes deux premières années de thèse. Je pense qu'à nous trois, nous avons récapitulé l'ensemble des différences France-Italie, sans oublier de comparer la gastronomie, quitte à faire des tests en direct avec les ustensiles à disposition. Joanie, tu resteras la petite fleur de ma thèse, merci pour tes papotages face à des tasses semi-remplies jusqu'à ce qu'elles soient froides, ton écoute attentive des mille aventures et ton amour partagé pour les noix de cajou. Un grand merci aussi à Mathilde, qui bien qu'elle soit arrivée lors ma dernière année, est devenue aussi très rapidement une fleur de ma thèse, d'abord voisine sans le savoir et est désormais une amie. J'espère que notre trio du BR continuera loin.

Je remercie Tessa et Anaïs pour être mon encrage strasbourgeois, qui font aujourd'hui partie de mon retour aux sources. Merci aussi à Yasmine et Constance qui malgré les mois sans nouvelle sont toujours aussi présentes comme si rien n'avait changé. Merci également à mon Lupin qui a été là pour les bons et les mauvais moments, j'espère qu'on se rattrapera.

Je voudrais remercier Axelle, qui est arrivée dans ma vie en même temps que ma thèse et pourtant avec qui j'ai l'impression d'avoir grandi. J'espère que notre complicité passera les années, tu comptes parmi mes repères, j'espère être là pour toi.

Merci à Daniel pour nos dîners éternisés à discuter et à rêver de nos avenir. Nous trouverons toujours un moment pour se partager nos aventures.

Je souhaite également remercier ma bande de costauds pioupiou ou non, avec qui j'ai partagé les meilleures comme les pires séances. Un grand merci à tous les Enfants de la barre, et même à papa Frédéric. Merci à Ludo pour nos deux dernières lignes droites partagées, chacun avec nos difficultés, mais une dose d'humour qui donne un peu de douceur. Merci également à Aurel et Clem pour leur bienveillance, leurs stand-ups naturels et leurs 1000 idées d'énigmes. Merci à Amandine pour sa bonne humeur à toute épreuve.

Un grand merci aussi à mes costauds du quotidien, que j'emmène partout même en vacances, Joy, Audrey, Emeline et Teddy. La dolce vita n'aurait pas la même saveur sans vous, la chaleur, la sueur et les gelato de pistacchio. Merci aussi pour ses soirées blabla qui boostent et motivent pour aller toujours plus loin.

Merci à Steve d'être présent au quotidien, de suivre les étapes, les rebondissements et tout ça avec le plus grand des positivismes. Je suis heureuse de pouvoir partager des folies avec toi, de partir grimper sur des montagnes à 3h du matin comme simplement prendre un Perrier citron pour discuter de comment révolutionner la terre en 3 actes

dans un canapé.

Je voudrais enfin remercier mes trois frères, Antoine, Matthis et Louis, bien que nous soyons loin au quotidien, nous serons toujours présents, les moments que nous partageons, nous suivrons toute notre vie et nous réunirons. Un grand merci également à Sandrine qui est à mes côtés et qui suit mon évolution à travers de nombreux tea times, et cela, depuis le temps où je faisais ses tests de lectures pendant les Étés.

Je souhaite maintenant remercier mes parents de m'avoir permis d'évoluer librement jusqu'à ce doctorat et de m'avoir fait confiance. Tout cela a été possible grâce à vous.

Je souhaite également rendre un hommage ici à mes deux grands-mères, parties toutes les deux en 2022, et qui m'ont permis de me construire.

CURRICULUM VITAE

Formations

- Ecole thématique "Fractionnement en Flux de Force", INP Toulouse, Purpan, Juin 2021
- Ecole thématique "Validation de méthodes, chimométrie et analyse de données", afsep, Juin 2022

Communications orales

- "Caractérisation des dimères d'anticorps monoclonaux induits par des effets de « salting-out » et de leur pouvoir immunogène sur des modèles cellulaires. ", **SEP 21**, Paris, 5-7 Octobre 2021
- "Evaluation of mAbs degradations: a new method?", **Analytix 2022**, Nantes, 11-15 Septembre 2022
- "icIEF-coupled to chemometrics analysis to identify therapeutic monoclonal antibodies and detect their degraded states", **PEGS Europe 2022**, Barcelone, 14-17 Novembre 2022
- "Approche complète pour l'analyse des traitements d'anticorps monoclonaux : étude chimométrique des variants de charges et des conformations", **SEP 23**, Paris, 28-30 Mars 2023

Posters

- "icIEF-coupled to chemometrics analysis to identify therapeutic monoclonal antibodies and detect their degraded states", **MSB 2022**, Liège, 1-4 Juillet 2022
- "Impact des stress en environnement hospitalier sur les interactions anticorps-cibles: étude par focalisation isoélectrique capillaire en image", **SEP 23**, Paris, 28-30 Mars 2023

Publication

- "Imaged capillary isoelectric focusing associated with multivariate analysis: A powerful tool for quality control of therapeutic monoclonal antibodies", C. Tardif, E. Jaccoulet, JF.Bellec, Y. Surroca, L. Talbot, M. Taverna, C. Smadja, *Talanta*, 260 (2023) 124633

[https://doi.org/ 10.1016/j.talanta.2023.124633](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124633)

LISTES DES ABBREVIATIONS

ADA : *anti-drug antibodies*, anticorps neutralisants anti-médicaments

Amc : Anticorps monoclonaux

BGE : *Background electrolyte*, tampon d'analyse

BPP : Bonnes Pratiques de Préparation

CD : *Circular Dichroism*, Dichroïsme Circulaire

CDR: *Complementary Determining Region*, régions déterminant la complémentarité

CE : *Capillary Electrophoresis*, électrophorèse capillaire

CEX : *Cation Exchange chromatography*, chromatographie échange de cations

cIEF : *capillary isoelectric focusing*, Focalisation isoélectrique capillaire

CQA : *Critical Quality Attribut*, attributs de qualité critiques

CZE : *Capillary Zone Electrophoresis*, électrophorèse capillaire de zone

DLS : *Dynamic Light Scattering*, diffusion dynamique de la lumière

ELISA : *Enzyme Like ImmunSorbant Assay*

FACCE : *Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis*, Electrophorèse Capillaire Continue à Analyse Frontaler

FFF : *Field Flow Fractionation*, fractionnement flux champ-flux

FLD : *Fluoresce Laser Detection*, Détecteur de fluorescence

FT-IR : *Fourier Transform Infrared spectroscopy*, Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

GMP : *Good Manufacturing Practice*

HC : *Heavy chain*, chaîne lourde

HIC : *Hydrophobic Interaction Chromatography*, chromatographie d'interaction hydrophobe

HMW : *High Molecular Weight*, hauts poids moléculaires élevés

ICH : *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

icIEF : *imaged capillary isoelectric focusing*, Focalisation isoélectrique capillaire en image

IEF : *Isoelectro focusing*, focalisation isoélectrique

LEX : *Ionic Exchange chromatography*, chromatographie échangeuse d'ions

IgG : Immunoglobuline

IM : *ionic mobility*, Mobilité Ionique

INF : Infiximab

LC : *Light chain*, chaîne légère

LIF : *Laser Induced Fluorescence*, détection par fluorescence induite par laser

LMW : *Low Molecular Weight*, faibles poids moléculaires

LV : *Latent Variables*, Variables latentes

mAb : monoclonal antibodies, Anticorps monoclonaux

MALS : *Multi Angle Light Scattering*, diffusion de la lumière multi-angle

MAM : *Multiple Attribute Method*

MFI : *Micro Flow Imaging*, Microscopie par Imagerie en Flux

MP : *Mass Photometry*, Photométrie de Masse

MS : *Mass Spectrometry*, Spectrométrie de Masse

MVA : *Multivariate Data Analysis*, Analyse de données multivariées

NTA : *Nanoparticles Tracking Analysis*, analyse de suivi des nanoparticules

PAT : *Process Analytical Technology*, concept des technologies d'analyse de processus

PC : *Principal Component*, Composantes Principales

PCA : *Principal Component Analysis*, Analyse en Composantes Principales

PLS : *Partial Least Square*, régression des moindres carrés partiels

PTM : *Post-translational Modification*

PUI : Pharmacie à Usage Interne

QbD : *Quality by Design*

RPLC : *Reverse Phase Liquid Chromatographie*, chromatographie en phase inverse

SAX : *Strong Anion Exchange*, échangeuses d'anions forts

SCX : *Strong Cation Exchange*, échangeurs de cations forts

SEC : *Size Exclusion Chromatography*, chromatographie d'exclusion stérique

SPR : *Surface Plasmon Resonance*, Résonance Plasmon de Surface

SV-AUC : Sedimentation Velocity - Analytical Ultra Centifugation, l'ultracentrifugation analytique de la vitesse de sédimentation

TDA : Taylor Dispersion Analysis, Analyse par dispersion de Taylor

TEM : *Transmission Electron Microscopy*, Microscopie électronique à transmission

TNF : *Tumoral Necrosis Factor*, Facteur de Nécrose Tumorale

VAST : *VARIABLE STability scalling*

WAX : *Weak Anion Exchange*, échangeuses d'anions faibles

WCX : *Weak Cation Exchange*, échangeurs de cations faibles

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Curriculum Vitae	7
Listes des abréviations	8
Table des matières	11
1 Chapitre I : Anticorps monoclonaux : Contexte, hétérogénéités et instabilité 18	
1. Contexte : Entre design, efficacité et sécurité des traitements d'anticorps	18
1.1.1 Contexte économique.....	18
1.1.2 Structures des anticorps monoclonaux et conséquence sur la stabilité des traitements	21
1.1.3 Conséquences des hétérogénéités : Immunogénicité	26
2. Les études de stabilité : réglementées pour l'industrie, mais limitées pour les hôpitaux	28
1.2.1 Des enjeux forts autour de la maîtrise de la qualité des AcM	28
1.2.2 Réglementation et usages actuels en industrie	29
1.2.3 Contrôle qualité à l'hôpital.....	30
1.2.4 Contrôle qualité garantissant la santé des patients.....	31
1.2.5 Autres CQA standard : taille, conformation, charge.....	33
3. Conclusions du chapitre I	36
2 Chapitre II : Les méthodes analytiques mises en place pour CQA	37
1. Dégradations chimiques	37
2.1.1 Variants de charges.....	37
2.1.2 Variants Hydrophobicité	55
2. Étude des instabilités physiques	59
2.2.1 Variants de tailles	59
2.2.2 Variants de structure	79
3. Conclusions du chapitre II	87
3 Chapitre III : Potentiel de la chimométrie : perspectives pour le contrôle qualité en contexte hospitalier	89
1. Le rôle des analyses multivariées dans le contrôle qualité	89
3.1.1 L'intérêt de l'analyse multivariée pour l'industrie	89
3.1.2 Chimométrie	91
3.1.3 L'analyse de données multivariées	92
2. Applications de la chimométrie au contrôle qualité.....	107
3.2.1 Applications de la chimométrie aux méthodes spectrales.....	107
3.2.2 Application de la chimométrie aux autres méthodes analytiques	109
3. Conclusions du chapitre III.....	112
114	
Objectifs de thèse	114
1. Contexte hospitalier.....	114
2. Contrôle qualité à l'hôpital.....	116
3. Objectifs	117
4 Chapitre IV : Identification des anticorps monoclonaux par icIEF associée à la chimométrie 121	
1. Introduction de l'identification des anticorps avant administration aux patients : intérêt dans un contexte hospitalier	121
4.1.1 Objectifs et méthodes appliquées	122
4.1.2 Choix des paramètres analytiques	124

2.	Article 1 : Focalisation isoélectrique capillaire en image associée à l'analyse multivariée : un outil puissant pour le contrôle qualité des anticorps monoclonaux thérapeutiques	126
3.	Autres applications : Étude de l'impact des différences de lots et de l'influence de la formulation	147
4.3.1	Étude de lots	147
4.3.2	Étude de l'influence de la formulation	148
4.	Conclusions chapitre IV	151
5	Chapitre V : icIEF couplée à l'analyse en composante principale pour la détection d'anticorps monoclonaux dégradés avant administration au patient : impacts de différents stress	152
1.	Introduction	152
5.1.1	Études de stabilité en contexte hospitalier.....	152
5.1.2	Méthode de prétraitement des électrophérogrammes pour les études de stabilité	154
2.	Article 2 : Focalisation isoélectrique capillaire en image pour suivre les dégradations des anticorps thérapeutiques avant administration aux patients.....	155
3.	Études des structures et conformations	175
5.3.1	Étude de la structure secondaire des échantillons dégradés par dichroïsme circulaire (UV lointain)	175
5.3.2	Étude de la structure tertiaire des échantillons dégradés par mobilité ionique.....	184
4.	Conclusions du chapitre V.....	196
6	Chapitre VI : Lien entre fonctionnalités et dégradations, méthode d'évaluation des CQA (étude de cas INF-TNF-alpha)	198
1.	Introduction sur les interactions anticorps-cibles.....	198
6.1.1	L'affinité de l'anticorps pour sa cible : un CQA important.....	198
6.1.2	Méthodes d'analyses utilisées pour évaluer l'affinité anticorps-antigène	200
6.1.3	Analyses frontales par chromatographie et électrophorèse d'affinité	202
2.	Étude de l'affinité de l'Infliximab et sa cible biologique (TNF- α).....	204
6.2.1	Interactions Infliximab-TNF- α	204
6.2.2	Stratégies mises en œuvre pour évaluer l'impact des stress sur les affinités Infliximab-TNF- α	207
6.2.3	Évaluation de l'impact des stress par une étude des variants de taille	217
3.	Conclusions du chapitre VI	234
	Conclusions et perspectives	236

Introduction générale

L'importance croissante des thérapies à base d'anticorps monoclonaux (Acms) a profondément modifié le marché pharmaceutique ces dernières années. Ces macromolécules sont utilisées notamment dans les thérapies anticancéreuses et dans la lutte contre les maladies auto-immunes. Les anticorps monoclonaux sont des molécules complexes et sujettes à des problèmes d'instabilité liés à leur nature protéique. Lors de la production d'anticorps thérapeutiques, une multitude de paramètres peuvent être la cause de modifications indésirables, telles que la variabilité de la lignée cellulaire utilisée pour la production, les modifications post-traductionnelles (telles que les glycosylations), les phénomènes d'agrégation. Ceux-ci peuvent altérer l'activité biologique et la stabilité du médicament. De leur production industrielle jusqu'à administration aux patients, un Acm peut être soumis à différentes situations pouvant provoquer une instabilité. Par exemple ; lors d'un reconditionnement (dilution des solutions d'anticorps monoclonaux concentrées dans des poches stériles remplies de solvant physiologique compatible), d'une congélation, des manipulations des poches intraveineuses avant l'administration au patient. L'ensemble de ces facteurs conduit donc à des hétérogénéités de tailles, de charges, d'hydrophobicités, et de conformations... Ces hétérogénéités peuvent être à l'origine d'une diminution de l'activité biologique du médicament ou encore entraîner des conséquences cliniques de telles que l'immunogénicité. En effet, certains patients peuvent déclencher une réponse immunitaire conduisant à une inefficacité du médicament ou à des effets indésirables. Un moyen de limiter l'administration d'anticorps thérapeutiques comportant ce type d'hétérogénéité est de réaliser un contrôle qualité analytique avant administration aux patients.

Une caractérisation fiable des Acms est essentielle pour garantir l'innocuité et l'efficacité des médicaments. Par conséquent, des attributs de qualité critiques (*Critical Quality Attribute, CQA*) sont définis pour chaque Acm, ainsi que les critères d'acceptation associés. Par exemple, la présence et l'importance des modifications dans les Acms est quantifiée par rapport à leurs formes natives respectives. Ainsi, l'identification des attributs de qualité critiques est une étape importante dans le développement de produits biopharmaceutiques. Différentes techniques d'analyses sont couramment utilisées dans l'industrie afin de vérifier que les hétérogénéités sont considérées acceptables pour garantir la santé des patients. Dans l'industrie, lors de la production et avant la libération des lots, pour chaque hétérogénéité, une ou plusieurs techniques d'analyses, permettant d'évaluer les Acms, sont effectuées suivant les normes ICH (*International Council for Harmonisation*). Celles-ci encadrent le contrôle qualité de l'industrie pharmaceutique et définissent notamment des recommandations que doivent suivre les études de stabilité (les critères d'évaluation sur la façon dont varie la qualité des produits médicamenteux dans le temps et sous l'influence de divers facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité ou la lumière).

Cependant, une fois les médicaments délivrés par les industriels aux hôpitaux, peu ou aucun contrôle analytique ne sont effectués sur les Acms avant leurs administrations aux patients. Néanmoins, l'environnement hospitalier et les manipulations des solutions à administrer peuvent conduire à des modifications de ces biomolécules. Les hétérogénéités ainsi introduites peuvent dans certains cas être à l'origine du potentiel immunogène de certains médicaments. De plus, les hôpitaux sont soumis uniquement à un contrôle succinct des solutions administrables qui ne consiste pas obligatoirement à la vérification analytique de l'identité du traitement, de sa dose, et de son intégrité. Malgré un contrôle analytique juridiquement non obligatoire, certains hôpitaux cherchent à investir dans des approches analytiques pour limiter les risques d'erreurs et permettre de prévenir les cas d'immunogénicité liés aux hétérogénéités présentes dans les solutions administrées. Pour être implantées dans les hôpitaux, les techniques analytiques doivent être rapides (aussi bien pour l'analyse, la préparation d'échantillon et de l'instrument). Cependant, elles doivent également être faciles à mettre en œuvre, et permettre une interprétation des données directement réalisable par un pharmacien.

Dans ce cadre, et à partir des solutions déjà utilisées par les industriels pour les analyses lors de la production, des méthodes adaptées aux contraintes hospitalières (temps, formations du personnel...) sont développées. De plus, depuis quelques années, de nouvelles approches en contrôle qualité voient le jour avec l'introduction de la chimométrie dans les outils de contrôle. La chimométrie est une discipline s'appuyant sur des approches statistiques pour réaliser le traitement des données issues des différentes techniques analytiques. Cela permet notamment de conclure ou de prédire certaines valeurs validant les critères d'acceptation définis dans les CQA. Le développement de ces nouveaux outils dans le contrôle qualité est déjà encouragé dans l'industrie pour la production. En effet, une efficacité en termes de temps, de fiabilité et d'aide à la prise de décision est constatée avec l'emploi de telles techniques.

Le premier chapitre de la partie expérimentale (**Chapitre IV**) présente l'analyse des Acms par l'association inédite de la focalisation isoélectrique capillaire en image (icIEF) à des méthodes chimométriques pour interpréter les données. Cette nouvelle combinaison de méthodes a pour but de permettre la reconnaissance de médicament à base d'anticorps monoclonaux à l'aide d'un instrument simple et adapté aux contraintes hospitalière. Pour y parvenir, une optimisation des conditions d'analyses a été nécessaire ainsi que le développement d'une méthode de prétraitement des signaux obtenus par icIEF. Les données ont dans un premier temps été analysées grâce à l'Analyse en Composante Principale (*Principal Component Analysis*, PCA) afin d'optimiser le traitement de données. Puis, un modèle de prédiction a été construit et développé par régression des moindres carrés. Ainsi, par prédiction, des anticorps peuvent être identifiés, ce qui, en contexte hospitalier, permettrait de vérifier que le bon traitement soit administré au bon patient au sein d'un circuit pharmaceutique incluant une traçabilité. Ce travail a fait l'objet d'une première publication dans *Talanta* en 2023.

Le **Chapitre V** expose une étude de dégradations forcées réalisée avec des stress relativement modérés (UV, thermique, agitation) pouvant être rencontrés en milieu hospitalier par les poches de perfusion. Une nouvelle méthode icIEF associée à la PCA a permis de constater des modifications sur trois anticorps (Infliximab, Pertuzumab et Pembrolizumab) lorsqu'ils ont été soumis à ces stress. Les résultats obtenus par cette méthode ont ensuite été confrontés à d'autres méthodes analytiques orthogonales (chromatographie d'exclusion stérique, chromatographie d'interaction hydrophobe, dichroïsme circulaire et mobilité ionique). Cette étude a permis d'évaluer le potentiel de la méthode icIEF-PCA et de constater de l'impact des stress sur les différents anticorps. Cette méthode a également été développée dans le but d'être appliquée en contexte hospitalier. Cette partie a conduit à l'écriture d'un second article en cours de préparation.

Enfin, après avoir constaté l'apparition de dégradations dans les études de dégradations forcées précédentes, nous nous sommes intéressés aux effets de celles-ci sur l'efficacité du médicament. Le **Chapitre VI** se consacre à l'étude des interactions entre l'Infliximab et sa cible biologique lorsque l'anticorps a été stressé. Plusieurs méthodes analytiques (icIEF, photométrie de masse, chromatographie d'exclusion stérique) ont été mises en place afin d'évaluer rapidement si des interactions s'établissent malgré les modifications.

Ainsi, identité, intégrité et affinité des anticorps monoclonaux ont été abordées et adaptées au contrôle qualité en contexte hospitalier dans ce manuscrit.

Bibliographie

1 CHAPITRE I : ANTICORPS MONOCLONAUX : CONTEXTE, HETEROGENEITES ET INSTABILITE

1. CONTEXTE : ENTRE DESIGN, EFFICACITE ET SECURITE DES TRAITEMENTS D'ANTICORPS

1.1.1 Contexte économique

Dans cette première partie, nous allons présenter les anticorps monoclonaux (Amc) dans le contexte du marché pharmaceutique actuel au travers de l'ingénierie des anticorps et des défis thérapeutiques associés. Les notions d'affinité et d'immunogénicité liées aux hétérogénéités de ces biomolécules, ainsi que la stabilité des traitements thérapeutiques seront également abordées. Ceci nous permettra de mieux appréhender la complexité des anticorps, due à leurs différents niveaux de structure, aux modifications chimiques et aux différents variants qui peuvent être produits.

1.1.1.1 Évolution du marché et des technologies

Un anticorps thérapeutique peut être défini comme une protéine thérapeutique qui comprend au moins un site de liaison dérivé d'un gène codant pour un anticorps. Ces biomolécules de haut poids moléculaires (~150 kDa) ont une grande polyvalence de fonctions et d'action sur l'organisme, ce qui a largement suscité l'intérêt de l'industrie pharmaceutique depuis les années 80.

Les substances médicamenteuses formulées (FDS, *Formulated Drug Substances*) à base d'anticorps monoclonaux sont des substances actives biologiques utilisées dans le traitement de nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies auto-immunes, ou les maladies inflammatoires. Bien que la plupart des Acms soient utilisés dans le traitement du cancer (lymphome, myélome, mélanome, glioblastome, neuroblastome, sarcome, cancer colorectal, du poumon, du sein, de l'ovaire, de la tête et du cou), d'autres Acms sont utilisés pour le traiter d'autres pathologies telles que la maladie de Crohn, par exemple, et d'autres pathologies [1].

1.1.1.2 Un marché dynamique

Les traitements à base d'anticorps monoclonaux connaissent un essor continu depuis le milieu des années 1980 avec la multiplication des molécules mises sur le marché mondial, [2], [3]. Actuellement, près de 1200 anticorps thérapeutiques sont en cours d'études cliniques et environ 175 sont en cours de processus réglementaires ou approuvés [1]. Approximativement 140 anticorps thérapeutiques sont en cours d'évaluation à des stades dits « avancés » au cours d'essais cliniques en phase 2, phase 2/3 ou phase 3. Une évolution récente du marché en lien avec l'actualité : traitement contre le COVID-19 [4].

Début novembre 2022, seuls deux produits candidats à base d'anticorps anti-SARS-CoV-2, le bebtelovimab et l'Evusheld (tix-agevimab coconditionné avec le cilgavimab) ont obtenu un EUA (*Emergency Use Agreement*) de la FDA (*Food and Drug Administration*). L'utilisation de l'Evusheld a été remis en cause, car celui-ci ne neutralise pas certains variants, notamment Omicron. D'autres anticorps ciblant des antigènes, plus pertinents pour les symptômes de la COVID-19, sont à l'étude. C'est le cas, par exemple, du Vilobelimab, ou Actemra (tocilizumab) actuellement approuvé par les autorités [5].

1.1.1.3 Perspectives du marché fondées sur l'ingénierie des anticorps

Concernant le marché global, en dehors de la pandémie en cours, le nombre annuel d'anticorps thérapeutiques ayant obtenu une première approbation aux États-Unis ou dans l'Union européenne mi-2022 était proche du record de 13 produits (atteint en 2018 et 2021) [1]. Parmi les anticorps approuvés au 1^{er} octobre 2022 ; 65 anticorps sont indiqués pour des pathologies non cancéreuses, 73 anticorps pour des indications cancéreuses. L'évolution croissante du marché de ce type de molécules a également été rendue possible par l'amélioration de leurs propriétés immunologiques et l'optimisation des étapes de conception et de production.

1.1.1.4 La première évolution : les générations d'anticorps

Tout d'abord, le nombre d'Acm humanisé ou totalement humanisé est une évolution majeure pour des enjeux tels que le potentiel d'immunogénicité des traitements (provoque des réactions immunitaires).

Le premier Acm approuvé par la FDA était le Muromonab-CD3 en 1986, tandis que le premier Acm entièrement humain [6], l'Adalimumab a été approuvé en 2002 pour traiter la polyarthrite rhumatoïde. Les Acms entièrement humains, ne comportant que des séquences génétiques humaines, représentent 54 % du marché, le reste étant soit humanisé (32 %), soit chimérique (14 %), comme présenté **Figure 1**. Des Acms humanisés (contenu murin de 5 à 10 %) et chimériques (contenu murin de 34 %) ont été développés pour éviter de provoquer une réponse immunitaire chez les patients traités avec des anticorps murins. En effet, une production d'anticorps humains anti-souris (HAMA) a été constatée en réponse aux anticorps murins administrés [7]. L'évolution de ces dernières années a orienté le marché vers une production d'Acms entièrement humanisés (deux tiers des nouveaux Acms approuvés en 2017) [8].

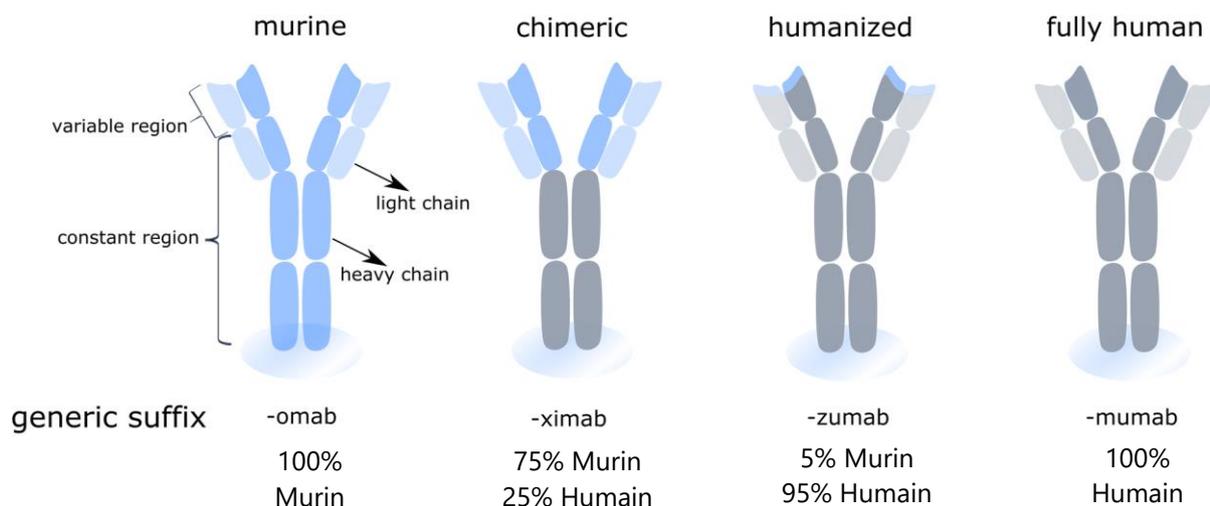


Figure 1 : Représentation schématique des quatre origines anticorps monoclonaux thérapeutiques [9].

1.1.1.5 Diversification du marché : de nouvelles stratégies de conception d'anticorps

De grands progrès ont été réalisés ces dernières années conduisant à de meilleurs résultats thérapeutiques et une baisse de l'immunogénicité. Cependant, il reste encore de nombreux défis dans la production des anticorps, notamment en termes de formulation et de persistance de l'immunogénicité.

Néanmoins, d'autres développements comme la conception de formats différents a permis d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques (distribution dans l'organisme, affinité pour les récepteurs, dégradation) et la spécificité des traitements pour leurs cibles [10]. Des technologies telles que les protéines de fusion Fc recombinantes, les anticorps polyspécifiques, ou les divers fragments d'Acms ont été conçues pour améliorer les propriétés des Acms dits « standards ». Une partie des différents formats d'anticorps sont présentés **Figure 2**.

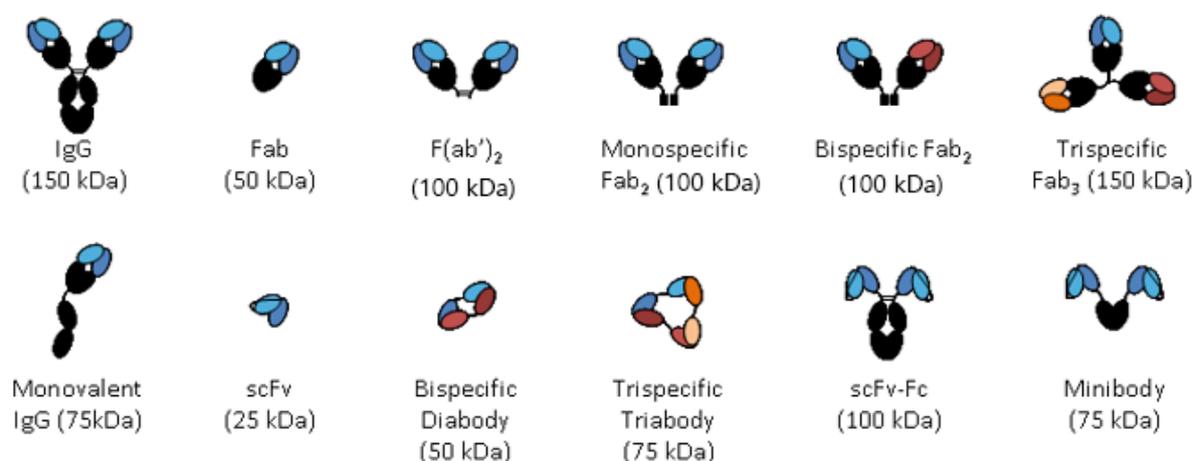


Figure 2 : Représentation schématique d'un anticorps monoclonal entier, de différents fragments d'Acms et de formats particuliers d'anticorps ont été développés pour des utilisations thérapeutiques stratégiques [11].

Les fragments d'anticorps peuvent avoir des propriétés bénéfiques par rapport aux IgG native telles qu'une meilleure pénétration tissulaire, un accès à des cibles difficiles à atteindre et une activation immunitaire plus fiable en raison de l'absence de domaine Fc. Cependant, l'un des principaux inconvénients des fragments d'anticorps est la demi-vie considérablement réduite, ce qui a conduit au développement de nouvelles approches d'ingénierie pour améliorer le temps de demi-vie tout en conservant les propriétés bénéfiques de leur petite taille.

Par exemple, une technologie alternative de l'ingénierie des anticorps développée dans la dernière décennie, connue sous le nom de technologie *CrossMab*, permet l'association correcte des différentes chaînes légères d'anticorps pour former un anticorps dont les chaînes légères sont de différentes compositions, par conséquent des cibles biologiques différentes peuvent spécifiquement être reconnues. Ces méthodes de conceptions sont appliquées sur différents formats et géométries d'anticorps par échange ou croisement de domaines d'anticorps [12]. Certains anticorps ont une structure plus flexible, les rendant plus adaptés à ce type de méthodes. Il existe maintenant plusieurs types d'anticorps polyspécifiques sur le même principe (e.g. bispécifique, tri-spécifique).

Enfin, parmi les innovations, les biosimilaires font l'objet depuis 2010 de nombreuses questions sur l'impact de changements de structure et le respect de la qualité du produit. Les anticorps biosimilaires sont des versions "similaires" des anticorps qui ont déjà été autorisés, avec la même séquence d'acides aminés, mais produits à partir de clones et de procédés de fabrication différents. En conséquence, les Acms biosimilaires peuvent présenter des différences dans la glycosylation et d'autres variations telles que des variants de charge pouvant affecter la qualité, la sécurité et leurs fonctions cliniques [13], [14]. Ce premier aperçu de l'état actuel du marché met en exergue l'importance des différentes structures et formats d'anticorps aussi bien pour leurs activités biologiques que pour leurs potentiels immunogènes. L'efficacité et la sécurité des patients résident donc dans la conception et la stabilité des structures.

Dans ce manuscrit, nous présenterons uniquement les anticorps monoclonaux, car ils représentent la plus grande part du marché des anticorps thérapeutiques, malgré les récentes approbations de médicaments bispécifiques et de fragments d'Acms.

1.1.2 Structures des anticorps monoclonaux et conséquence sur la stabilité des traitements

Les anticorps thérapeutiques sont des glycoprotéines appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig). Les immunoglobulines présentent un double mécanisme d'action. Le premier mécanisme correspond à la capacité d'un anticorps à se lier spécifiquement à un antigène par l'intermédiaire de son épitote (le motif moléculaire présent sur un antigène). Le second mécanisme est défini par la capacité d'un anticorps à activer des réactions immunitaires afin d'éliminer l'antigène.

1.1.2.1 Structure Biochimique

Les immunoglobulines sont des molécules de l'ordre de 150 kDa constituées d'environ 1300 acides aminés répartis en quatre chaînes peptidiques identiques deux à deux. Parmi elles, deux chaînes polypeptidiques sont appelées « chaînes lourdes » (HC, *Heavy chain*), d'environ 50 kDa, tandis que les deux autres chaînes sont dites « chaînes légères » (LC, *Light chain*) et sont d'environ 25 kDa, comme représenté dans la **Figure 3** ci-contre.

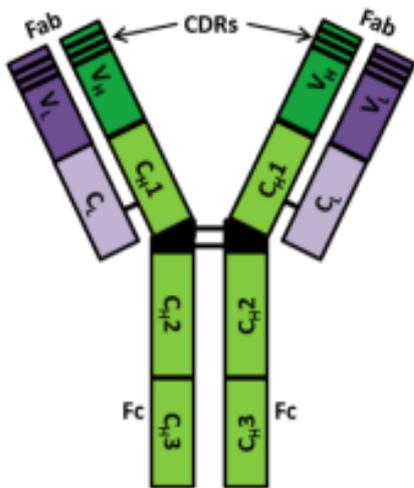


Figure 3 : Représentation schématique d'un anticorps monoclonal

Les chaînes lourdes sont constituées de 4 domaines distincts d'approximativement 110 acides aminés chacun (en vert sur la **Figure 3**). Parmi ces quatre domaines, trois sont constants (CH1, CH2 et CH3) et un est variable (VH). Tandis que les chaînes légères (en violet sur la **Figure 3**) ne possèdent qu'un seul domaine constant (CL) et un domaine variable (VL).

Les chaînes lourdes sont liées entre elles par des liaisons covalentes faites de ponts disulfures situés au niveau de la région dite « charnière » (au niveau de CH2). Chaque chaîne légère se lie à une chaîne lourde en assemblant leurs parties variables (VH et VL).

Chacun de ces domaines (VH et VL) possède des séquences d'acides aminés qui assurent la liaison à l'antigène. Cette liaison anticorps-antigène est médiée par des sites spécifiques appelés *Complémentary Determining Region* (CDR) dans les domaines variables de HC et de LC.

La structure en « Y » de l'anticorps est également décrite selon deux régions. La région qui assure la liaison à l'antigène correspond au fragment Fab (*antigen binding*), et la région destinée aux fonctions effectrices du système immunitaire, fragment Fc (*crystallisable*).

1.1.2.2 Les quatre niveaux de structures

Les protéines sont des enchainements d'acides aminés liés par la formation de liaisons peptidiques covalentes entre le groupe α -carboxylique d'un acide aminé et le groupe α -aminé de l'acide aminé suivant. La séquence en acides aminés constitue la structure primaire des protéines. Cette séquence primaire peut subir des modifications qui affectent directement les fonctions chimiques des acides aminés [15], [16].

La structure secondaire des protéines est déterminée par la conformation spatiale que prend localement la chaîne peptidique. Des liaisons hydrogènes s'établissent entre les atomes d'oxygène et d'azote des groupements amides et imposent deux dispositions

spatiales au squelette peptidique. Une de ces dispositions est dite hélicoïdale (hélice α) et l'autre est dite plissée (feuillet β). Un troisième type de structure secondaire est possible, il s'agit de structures non périodiques et aléatoires [17], [18].

Quand les chaînes polypeptidiques se recourbent et se replient pour prendre une forme tridimensionnelle plus compacte, elles engendrent un niveau supérieur de structure, la structure tertiaire. Cette structure représente la forme globulaire des protéines en solution et est maintenue grâce à différents types d'interactions : liaisons covalentes (ponts disulfures), interactions électrostatiques (liaisons ioniques, liaisons hydrogènes), interactions de Van der Waals ou interactions avec le solvant et l'environnement (ions, lipides...). La structure tertiaire est dépendante de la séquence en acides aminés et de l'environnement dans lequel évolue la protéine [19], [20].

Chaque chaîne polypeptidique est considérée comme une sous-unité de la protéine. Ce type d'organisation constitue un nouveau degré dans la hiérarchie des structures des protéines, la structure quaternaire. L'étude des structures quaternaires s'intéresse aux différents types de sous-unités présentes dans la protéine, à leur nombre et à la nature des interactions qui s'établissent entre elles [21].

Comme toutes les protéines, les IgG possèdent des caractéristiques qui leur sont propres et qui dépendent de leurs quatre niveaux de structure. Les séquences en acides aminés, leurs agencements dans l'espace, aussi bien que la structure globale de la protéine aura des conséquences sur ses propriétés. Ainsi, un anticorps peut être caractérisé par son point isoélectrique (charge de la protéine est nulle), par sa masse, sa taille ou son hydrophobicité, qui pourront changer selon les modifications de ses quatre niveaux de structure. Des modifications peuvent intervenir aux différents niveaux de structures et peuvent avoir un impact sur la stabilité générale de l'anticorps.

1.1.2.3 Sous-classes d'anticorps et impact sur leur stabilité

Quatre sous-classes d'anticorps IgG ont été identifiées (IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4), et chaque sous-classe a, en principe, une séquence de régions constantes homologues. Malgré la diversification des technologies, actuellement, la majorité des Acms sur le marché sont à 79 % des IgG1 [8].

Chaque sous-classe d'IgG a un profil unique concernant la structure (**Figure 4**), la liaison à l'antigène, l'activation du complément au niveau des CDR, le déclenchement des fonctions effectrices du système immunitaire (qui répond à un stimulus reçu par un autre centre récepteur), la demi-vie dans l'organisme [22]. Ainsi, selon les applications thérapeutiques, la sous-classe doit soigneusement être choisie; afin d'obtenir les effets thérapeutiques souhaités et pour éviter les effets secondaires.

La sélection des sous-classes est principalement dictée par les fonctions effectrices

nécessaires. Les IgG1 et les IgG3 ont une plus grande capacité à activer leurs fonctions effectrices pour déclencher une réaction immunitaire par comparaison avec les IgG2 et les IgG4 [23]. Cependant, les IgG3 ne sont pas utilisées comme candidat thérapeutique en raison de leur courte demi-vie et leur longue région charnière, qui les rendent sensible à la protéolyse (fragmentation en acides aminés) [24].

La plupart des anticorps approuvés à ce jour appartiennent à la sous-classe IgG1, pour seulement quelques anticorps IgG2 et IgG4. Néanmoins, des sous-classes IgG2 et IgG4 sont de plus en plus développés comme anticorps thérapeutiques en raison de leurs fonctions inhibitrices. De plus, les IgG2 et IgG4 ont des propriétés physico-chimiques uniques. Les anticorps humains IgG2 peuvent former des dimères covalents et des isoformes structurels par réarrangement disulfure *in vivo*. En effet, il existe deux isoformes chez les IgG2 (IgG2 A/B) en raison de différentes liaisons disulfures dans le domaine du Fab et à la région « charnière », ce qui détermine la rigidité au niveau du Fab et influence l'interaction avec l'antigène (**Figure 4**) [22]. Les anticorps IgG4 peuvent former des demi-anticorps (c'est-à-dire ceux avec une chaîne lourde et une chaîne légère) dépourvus de liaisons disulfure inter-chaînes lourdes et forment des ponts disulfures intra-chaîne. Des études récentes ont montré qu'un demi-anticorps peut être échangé avec un autre demi-anticorps IgG4, ceux qui en font de bons candidats pour la production d'anticorps bispécifique [22].

Cependant, les IgG2 et IgG4 sont instables et ont une forte tendance à s'agréger [25], [26]. Parmi les propriétés physicochimiques de ces anticorps, l'homogénéité et la stabilité sont des problèmes particulièrement critiques qui limitent le succès du développement d'applications thérapeutiques avec ces deux sous-classes [25], [27], [28]. La facilité à former des agrégats dépendrait donc de la sous-classe (IgG1 < IgG2 < IgG4). Par ailleurs, le développement de formulations d'anticorps avec des concentrations accrues sont souhaitables en biothérapie ; cependant, leur potentielle agrégation doit soigneusement être évaluée dans le cas de formulations à hautes concentrations. Il a été suggéré que les agrégats d'anticorps pourraient être corrélés à l'immunogénicité [29], [30]. Le choix de la sous-classe pourrait avoir un impact sur les phénomènes d'immunogénicité.

Une étude comparative des effets de différents stress sur chaque sous-classe a révélé que les réactions face aux stress étaient diverses en termes de dégradations physiques et chimiques pour chacune des sous-classes d'IgG [28]. Par exemple, les IgG1 seraient plus sensibles à la fragmentation, alors que les IgG2 et IgG4 seraient plus sensibles que l'IgG1 à l'agrégation à faible pH. Ainsi, l'hypothèse suivante a été proposée selon laquelle les IgG2 seraient plus résistantes à la protéolyse non enzymatique que les IgG1 pour les raisons suivantes : (1) les IgG2 sont plus courtes au niveau de la région charnière ; (2) la région charnière a une structure plus rigide en raison de la présence de quatre liaisons S-S ; (3) la séquence d'acides aminés de l'IgG2 est nettement différente de celle des IgG1 (**Figure 4**). Les différents niveaux de structure auraient donc une grande importance sur la stabilité des immunoglobulines. La stabilité de la

structure suivrait la tendance suivante IgG1 > IgG2 > IgG4 [28].

La sélection de la sous-classe d'anticorps est ainsi considérée comme de plus en plus critique dans le développement d'anticorps thérapeutiques. Le choix de la sous-classe pourrait déterminer aussi bien la tendance à l'agrégation que la stabilité des anticorps produits. Ceci est donc à considérer lors de la conception des Acms.

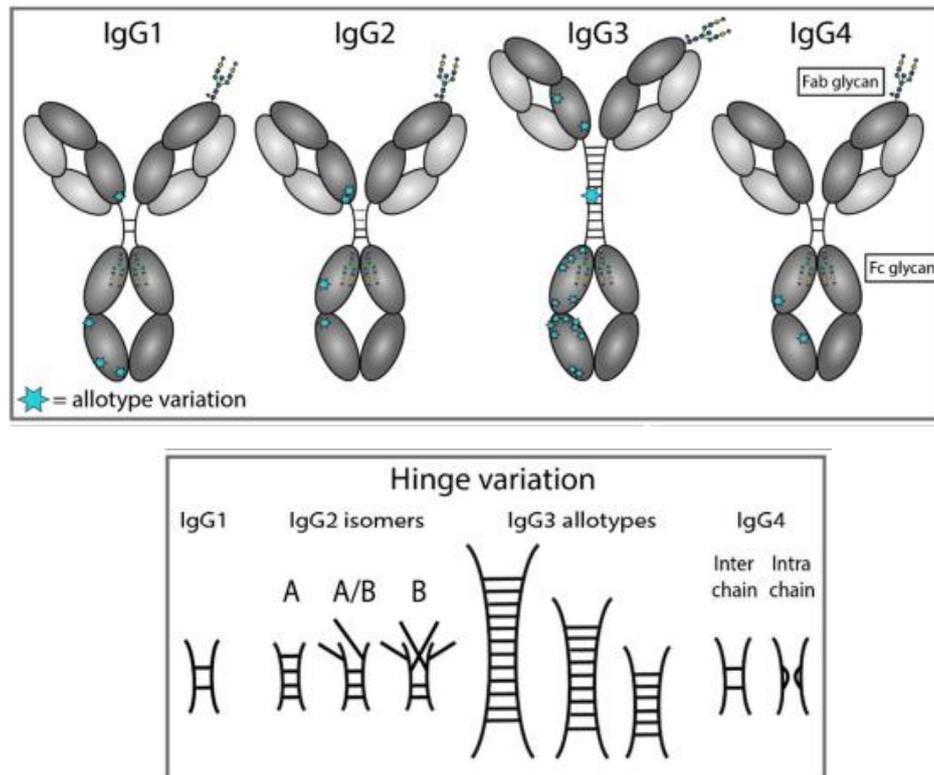


Figure 4. Variation structurale des sous-classes d'immunoglobuline G. Une représentation structurale des sous-classes d'immunoglobuline G (IgG) et de la variation au sein de ces sous-classes : variation de l'allotype et des régions charnières [22].

1.1.2.4 Relation structure et fonctionnalité

La structure générale semble déterminante pour la stabilité de l'anticorps. Il en est de même pour la séquence d'acides aminés qui constitue la structure primaire. Les activités des Acms sont associées aux fragments Fab et Fc [31].

a) Activité liée au Fab : la reconnaissance spécifique de l'antigène

La propriété première des anticorps est de se lier spécifiquement à un antigène, cette capacité est conférée par les CDR au niveau du Fab. Deux mécanismes d'actions sont référencés : le blocage des messagers circulants (pathogène) dans le but d'éviter qu'ils agissent avec leurs cibles et la liaison spécifique avec un récepteur membranaire d'une cible cellulaire pour inhiber son action. Il a été rapporté que des modifications telles que la désamidation d'une asparagine ou la glycation d'une lysine appartenant aux domaines CDR peut significativement altérer l'interaction anticorps-antigène [32], [33].

b) Activité liée au Fc : le recrutement des fonctions effectrices du système immunitaire

Une seconde propriété des IgG est leur capacité à recruter les acteurs du système immunitaire pour éliminer l'antigène. L'activation des fonctions effectrices est liée au fragment Fc de l'anticorps. Le Fc se lie avec plus ou moins d'affinités à différentes protéines du système immunitaire (les récepteurs Fc γ R, la protéine C1q). Il existe quatre fonctions effectrices que peuvent déclencher les Acms via leurs fragments Fc : ADCC (Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity), CDC (Complement Dependant Cytotoxicity), Cascades de cytokines, ADCP (Antibody Dependant Cellular Phagocytosis).

La conformation spatiale du Fc et la composition de ses glycanes ont une influence importante sur l'affinité avec ses récepteurs permettant de moduler le déclenchement des fonctions effectrices associées. De plus, des paramètres tels que la sous-classe IgG, les acides aminés et le schéma de glycosylation, entre autres facteurs, déterminent la force d'interaction du domaine IgG-Fc, et ainsi la force potentielle de leur effecteur.

Enfin, des modifications chimiques telles que les désamidations, les isomérisations et oxydation des méthionines au niveau des CDR sur les fragments Fc ont déjà été rapportées comme pouvant diminuer l'affinité avec les cibles, altérer les fonctions de l'anticorps et modifier ses propriétés pharmacocinétiques (diminution de la demi-vie) [27], [34].

c) Lien entre structure et fonction

Que ce soit dans les fragments Fab ou Fc dont les actions sont bien différentes, des modifications chimiques et structurales au niveau des CDR entraînent une diminution de l'activité biologique de l'Ac. Par conséquent, il est important de détecter les modifications et de les caractériser pour garantir l'efficacité et la sécurité des patients.

L'élucidation de la relation structure/fonction d'une protéine nécessite l'utilisation orthogonale de techniques analytiques structurales et fonctionnelles afin de comprendre les liens entre structures des protéines et activités biologiques. Ces différentes méthodes seront discutées dans le **Chapitre II**.

1.1.3 Conséquences des hétérogénéités : le risque d'immunogénicité

Le choix de l'origine des Acms, de leur sous-classe, leur environnement, les modifications des différents niveaux de structure ont une influence importante sur l'efficacité du traitement, mais également sur la santé des patients. De plus en plus, avec l'amélioration des connaissances sur les notions de risques et effets secondaires liées à l'administration des traitements, les lignes directrices des normes qualité ont été

réorientées sur l'immunogénicité et ses facteurs.

1.1.3.1 Facteurs influençant l'immunogénicité

Les produits biopharmaceutiques sont des macromolécules complexes par comparaison aux médicaments constitués de petites molécules. Un inconvénient majeur de ces produits, lié à cette complexité structurale, est la possibilité d'induire une réponse immunitaire chez les patients. Ces réponses immunitaires peuvent altérer de manière importante l'efficacité thérapeutique. Un produit biopharmaceutique est immunogène lorsqu'il stimule une réponse immunitaire suivie de la production d'anticorps par le patient dirigés contre le traitement administré. Ces anticorps sont appelés « anti-drug antibodies » (ADA). L'administration répétée de traitements immunogènes aux patients sur une période prolongée augmente généralement le risque de développer des ADA contre le médicament. De tels anticorps peuvent induire une anaphylaxie (la manifestation la plus sévère de l'allergie, le choc anaphylactique pouvant être mortel), modifier les propriétés pharmacocinétiques du traitement ou inhiber la liaison de celui-ci à son récepteur cible, rendant la biomolécule inefficace [35].

Ces dégradations que peuvent subir les traitements avant administration aux patients peuvent être la cause du développement d'une immunogénicité chez les patients. En particulier, certaines modifications chimiques (désamidation, oxydation, isomérisation, hydrolyse, glycation et hétérogénéité terminale C/N de la protéine, conduisant parfois à l'agrégation) ont été identifiées comme favorisant la réponse immunitaire après administration. Il est donc important de définir les propriétés intrinsèques des Acms utilisés dans les traitements afin de suivre ces modifications et prévenir les risques d'immunogénicité [36].

L'une des modifications les plus étudiées et rapportées comme étant fortement immunogène est le phénomène d'agrégation des molécules. L'impact des agrégats sur les patients dépend de la taille des Acms, de leur structure, de leur fonctionnalité et de la réaction du patient lui-même. Il est donc difficile de prévoir leurs conséquences sur la santé des patients [37], [38].

Différents facteurs influencent l'immunogénicité des protéines thérapeutiques. Ils peuvent être liés au produit, aux patients et à la formulation [29], [39]. Par exemple, un des facteurs les plus connus est lié à l'origine des Acms. Les premiers Acms thérapeutiques étaient d'origine murine et leurs applications cliniques étaient limitées en raison des taux élevés de production d'ADA [7], [28]. Plus tard, la production d'anticorps chimériques, humanisés, puis entièrement humanisés, ont permis la réduction majeure de ce risque lié à l'origine murine de l'Acm. Cependant, la production d'ADAs contre des anticorps entièrement humanisés tels que l'Adalimumab sont observés [40]. L'immunogénicité est également une grande préoccupation dans l'industrie des biosimilaires [41].

D'autres facteurs comme le choix de la lignée cellulaire qui détermine la présence (ou l'absence) de glycosylations, les impuretés issues du processus de production et de purification, ainsi que le transport, le stockage et nombreux stress auxquelles sont soumises les protéines (changement de température, vieillissement, la lumière, méthode de stockage, de reconstitution et d'administration...) doivent être considérés.

Comme les ADAs peuvent entraîner une diminution de la réponse aux médicaments au fil du temps et affecter directement l'efficacité et l'innocuité des protéines thérapeutiques, il est donc crucial de mieux comprendre les facteurs liés au produit qui déclenchent l'immunogénicité lors du développement de produits biopharmaceutiques.

1.1.3.2 Échappement thérapeutique après traitement par les anticorps monoclonaux

De plus en plus d'études cliniques sur les immunothérapies montrent qu'au moins 30 à 50 % des patients traités en oncologie et qui répondaient initialement correctement aux traitements développent par la suite des mécanismes d'échappement. Des processus immunitaires dirigés contre les traitements et des rechutes sont également observés [42], [43], [44].

Plusieurs mécanismes d'échappement ont été proposés pour tenter d'expliquer pourquoi une partie des patients ne répondent pas aux traitements et comment une réponse immunogène peut être déclenchée plusieurs mois après le début du traitement [43], [45]. Une des hypothèses serait que les réactions immunitaires sont liées à l'administration de traitements partiellement dégradés. Dans ce contexte, l'objectif de développer des méthodes permettant de détecter facilement ces dégradations avant administration aux patients limiterait l'échappement causé par ce facteur.

2. LES ETUDES DE STABILITE : REGLEMENTEES POUR L'INDUSTRIE, MAIS LIMITEES POUR LES HOPITAUX

1.2.1 Des enjeux forts autour de la maîtrise de la qualité des Acms

Le développement de nouveaux bioproduits a conduit à des réglementations et des normes visant à garantir leur innocuité, leur qualité et leur efficacité, en termes de commercialisation, de prescription, et d'utilisation. Afin d'évaluer la qualité des bioproduits, des propriétés physiques, chimiques, biologiques ou microbiologiques doivent être définies pour fixer des critères d'évaluation. Ces propriétés sont appelées attributs de qualité (Critical Quality Attribut, CQA) [46], [47]. Pour valider la qualité d'un produit, il faut, que chaque CQA soit situé dans des intervalles ou des distributions appropriées.

Dans ce contexte, afin de déterminer les CQA d'un produit, les autorités réglementaires recommandent d'utiliser une approche dite *Quality by Design* (QbD) lors du développement de protéines thérapeutiques [48], [49]. Cela signifie que la qualité du traitement doit être assurée par une compréhension approfondie de celui-ci et du processus par lesquels il a été produit. Les principes QbD impliquent le développement d'un profil de produit cible de qualité permettant de fixer les exigences qualité après identification des CQA.

Plus récemment, les notions de bioactivité, pharmacocinétique, risque d'immunogénicité et sécurité pour les patients ont été introduites dans la détermination des CQA [50]. Une évaluation de l'impact sur les patients est également effectuée pour déterminer l'importance des risques des attributs de qualité. Ce système d'évaluation permet de hiérarchiser les propriétés d'un produit selon leurs impacts, et ainsi de déterminer lesquelles sont dites « critiques » et donc identifiées comme CQA (**Figure 5**).

Alt et al. décrit un outil de classification permettant par le calcul de mesurer ce facteur risque. Les CQA sont alors déterminés aussi bien sur leurs effets cliniques que sur les propriétés physico-chimiques classiques attendues (structure, agrégation, modifications...). L'outil d'évaluation des CQA développé par Alt et al. est exigeant pour prouver qu'un attribut de qualité peut être déclaré non « critique » [46].

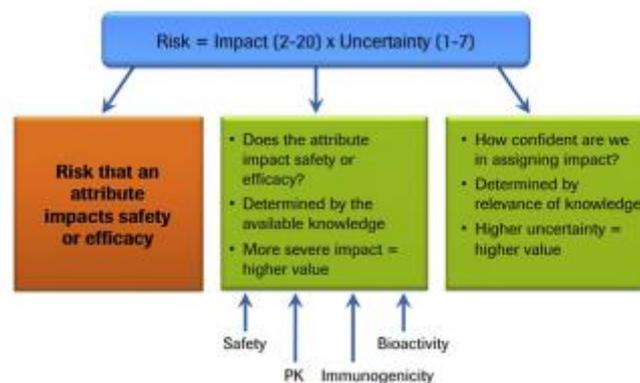


Fig. 3. Risk score defined by impact and uncertainty.

Figure 5 : Évaluation du risque pour une propriété donnée avant de la classer dans les CQA (Alt et al. 2016) [46].

Cette approche, fondée sur la notion de risque pour le patient, prise en compte dans le contrôle qualité, a été introduite seulement en 2002 par la FDA à travers l'application des normes de bonnes pratiques de fabrication (*Good Manufacturing Practice, GMP*) [51].

1.2.2 Règlementation et usages actuels en industrie

La réglementation des produits biologiques a également un impact important sur leur commercialisation. La production des biothérapeutiques est hautement réglementée

en raison de l'impact sur la sécurité des patients.

À l'échelle mondiale, des normes permettent d'harmoniser les critères d'acceptation des CQA pour trois régions (l'Union européenne, les États Unis d'Amérique, et le Japon). En particulier, l'industrie pharmaceutique s'aligne d'un point de vue réglementaire sur les normes ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) [52]. Les ICH sont établies par un comité qui s'engage à une amélioration en continu des réglementations pour la qualité des produits pharmaceutiques tout en garantissant une harmonisation sur ces trois régions. Une évolution majeure des ICH vers un contrôle qualité plus axé sur le risque a été mise en place lors de la parution des ICH Q8 (Développement pharmaceutique) [53], Q9 (Gestion des risques en qualité)[54], et Q10 (une approche qualité pour les réglementations GMP) [55], [56], [57].

L'industrie pharmaceutique est donc soumise à une approche qualité qui vise, au-delà des approbations pour commercialiser les produits, à responsabiliser les industriels vis-à-vis de la sécurité du patient. Ce changement est crucial pour la qualité des produits en développement, ou déjà sur le marché, par évolutions réglementaires en cours et à venir.

1.2.3 Contrôle qualité à l'hôpital

À l'hôpital, les objectifs de qualité ne sont pas guidés par les enjeux commerciaux, mais par la sécurité des patients, et portent sur le contrôle de produits déjà formulés. La qualité du produit repose alors sur des problématiques allant de la préparation, au stockage, au transport et à l'administration au patient. Le contrôle qualité permet de s'assurer de la stabilité du produit, et doit permettre la détection des erreurs de préparation, d'administration, ou de dosage [58].

De plus, le contrôle qualité en hôpital est confronté au manque de moyens humains et de matériels ce qui complexifie les réponses aux exigences qualités (équipement, budget, manque de personnel, formation du personnel, contrainte de temps, urgence, fatigue du personnel médical...) [58], [59], [60].

Certaines règles propres au contexte hospitalier sont alors établies afin de s'assurer de la qualité et de la sûreté des traitements administrés. Par exemple, dans le cadre de la reconstitution des produits, des règles de bonnes pratiques de préparations hospitalières et magistrales sont décrites par les autorités de chaque pays (certification par les Hautes Autorités de Santé HAS pour la France) [61].

Pour un contrôle de la stabilité du produit avant administration chez le patient, il n'y a pas d'harmonisation des procédures de contrôle analytique mises en place à l'hôpital à ce stade du cycle de vie du produit. Par exemple, en France, chaque hôpital doit se conformer à une multitude de règles (stockage, préparation, contrôle visuel...) mais chacun est libre d'ajouter un protocole de contrôle analytique supplémentaire plus ou

moins rigoureux. Dans le cas des anticorps monoclonaux utilisés à l'hôpital, étant déjà approuvés par les autorités EMA et FDA, ils ne nécessitent pas de caractérisation aussi complexe et approfondie, telle que la détermination de la micro-hétérogénéité réalisée en industrie. Cependant, l'environnement hospitalier pouvant introduire des stress, l'établissement peut procéder à des contrôles analytiques pour vérifier l'intégrité du produit. Des méthodes rapides, simples, robustes, et fiables, permettant l'identification des Acms et de leurs dégradations, pourraient permettre un contrôle qualité adapté aux contraintes hospitalières.

1.2.4 Contrôle qualité garantissant la santé des patients

1.2.4.1 Les attributs de qualité critiques

Les hétérogénéités sont introduites tout au long du cycle de vie des Acms, résultant d'erreurs à qui se produisent lors de la réplication et de la transcription de l'ADN, de la mauvaise incorporation des acides aminés, de la traduction en protéines, des modifications post-traductionnelles, de l'altération de la conformation des Acms. Celles-ci peuvent également se produire lors de la formulation, du stockage ou des manipulations hospitalières. Ces hétérogénéités se traduisent par des différences de tailles, de poids moléculaires, d'hydrophobicités, et de charges. Ces hétérogénéités peuvent porter sur la taille/masse, l'hydrophobicité et la charge et sont appelées variants [62], [63].

Aussi, une détermination des attributs de qualité adaptée aux Acms est d'une importance considérable compte tenu des risques pour la santé du patient [36].

La détermination des CQA les plus pertinentes pour un médicament donné est propre à chaque produit, et constitue une première étape décisive dans le développement d'un traitement. Celle-ci reste un défi notamment pour la santé des patients, elle nécessite de faire la différence entre les propriétés en les hiérarchisant, suivant des méthodes de prise de décisions adaptées. Néanmoins, certaines propriétés des anticorps sont traditionnellement considérées comme des CQA (**Tableau 1**) [46]. Les modifications post-traductionnelles (*Post-translational Modification*, PTM), ou modifications chimiques, et d'autres variants tels que les variants de tailles, de conformations, et de charges constituent des CQAs [62]. Le contrôle qualité évolue vers des approches dites « globales » pour déterminer les CQA via le développement de « *Quality by Design* » (QbD). Ainsi, les facteurs « risques pour le patient », pharmacocinétique, et bioactivité ont été introduits afin de limiter le nombre de CQA aux propriétés les plus impactantes pour les patients [48], [49], [64].

Tableau 1 : Liste des principaux attributs de qualité critiques selon les variants étudiés (Alt et al., 2016) [46].

Category	Quality attribute ^a
Size-related Variants	High Molecular Weight Species (HMWS) Low Molecular Weight Species (LMWS)
Charge-related Variants (Acidic)	Deamidation in CDR Deamidation in Non-CDR Glycation in CDR Glycation in Non-CDR
Charge-related Variants (Basic)	Aspartic Acid Isomerization in CDR Aspartic Acid Isomerization in Non-CDR N-Terminal Leader Sequence (may be molecule specific) N-Terminal Pyroglutamic Acid C-Terminal Lysine C-Terminal Proline (IgG1) or Leu (IgG4) Amidation
Oxidation-related Variants	Oxidation in CDR (Met, Trp) Oxidation in Non-CDR (Met, homo-variant) Oxidation in Non-CDR (Met, hetero-variant)
Fc Glycosylation	Afucosylation Galactosylation High-Mannose Sialylation (NANA, NGNA) Non-Glycosylated Heavy Chain
Structural Variants	Cysteine Forms Sequence Variants Protein Structure

1.2.4.2 PTM : Modifications chimiques à l'origine de différents variants

Les anticorps sont sujets à de nombreuses hétérogénéités, dont certaines liées à des modifications chimiques ou structurales, issues de modifications post-traductionnelles (*Post-translational Modification*, PTM) [65], [66], [67]. Les PTM ayant un impact sur la sécurité ou l'efficacité des protéines thérapeutiques sont classées comme CQA et doivent être contrôlées pour s'assurer de la qualité du produit. La cartographie peptidique par spectrométrie de masse est un outil puissant utilisé depuis de nombreuses années pour le suivi des PTM pendant le développement du produit. Cette technique permet d'accéder aux modifications sur la structure primaire (séquence) de l'anticorps [68]. Les PTM traditionnellement suivies sont : désamidation, oxydation, isomérisation, réduction de ponts disulfures, glycosylation [67], [69], [70], [71].

Depuis quelques années, en contrôle qualité, une approche dite « multi-attributs » gagne en popularité dans la communauté biopharmaceutique. Les méthodes multi-attributs (*Multiple Attribute Method*, MAM) offrent l'avantage de détecter plusieurs modifications protéiques en tant qu'attributs de qualité en une seule analyse par spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*, MS) [72], [73], [74], [75]. La MS étant connue pour sa complexité de mise en œuvre, des approches multidimensionnelles de préparation d'échantillons ont récemment été développées pour faciliter le suivi des PTM [76]. La préparation d'échantillon s'effectue donc « en ligne » par différents types de chromatographie placés en série sur plusieurs dimensions. Ainsi, les différentes

étapes de préparation d'échantillons et de séparations (sous-populations, sous-unités, peptides, variants) sont automatisées pour permettre l'évaluation de plusieurs CQA en une seule analyse MS [77], [78], [79].

Par ailleurs, sur le même principe de multiplication des dimensions, mais cette fois dans le but d'obtenir des informations complémentaires sur un même échantillon, et sans détection MS, des applications ont été développées avec les dimensions chromatographiques placées en parallèle. Cette configuration en parallèle permet de mettre en jeu différentes méthodes de séparation et différents détecteurs simultanément sur une même injection. Cela donne ainsi accès à des informations multiples, les plus complètes possibles, renseignant sur ces modifications.

1.2.4.3 PTM les plus courantes comme CQA: oxydation, désamidation, glycosylation

L'oxydation, y compris la formation de liaisons disulfures, est l'une des dégradations chimiques les plus fréquentes pouvant influencer l'activité biologique de l'anticorps. Cela peut se produire en présence d'oxydants (tels que des peroxydes, de la lumière ou des métaux) ou sans oxydant (auto-oxydation). Certains acides aminés sont particulièrement sensibles à l'oxydation, notamment les résidus de méthionine, d'histidine et de cystéine [27], [65], [80]. La formation de ponts disulfures résultant de l'oxydation peuvent être intramoléculaires ou intermoléculaires et sont renforcés dans un environnement basique ou sous l'effet de la lumière [62], [81], [82].

Par ailleurs, un autre processus majeur de dégradations chimiques des protéines est la désamidation, affectant principalement l'asparagine et, dans une moindre mesure, les résidus de glutamine. Il s'agit d'une réaction acido-basique, facilitée par la présence de résidus proches spécifiques pouvant jouer le rôle de donneurs de protons (thréonine ou sérine par exemple), qui se traduit par la formation d'un intermédiaire imide cyclique pouvant provoquer une distorsion de la structure polypeptidique [32], [33], [81], [83].

Enfin, une des hétérogénéités les plus étudiées reste la glycosylation, cette modification est localisée sur la région Fc de l'anticorps et peut donc affecter les fonctions effectrices de celui-ci. Les modifications de glycosylation affectent les oligosaccharides attachés à la région Fc qui génèrent des hétérogénéités structurelles (glycoformes) présentant des activités biologiques uniques [84]. Par conséquent, des techniques d'analyse de glycanes, efficaces et quantitatives, font partie des analyses les plus souvent réalisées lors du développement des anticorps thérapeutiques [62], [85], [86], [87].

1.2.5 Autres CQA standard : taille, conformation, charge

1.2.5.1 Variants de taille

L'agrégation est une source courante d'instabilité des protéines dont les mécanismes

n'ont encore pas clairement été identifiés [63], [88]. Les protéines peuvent s'agréger pour diverses raisons, il en résulte des propriétés différentes selon le type d'interactions physiques ou chimiques : les agrégats peuvent être associés de manière covalente (ponts disulfures [89], liaisons di-tyrosines, [90], et autres possibles liaisons covalentes) ou non covalente (interactions de Van der Waals, liaisons hydrogène, interactions hydrophobes et électrostatiques). Les agrégats peuvent être solubles ou insolubles [38], ils peuvent être de différentes tailles ; de petits dimères jusqu'aux particules visibles [91], [92]. De nombreux facteurs environnementaux peuvent provoquer ou moduler l'agrégation des protéines, et affecter notamment le repliement des Acms [93], [94]. Ces facteurs peuvent être, par exemple, le type de tampon [92], le pH et la force ionique [91], la concentration en protéines, les contraintes physiques telles que l'agitation [95], le cisaillement, la température, la congélation-décongélation [96]. L'agrégation peut se produire à n'importe quelle étape de la production des anticorps, de leur stockage et de leur manipulation. Parmi les différentes voies de dégradation, l'agrégation des protéines a été très étudiée car elle est un facteur d'immunogénicité majeur, ce qui en fait un attribut de qualité standard pour les protéines thérapeutiques [36].

La fragmentation des Acms peut se produire sur des liaisons disulfures ou des liaisons peptidiques. La rupture des liaisons disulfures entraîne la formation de fragments de chaîne (chaîne légère et chaînes lourdes libres) [97].

Quel qu'en soit le type, lorsque les interactions sont rompues, des espèces de faibles poids moléculaires, de natures et de tailles différentes sont formées par des mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques. La localisation des fragmentations est importante et dépend aussi bien de la sous-classe de l'anticorps (stabilité des régions charnière [22]) que de la cause de cette fragmentation (enzymatique ou environnementale).

L'impact de la fragmentation sur l'efficacité du traitement dépend du fragment résultant. Selon les propriétés de celui-ci, une perte d'activité biologique, un temps de demi-vie réduit, et une immunogénicité (due à la génération de nouveaux épitopes stimulant la formation d'ADA) peuvent être observés [62], [97].

1.2.5.2 Variants de structure et conformation

Les protéines sont des structures tridimensionnelles complexes capables de modifier considérablement leur conformation en réponse à leur environnement [10]. Des changements de conformation peuvent se produire tout au long du processus de fabrication et peuvent avoir un certain nombre de causes, notamment des modifications chimiques telles que l'oxydation et la désamidation [62]. Les altérations de la structure tridimensionnelle des protéines et les mauvais repliements de structure peuvent entraîner la perte d'activité biologique et la formation de nouveaux épitopes avec un potentiel immunogène. La caractérisation structurale des anticorps et la compréhension approfondie des processus de production sont nécessaires pour

déterminer les CQA et concevoir une stratégie de contrôle efficace. Les données structurales doivent être étayées par des données fonctionnelles pour établir une relation structure-fonction. Ces données peuvent ensuite être utilisées pour définir l'impact de la structure des différents variants sur l'activité du produit [98].

1.2.5.3 Variants de charge

Une des caractéristiques les plus importantes des Acms est liée aux hétérogénéités de charges, celles-ci peuvent découler d'un grand nombre modifications (chimiques, structurales), y compris des modifications communes à de nombreux Acms, ou uniques à une molécule, ou à un processus spécifique. Les variants de charges font souvent parti des attributs de qualité à hauts risques qui pourraient potentiellement ne pas répondre aux exigences de qualité [47], [99], [100].

De nombreuses voies de dégradations chimiques, et notamment la déamidation, l'oxydation, l'isomérisation et la fragmentation, sont responsables de la formation de variants de charges et d'hétérogénéités, qui peuvent également avoir une influence sur l'immunogénicité des patients [101]. Ces modifications provoquent un déplacement du pI apparent, entraînant la production de formes acides et basiques de la molécule.

Les variants de charges avec des points isoélectriques intrinsèques (pI) inférieurs à celui des populations principales sont des variants acides, tandis que ceux avec des valeurs de pI plus élevées sont des variants basiques. Les variants acides typiques sont les espèces avec des désamidations ou glycations. Les variants basiques incluent les lysines non transformées C-terminale, les amidations C-terminale, les isomérisations [102], [103].

Tableau 2 : Listes des modifications qui forment des variants acides et basiques (adapté de Du et al. 2012)[103].

Acidic species	Basic species
Sialic acid	C-terminal Lys
Deamidation	N-terminal Glu
Non-classical disulfide linkage	Isomerization of Asp
Trisulfide bonds	Succinimide
High mannose	Met oxidation
Thiosulfide modification	Amidation
Glycation	Incomplete disulfide bonds
Modification by maleuric acid	Incomplete removal of leader sequence
Cysteinylation	Mutation from Ser to Arg
Reduced disulfide bonds	Aglycosylation
Non-reduced species	Fragments
Fragments	Aggregates

Le non-respect du profil de charges type, défini dans les CQA lors du développement, est donc dû à des modifications provoquées, le plus souvent, par des facteurs environnementaux. En industrie, ces facteurs peuvent provenir des étapes de production ou de conservation ; tandis qu'à l'hôpital ils peuvent être liés au stockage, à la préparation et aux manipulations hospitalières.

3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE I

Ce premier chapitre a permis de mettre en valeur la complexité des anticorps et de leurs hétérogénéités, aussi bien à travers une étude de l'évolution de la conception de ces protéines, que grâce aux approches de contrôle qualité. Les anticorps sont donc des molécules dont la stabilité dépend fortement de leur environnement, et peut avoir un impact sur l'efficacité des traitements et la sécurité des patients. Pour limiter les risques, des méthodes de contrôle analytique approfondies et règlementées ont été mises en place dans l'industrie. Cependant, dans les hôpitaux, bien qu'un contrôle aussi important ne soit pas nécessaire, une vérification de l'intégrité des traitements avant administration au patient permettrait de limiter au maximum les risques d'immunogénicité et les échappements cliniques. Dans les chapitres suivants nous aborderons les stratégies analytiques mises en place en industrie pour chacune des CQA ainsi que des voies d'amélioration du contrôle qualité à l'hôpital.

2 CHAPITRE II : METHODES ANALYTIQUES POUR LA CARACTERISATION DES CQA

La stabilité d'un anticorps influence son activité thérapeutique (i.e. affinité, efficacité thérapeutique, effets secondaires). La dégradation des Acms peut résulter de différents mécanismes et être divisée en deux types : les instabilités chimiques et physiques. Celles-ci sont étroitement liées, car des modifications chimiques peuvent entraîner une instabilité physique, et une instabilité physique peut rendre accessible des résidus chimiquement sensibles. Il est, par exemple, possible de détecter la présence de plusieurs modifications chimiques dans les agrégats ; sans pour autant conclure si ces modifications existaient ou non avant l'agrégation [104].

Dans ce chapitre, les différentes hétérogénéités et les méthodes les plus utilisées pour les étudier seront présentées, en divisant le chapitre en **(1)** dégradations chimiques et **(2)** dégradations physiques.

1. DEGRADATIONS CHIMIQUES

2.1.1 Variants de charge

Les variants de charges sont les hétérogénéités les plus couramment observées chez les anticorps monoclonaux. Celles-ci peuvent provenir de modifications chimiques (PTM) ou structurales. Ces variants peuvent être acides, basiques et neutres. Par exemple, les résidus de lysines supplémentaires à l'extrémité C-terminale du fragment Fc des Acms conduisent à une augmentation de variants basiques. La désamidation, les réactions de glycation, les additions d'acides sialiques, les N et O-glycosylations conduisent à la production de variants acides [47], [99], [100].

L'efficacité et le pouvoir thérapeutique des Acms peuvent être altérés par la présence de différents variants de charges issus de modifications chimiques, de fragmentations, d'agrégations, d'oxydations ou de désamidations situées sur des résidus d'acides aminés spécifiques [103]. L'importance de ces altérations peut également être liée aux sites sur lesquelles les modifications ont lieu.

On distingue deux approches pour identifier les variants de charges d'un Acme donné [105], [106]. La première est une approche de référence fondée sur la chromatographie échangeuse d'ions (*Ionic Exchange chromatography*, IEX) couplée avec différents détecteurs (MS, UV, FLD). Celle-ci permet de séparer les variants de charges par un mécanisme d'échange d'ions à l'aide d'une phase stationnaire présentant des charges à sa surface et d'un tampon d'élution. Dans le cas des anticorps, l'IEX la plus couramment utilisée reste la chromatographie échange de cations (*Cation Exchange chromatography*, CEX) [107], [108].

La seconde approche pour caractériser des variants de charges est fondée sur la mobilité électrophorétique des molécules, séparant les différents variants par migration sous champ électrique. L'électrophorèse était, au départ, effectuée sur gel, elle est maintenant miniaturisée et réalisée dans des capillaires de silice. Comme en chromatographie, l'électrophorèse capillaire (*Capillary Electrophoresis*, CE) regroupe de nombreux modes fondés sur différents mécanismes de séparation, tels que l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), l'électrophorèse sur gel capillaire et la focalisation isoélectrique capillaire (IEF) [103].

Dans cette partie, nous détaillerons les approches IEX et CE, en nous focalisant plus particulièrement sur la CZE comme méthode standard de CE, et l'IEF, qui est la technique utilisée lors de mes travaux de thèse [109].

2.1.1.1 Chromatographie échangeuse d'ions

La méthode historique pour l'analyse des variants de charges est la chromatographie d'échange d'ions (*Ionic Exchange Chromatography*, IEX). Cette méthode est encore très largement recommandée dans la réglementation ou la pharmacopée pour la caractérisation des Acms [108]. L'IEX sépare les variants de charge et donne la possibilité de collecter des isoformes pour une identification ultérieure des protéines, souvent par analyse MS [110], [111], [112]. Cette méthodologie est appliquée depuis des années avec succès, permettant d'identifier un large éventail de PTM tels que les modifications N- et C-terminales, la désamidation, l'isomérisation, l'oxydation, la fragmentation, l'agrégation, la glycation [31], [113].

Les mécanismes de rétention de l'IEX reposent sur la séparation des Acms en fonction de leurs charges nettes en surface, la distribution de charges de surface et la géométrie de la molécule.

a) Principe de la chromatographie échangeuse d'ions

La colonne IEX est constituée de ce que l'on appelle « l'échangeur d'ions », une résine qui, grâce à un revêtement fonctionnalisé, de charges opposées à celles des molécules cibles, permet la rétention de celles-ci. La force d'interaction de la liaison résines-protéines à une condition donnée détermine son temps de rétention et son élution. Les différences d'interactions entre les molécules permettent une séparation sélective [108].

Échangeur d'anions ou de cations

Parmi les différents modes d'IEX, la chromatographie d'échange de cations (*Cation exchange chromatography*, CEX) est l'approche la plus efficace pour la purification et la caractérisation des Acms [114]. La CEX est considérée comme référence pour l'analyse des anticorps, les paramètres de la méthode, tels que le type de colonne, le pH de la phase mobile et le gradient de concentration en sel ou le gradient de pH, doivent être optimisés pour chaque Ac.

Par exemple, Bai et al. ont étudié l'effet des trois variables indépendamment (phase stationnaire, pH de la phase mobile et nature de la phase mobile) et ont découvert que le pH de la phase mobile était le paramètre le plus important dans les séparations CEX des protéines [115]. En effet, pour les colonnes faiblement échangeuses d'ions, les variations de pH influencent les groupes fonctionnels (charge du revêtement de la colonne) de la phase stationnaire, le pH de la phase mobile doit être adapté pour chaque type de colonnes et chaque Acm. Enfin, les chromatogrammes de l'IgG4 (**Figure 6A**) montrent que le pH ayant permis la meilleure sélectivité est celui à pH 5,5 avec un tampon acétate (20 mM).

Cette étude a également démontré que ; (i) la largeur du pic des IgGs dépend principalement du type de phase stationnaire, (ii) la résolution peut être améliorée en modifiant la pente du gradient (**Figure 6B**).

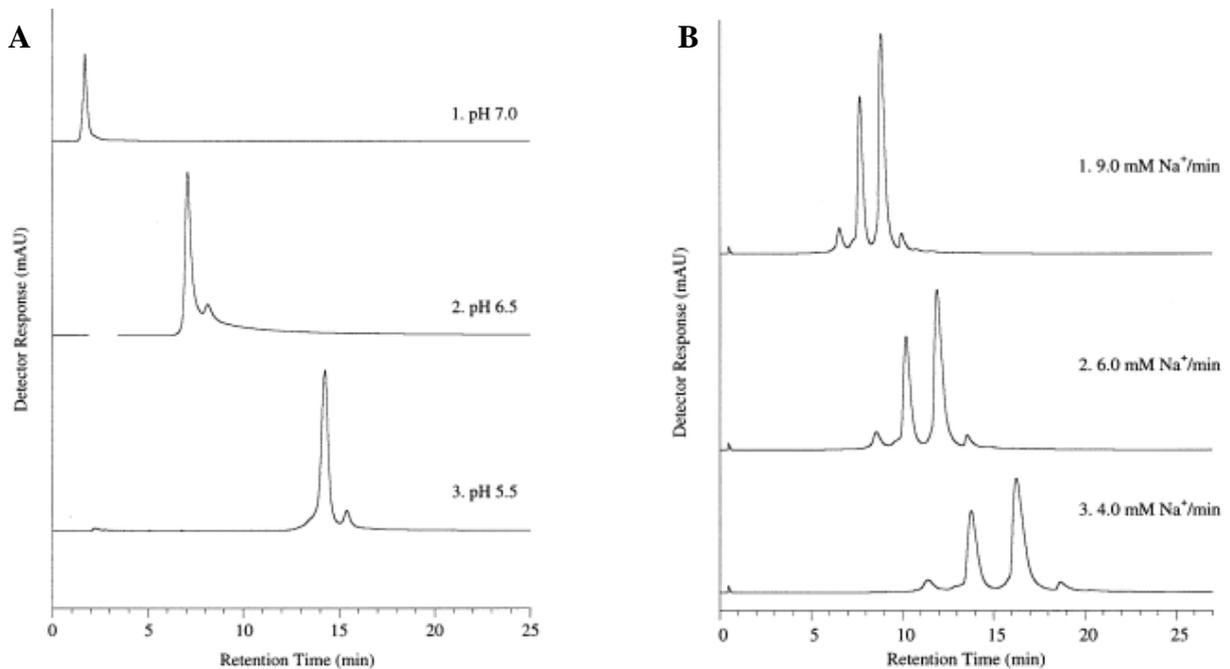


Figure 6 : Résultats de l'étude de Bai et al (**A**) étude d'un IgG4 avec différents tampons (1.) tampon phosphate 20 mM pH 7, (2.) tampon phosphate 20 mM pH 6.5, (3.) tampon acétate 20 mM pH 5.5. Phase mobile A : 20 mM du tampon salin, Phase mobile B : Phase A + 1 M de NaCl pour une élution de 0 à 20% de phase B en 30 min. Colonne : Phodex SP-825. (**B**) Étude des pentes de gradients de sels pour un IgG1, Phase A : 40 mM de phosphate pH 6.5, Phase B : phase A + 1 M NaCl, (1.) 9 mM Na⁺/min, (2.) 6 mM Na⁺/min, (3.) 4 mM Na⁺/min. Colonne : Mini S. [115]

En CEX, une résine chargée négativement est utilisée pour retenir les molécules chargées les plus positivement, tandis qu'une résine chargée positivement est utilisée

dans le cas de l'AEX pour les molécules chargées négativement (**Figure 7A**). Le pic avec l'intensité la plus élevée est appelé variant principal. Dans le cas de la CEX, les variants de charges élués avant le pic principal sont considérés comme les variants acides, tandis que ceux élués après le pic principal sont les variants basiques. Dans le cas de l'AEX, ce sera l'inverse.

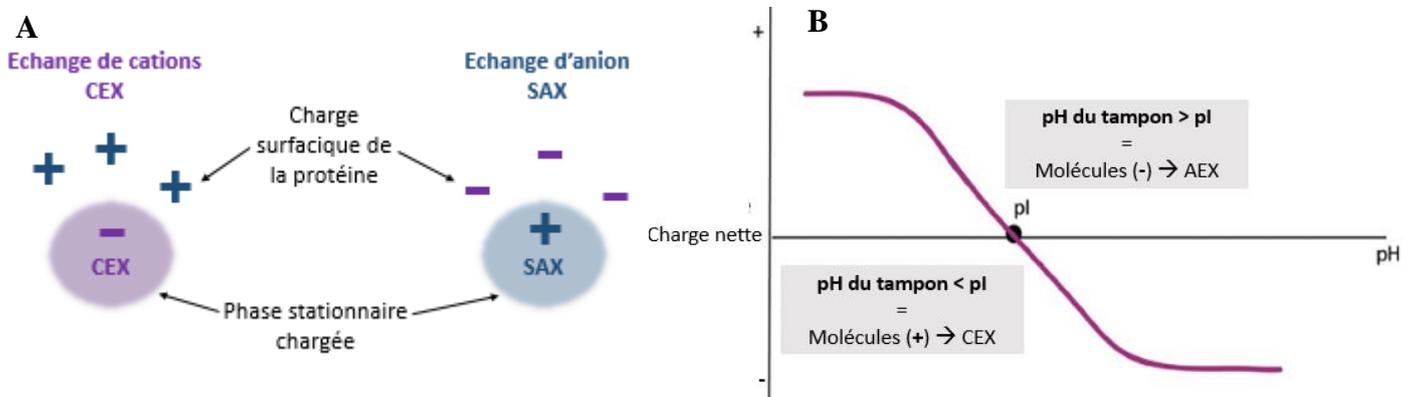


Figure 7 : (A) Principe de l'échange de cation versus l'échange d'anion (B) Schéma de l'évolution de la charge d'une protéine en fonction du pH, point isoélectrique (pI)

Le choix de la CEX ou l'AEX dépend du pH du tampon et est fonction des anticorps étudiés, plus particulièrement de leur point isoélectrique (pI) qui correspond au pH à laquelle la molécule est globalement neutre (**Figure 7B**) [116]. Bien que les anticorps soient le plus souvent étudiés en CEX d'un pI souvent >7, des études font état d'analyse d'Acms par chromatographie d'échange d'anions (*Anion exchange chromatography*, AEX), donnant accès à une autre sélectivité [117], [118].

Après le choix de l'échangeur (CEX ou AEX), deux aspects principaux de la phase stationnaire doivent être considérés : (1) la force de l'interaction, la rétention associée (échangeur d'ions fort ou faible) et (2) l'efficacité des pics.

Échangeurs forts ou échangeurs faibles

Les échangeurs de cations faibles (*Weak Cation Exchange*, WCX) contiennent un acide faible dont l'ionisation varie à mesure que le gradient de pH ou de force ionique varie (par exemple, les groupes carboxyméthyle) [119], tandis que les échangeurs de cations forts (*Strong Cation Exchange*, SCX) contiennent un acide fort capable de maintenir sa charge sur un large intervalle de pH (e.g. 2-12) (par exemple, les groupes sulfopropyle) [120]. Le même principe est retrouvé pour les phases stationnaires échangeuses d'anions. Celles-ci peuvent être des échangeuses d'anions faibles (*Weak Anion Exchange*, WAX) ou forts (*Strong Anion Exchange*, SAX) [117], [121]. En règle générale, il est préférable de commencer le développement de la méthode avec un échangeur fort permettant d'effectuer des analyses sur une large gamme de pH [122]. Les échangeurs forts sont généralement utilisés si une résolution maximale est obtenue à

un pH très bas ou très élevé. Les échangeurs faibles sont particulièrement intéressants, si la sélectivité des échangeurs d'ions forts n'est pas satisfaisante. Cependant, il est à noter que la capacité d'échange d'ions des échangeurs d'ions faibles peut varier avec le pH. La **Figure 8**, compare des chromatogrammes obtenus, après analyse d'un Acm, l'Infliximab, à l'aide d'une phase stationnaire échangeuse de cations faibles (BIO MAb NP10, 250 mm × 4,6 mm, Agilent) en utilisant des phases mobiles de pH différents [119]. Pour cette expérience, le tampon (Na_2HPO_4 10 mM) a été sélectionné et différentes gammes de pH ont été testées. Les valeurs seuils de ces gammes de pH étaient de 4,0, 6,0 et 7,0, et les valeurs supérieures de 7,0, 8,1, 9,0 et 10,0. Les résultats obtenus ont montré que la durée d'élution a augmenté avec une diminution de la valeur seuil minimale du pH du gradient (donc un intervalle de pH plus étendu 4-8 au lieu de 6-8) (**voir Figure 8A, B et C**) ce qui était attendu. De même, la durée d'élution a augmenté quand la gamme de pH est passée de 6-7 à 6-10. Ces augmentations de la durée d'élution ont permis d'aboutir à la séparation incomplète de deux pics (complètement confondus auparavant) du profil chromatographique de l'Infliximab.

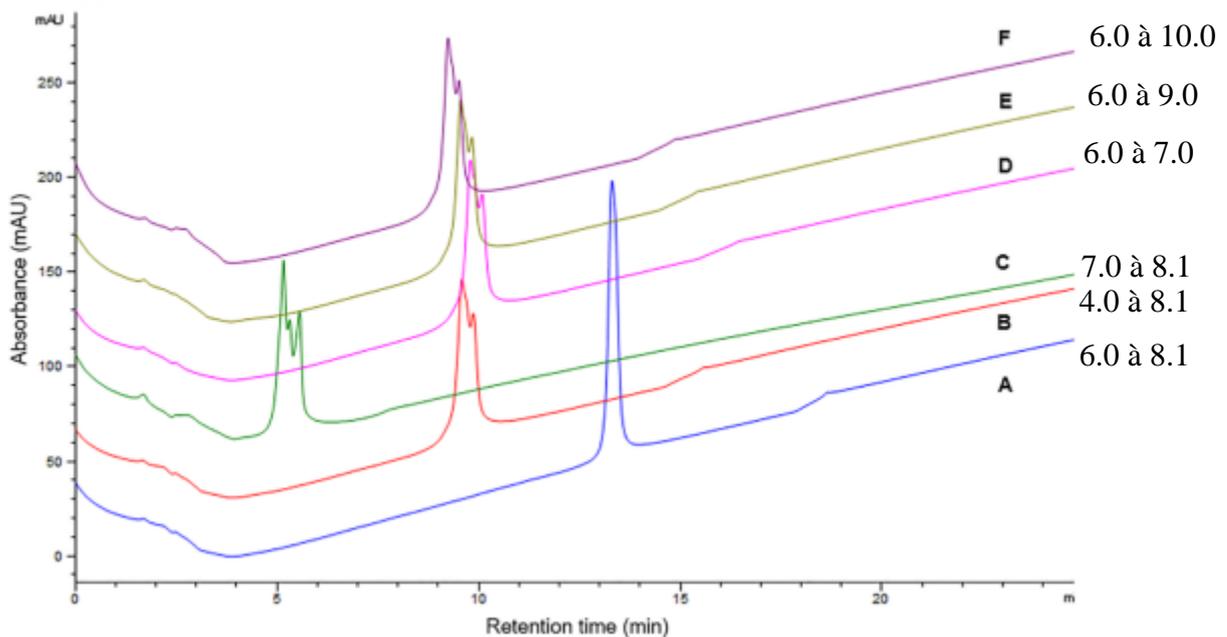


Figure 8 : Optimisation de la méthode WCX basées sur les fenêtres de gradient de pH dans la phase mobile en utilisant l'Infliximab (INF) 2,0 mg/mL comme échantillons modèles : 6,0 à 8,1 (A), 4,0 à 8,1 (B), 7,0 à 8,1 (C), 6,0 à 7,0 (D), 6,0 à 9,0 (E) et 6,0 à 10,0 (F). (A. Martínez-Ortega et al.) [119]

b) Chromatographie d'échange d'ions : modes d'élutions

En IEX, il existe deux modes d'élution distincts : une élution par augmentation de la force ionique [123] ou par augmentation du pH [124] au cours du gradient. Le gradient de pH modifie la charge nette de la molécule au fur et à mesure de son évolution, ce qui permet la neutralisation des charges et l'élution sélective des molécules au cours

du temps [122]. La **Figure 9** montre qu'il est possible de réaliser une analyse d'Acms par IEX (gradient de force ionique ou de pH). 10 Acms utilisés en thérapeutique ont ainsi été analysés. En plus de la séparation des variants de charges, la chromatographie IEX basée sur le gradient de pH peut également être utilisée pour évaluer le pI des Acms intacts.

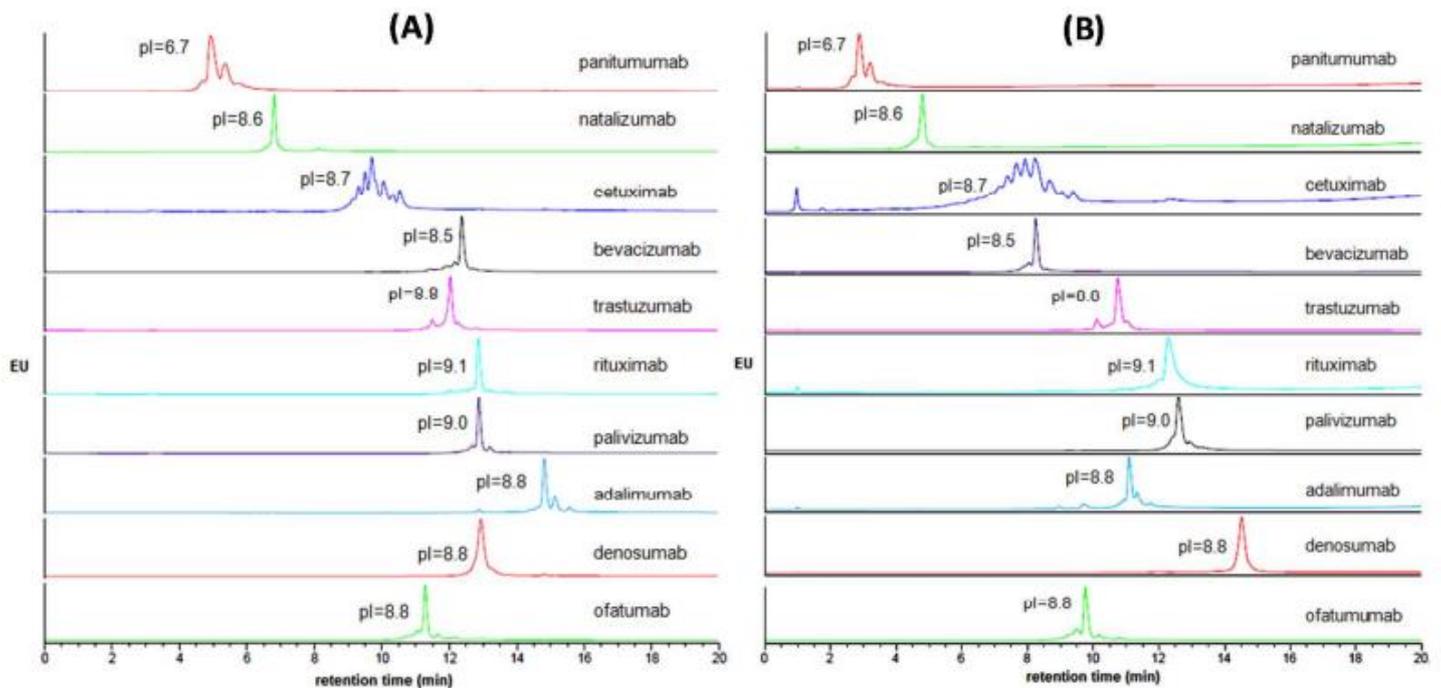


Figure 9 : Comparaison d'électrophérogrammes de 10 anticorps différents dont les variants de charges sont séparés en CEX par **(A) gradient de force ionique** (Phase mobile A : 10 mM MES pH 5.7; Phase mobile B : 10 mM MES pH 5.7 + 1 M NaCl ; gradient : 0–20% B en 20 min), [123] et **(B) gradient de pH** (Phase mobile phase A (Thermo Fisher Scientific) : « CX-1 Buffer A » à pH 5.6, phase mobile B (Thermo Fisher Scientific) : « CX-1 Buffer B » à pH 10.2 ; gradient : 0–100%B en 20 min). Colonne SCX (Sacroma) : YMC BioPro SP-F (100 × 4,6 mm), Débit : 0,6 ml/min [124].

Depuis quelques années, un nouveau mode d'éluion fondé sur la combinaison des gradients de sels et de pH a été proposé. Celui-ci est nommé gradient de pH médiée par le sel (salt-mediated pH gradient) [125]. L'intérêt de ce type de gradient est qu'il a permis notamment d'améliorer la rétention des Acms à faibles pI et la résolution des Acms à pI élevé (pI de 6.2-9.4) [126]. Il est d'ailleurs possible avec le même gradient d'obtenir des profils différents selon les anticorps, cela permet ainsi d'apporter une méthode intéressante pour leur identification (**Figure 10**). De plus, Ortega et al. ont également montré que la rétention avec ce type de gradient ne dépend pas uniquement de la charge de surface, ni de la charge globale de la protéine (pI) [119].

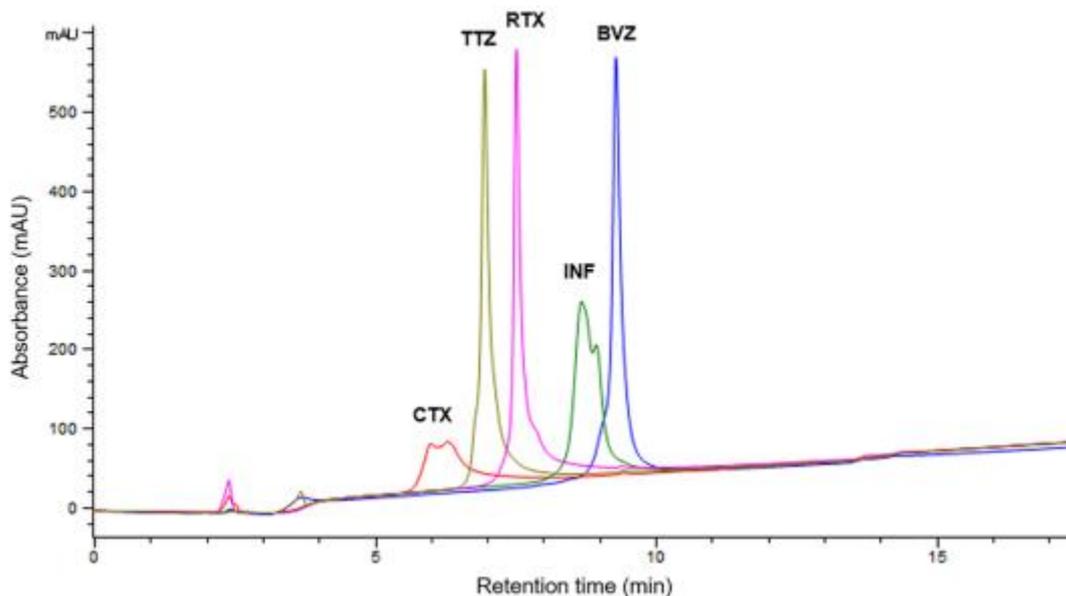


Figure 10 : Superposition de chromatogrammes obtenus en WCX sous un gradient de pH médié aux sels de quatre anticorps, Cetuximab (CTX, pI 8,8), Infliximab (INF, pI 7,6), Trastuzumab (TTZ, pI 9,0), Rituximab (RTX, pI 9,4), Bevacizumab (BVZ, pI 8,3). Colonne : Bio MAb NP10, 250 mm × 4,6 mm (Agilent), Phase mobile A : Na₂HPO₄ 10 mM à pH 6,0, Phase mobile B : Na₂HPO₄ 10 mM et NaCl 1M à pH 8, Gradient : 10-100%B en 20 min. (Ortega, 2022) [119].

En effet, il est possible d'observer **Figure 10**, que le CTX est élué à un pH plus faible. Il est suivi du Trastuzumab (TTZ, pI 9,0), du Rituximab (RTX, pI 9,4), de l'Infliximab (INF, pI 7,6) et du Bevacizumab (BVZ, pI 8,3). Étonnement, l'AcM présentant le pI le plus faible, l'INF est élué en quatrième position, et celui avec le pI le plus élevé, le RTX est élué en troisième. Ces résultats indiquent que le comportement des AcMs élués dans des conditions combinant gradient de pH et de sels ne dépend pas seulement de leur charge. En effet, dans le cas de protéines de poids moléculaires élevés, la charge de surface n'est pas le seul facteur qui influence les processus de séparation chromatographique, la conformation peut également avoir un impact. Aussi, il est difficile de prédire l'ordre d'élué en se basant uniquement sur le pI.

2.1.1.2 L'électrophorèse capillaire

a) Le principe de l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse est fondée sur l'application d'une tension aux extrémités d'un capillaire de silice modifiée (revêtement de capillaire). L'échantillon est injecté dans un capillaire rempli par un tampon d'analyse (*Background electrolyte*, BGE), puis une tension (15 à 30 kV) est appliquée sur les deux extrémités du capillaire (immergées dans un réservoir contenant du BGE) ce qui entraîne la migration des molécules. La détection sur le capillaire est effectuée via une fenêtre optique créée directement sur le capillaire. Cette méthode d'analyse très résolutive permet de limiter l'élargissement des pics, en particulier, en limitant la dilution par les volumes morts, contrairement à la

chromatographie.

L'électrophorèse de zone (*Capillary Zone Electrophoresis, CZE*) est un mode de CE classique qui sépare les analytes en fonction de leur rapport charge sur rayon hydrodynamique (z/m) sous un champ électrique élevé en présence d'un flux électroosmotique [127], [128], [129].

La **Figure 11** montre qu'une analyse d'Acms (pI de 7,4 à 9,5) par CZE est possible. Pour chaque Acms, un profil démontant les hétérogénéités de charges a été obtenu [130].

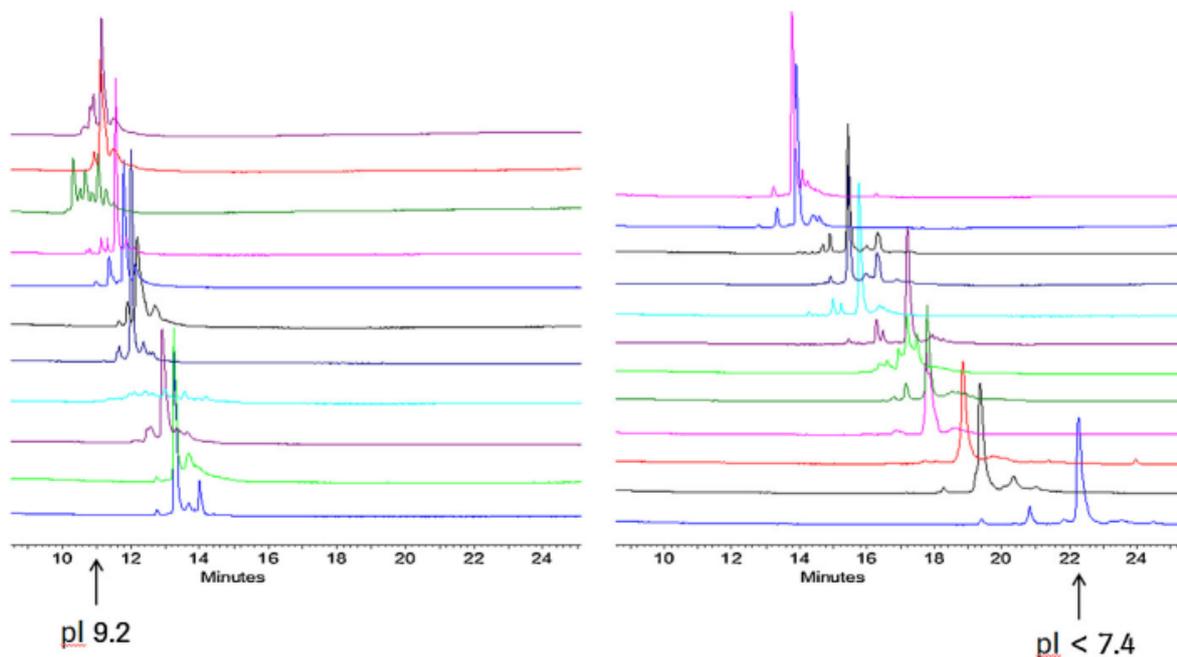


Figure 11 : Superposition d'électrophérogrammes issus de séparations en CZE de 23 Acms avec des valeurs de pI de 7,4 à 9,5. Les séparations ont été réalisées dans un capillaire de 40/50 cm (longueur de séparation entre l'entrée du capillaire et fenêtre de détection/longueur totale) avec un diamètre intérieur de 50 μ m. (Moritz et al. 2015)[130].

La mobilité apparente des molécules lors de la séparation CZE résulte de la combinaison de deux phénomènes : l'électroosmose et l'électromigration des analytes [131]. Ces deux phénomènes seront détaillés dans les parties suivantes.

b) Flux électro-osmotique

Les capillaires en silice fondue typiquement utilisés pour les séparations comportent des groupes silanols ionisables chargés négativement (SiO^-). La paroi chargée négativement attire les cations du BGE, en créant une double couche électrique : une couche fixe et compacte, et une couche diffuse.

Lorsque la tension est appliquée, le déplacement des électrolytes de la couche diffuse est appelé flux électroosmotique (*Electro Osmotic Flow, EOF*). Le flux électroosmotique peut être défini par l'équation 1 ; vitesse électroosmotique v_{eo} ($m.s^{-1}$) de la mobilité électroosmotique μ_{eo} ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$) et E ($V.cm^{-1}$) : du champ électrique appliqué.

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E \quad (1)$$

La mobilité électroosmotique dépend du milieu (composition, pH, force ionique, viscosité du BGE) ainsi que de la chimie de surface et de la nature du capillaire. Notons ici qu'il est possible de modifier cette surface par des traitements spécifiques, notamment par superposition de plusieurs couches de charges opposées. Cela permet de contrôler la charge de surface que l'on souhaite obtenir et permettent d'éviter les adsorptions sur le capillaire de silice [132], [133].

La **Figure 12** représente le capillaire avec les deux couches (les silanols déprotonés en première couche, les cations du BGE en seconde couche) et le déplacement des ions dans le capillaire sous l'effet d'un champ électrique.

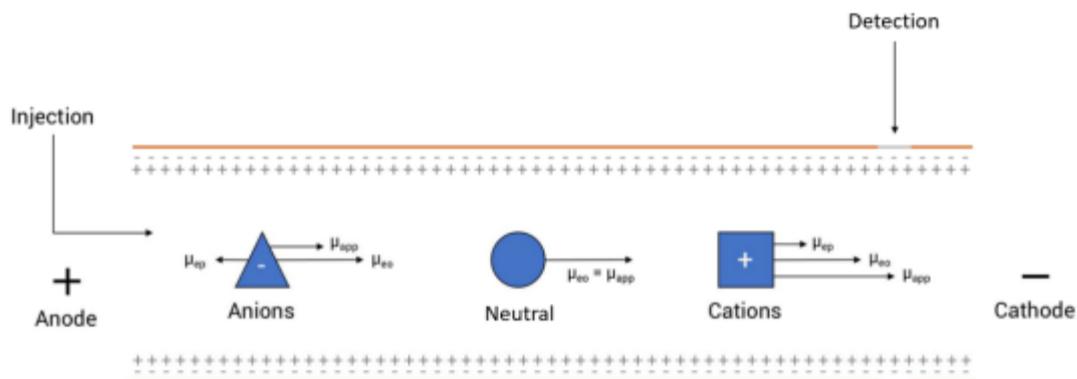


Figure 12 : Représentation schématique de l'électrophorèse capillaire (mobilité électrophorétique, mobilité électroosmotique, mobilité apparente).

c) Mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique correspond au déplacement d'une espèce chargée sous un champ électrique. Cette espèce est attirée vers l'électrode de polarité opposée à sa charge à la vitesse v_{ep} ($m.s^{-1}$), dépendante de la mobilité électrophorétique de l'espèce μ_{ep} ($m^2.V^{-1}.cm^{-1}$) et du champ électrique appliqué E ($V.cm^{-1}$) décrit dans l'équation 2 :

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad (2)$$

La mobilité électrophorétique est propre à chaque composé et aux propriétés

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6. \pi. r_h. \eta} \quad (3)$$

physicochimiques de l'électrolyte. La mobilité électrophorétique μ_{ep} d'une espèce dépend de son rayon hydrodynamique r_h , ainsi que de sa charge q et de la viscosité du BGE η , donc plus généralement de sa densité de charge (équation 3).

À charge égale, par exemple, un cation de faible taille se déplacera plus vite qu'un cation de taille supérieure. La migration des espèces sous l'effet du champ électrique ayant le même rayon hydrodynamique est donc dépendante de leurs charges. Dans le cas de l'analyse de protéines à groupements ionisables, le pH de l'électrolyte joue de ce fait un rôle majeur puisqu'il détermine l'état de charge de la protéine, et ainsi la mobilité électroosmotique de celle-ci. En CZE, la migration d'une espèce est caractérisée par sa mobilité apparente μ_{app} , qui correspond à la somme de la mobilité électroosmotique μ_{eo} et de la mobilité électrophorétique μ_{ep} dans l'équation 4 :

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (4)$$

La CZE a particulièrement été utilisée ces dernières années pour l'étude de certaines PTM en contrôle qualité [134], [135], et de plus en plus de méthodes ont été développées pour le couplage CE-MS en conditions natives pour l'étude des dégradations [129].

Néanmoins, bien que de nombreuses méthodes CE-MS se soient développées ces dernières années, le type de détection le plus couramment utilisé pour sa simplicité d'exécution et d'interprétation est l'UV-visible. Cependant, dans de nombreux cas, ce mode de détection est insuffisant en termes de sensibilité de détection et de sélectivité. Pour obtenir une détection plus sensible, la détection par fluorescence induite par laser (*Laser Induced Fluorescence*, LIF) peut-être employée.

2.1.1.3 Focalisation isoélectrique capillaire

a) Principe de la focalisation isoélectrique capillaire

La focalisation isoélectrique capillaire (*capillary isoelectro focusing*, cIEF) a été proposée pour la première fois sur un instrument d'électrophorèse capillaire (CE) par Hjerten et Zhu en 1985 [136].

Cette méthode permet une séparation des protéines selon leurs points isoélectriques (pI) dans un gradient de pH formé par des ampholytes porteurs lorsqu'un potentiel électrique est appliqué au niveau du capillaire [137], [138]. Les ampholytes sont des amphotères, c'est-à-dire, des espèces pouvant agir comme une base ou un acide selon le pH. En cIEF, l'intérêt de ces espèces est leur point isoélectrique. En effet, un mélange de nombreux ampholytes de pI légèrement différents peut être sélectionné pour couvrir la gamme de pH souhaitée et créer le gradient de pH nécessaire à la séparation des variants de charge.

À l'équilibre, les ampholytes forment un gradient de pH stable dans lequel les protéines sont immobilisées au pH où leur charge nette est nulle, autrement dit lorsque le pH équivaut à leur pI. Un des avantages de la cIEF est son pouvoir de résolution élevé dû à l'effet de focalisation important de cette technique. De plus, en comparaison avec les autres techniques de CE, la cIEF présente une excellente dissipation thermique dans les capillaires en silice présentant un revêtement à leur surface permettant d'effectuer des séparations à des intensités de champ très élevées pour atteindre l'équilibre en quelques minutes (5 à 30 min).

Par ailleurs, la cIEF (par rapport à l'IEF), présente les avantages de l'automatisation et de la quantification. Cependant, malgré ces avantages et les progrès réalisés ces dernières années, la cIEF n'est toujours pas considérée comme méthode de choix pour caractériser la charge des protéines thérapeutiques. La raison principale est liée aux défis associés à ces méthodes cIEF sur ces instruments CE commerciaux à usage « classique » [139]. Les premiers travaux relatifs à l'analyse des Acms par cIEF ont été réalisés en 1992. Ceux-ci ont montré qu'il était possible de réaliser une analyse d'anticorps monoclonaux en réalisant successivement une étape de focalisation puis une étape de mobilisation. Cependant, les résultats obtenus ont montré une faible reproductibilité (RSD 33%) du temps de migration [140].

En effet, après migration/focalisation des protéines, celles-ci doivent ensuite être déplacées devant le détecteur lors d'une étape supplémentaire de mobilisation. Cette mobilisation peut être chimique ou par application d'une pression. C'est une étape qui peut cependant compromettre la résolution, entraîner une déformation des pics, tout en augmentant le temps d'analyse [141]. La **Figure 13** montre une comparaison de deux modes de mobilisation réalisée à l'aide de marqueurs de pI.

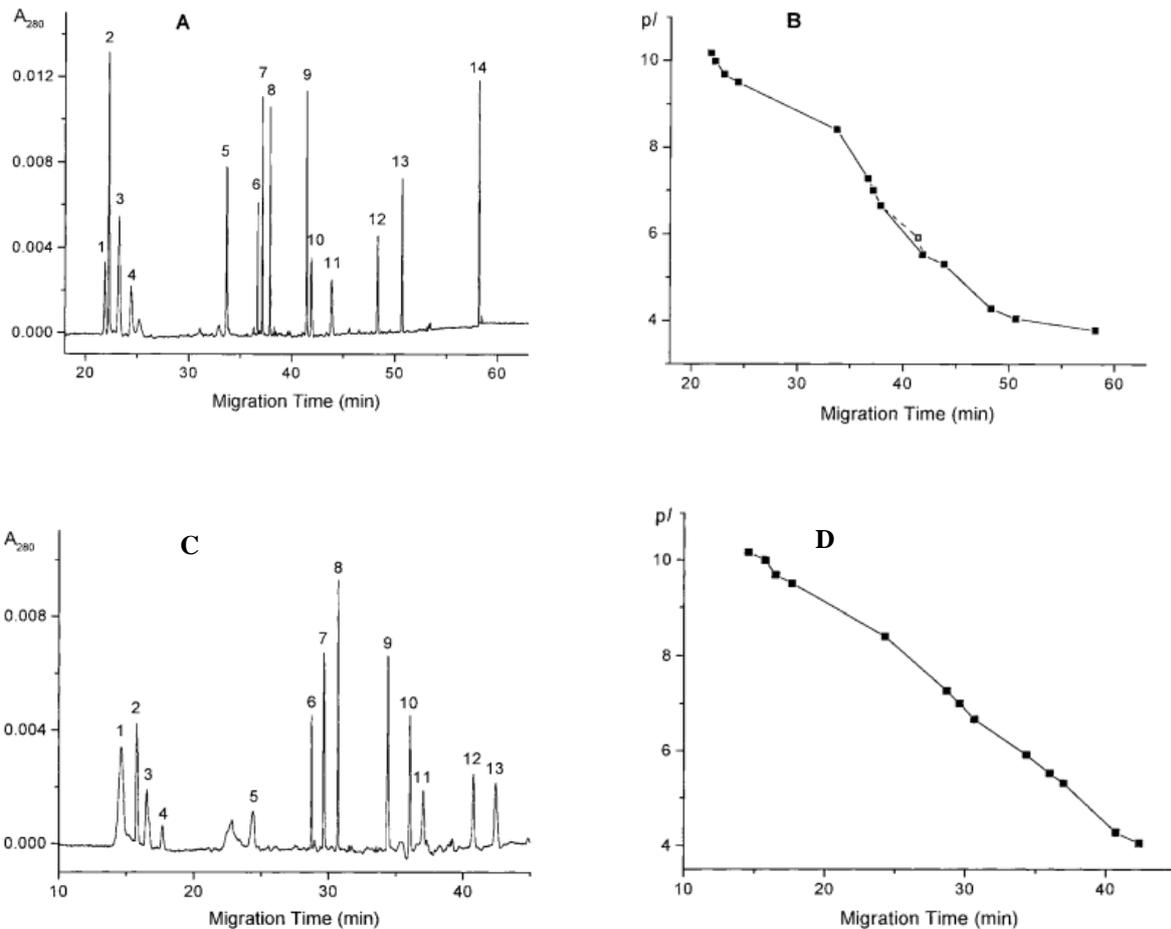


Figure 13 : Séparation CIEF des marqueurs pI peptidiques suivie par mobilisation cathodique **(A)**, par mobilisation physique **(C)**. **(B)** et **(D)** sont les profils du gradient de pH respectivement dans les cas d'une mobilisation cathodique ou physique. La valeur de pI de chaque peptide a été tracée en fonction du temps de migration à partir de **(A)** et **(C)** respectivement. Une solution d'échantillon qui contenait 0,625 mol/L de chaque peptide, 1 % d'ampholine (pH 3,5-10) et 0,1% TEMED, a été injectée dans le capillaire (75 m ID 27 cm de long) du côté anodique pendant 9 s en mode haute pression. La focalisation a été effectuée à 250 V/cm durant 10 min (anolyte, 10 mmol/L phosphorique acide; catholyte, 10 mmol/L NaOH), suivi pour **(A)** d'une étape de mobilisation cathodique avec 10 mmol/L d'acide acétique et un voltage de 250 V/cm ; pour **(C)** a été réalisée en soulevant le flacon d'entrée à 8 mm plus haut que le flacon de sortie, avec maintien de la tension à 250 V/cm. (Jin et al, 2002)[142].

Dans le cas de la mobilisation physique, l'électrophérogramme **Figure 13C** présente des largeurs de pic un peu plus grandes que celui obtenu par mobilisation cathodique (**Figure 13A**) ainsi qu'une ligne de base plus élevée. Jin et al. ont émis l'hypothèse que cela pourrait être dû à la forme parabolique du profil d'écoulement hydrodynamique. Cependant, le profil de gradient de pH obtenu à l'aide des marqueurs de pI est plus linéaire par mobilisation physique (**Figure 13D**) que par mobilisation chimique (**Figure 13B**) [142].

L'étape suivante a consisté à développer une nouvelle approche « one-step » combinant simultanément focalisation et mobilisation. Celle-ci a permis la séparation des glycoformes de rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) en moins de 10 minutes [143]. Cette méthode a également été utilisée pour l'analyse d'anticorps

recombinant. En 2011, une étude inter laboratoires portant sur l'analyse d'un AcM (IgG1) par icIEF a montré une reproductibilité intermédiaire inférieure à 0.8%. Plus récemment, une méthode de cIEF a été optimisée pour l'analyse d'anticorps monoclonaux [144]. Celle-ci a été validée (spécificité et précision) en accord avec les critères de l'ICH confirmant l'intérêt de la cIEF pour l'analyse des Acms dans un contexte de libération de lot dans l'industrie pharmaceutique (**Figure 14**) [145] Cependant, dans cette étude l'analyse complète de l'AcM et de ses variants est réalisée en 15 minutes environ ce qui reste une durée importante dans un contexte de contrôle qualité en milieu hospitalier.

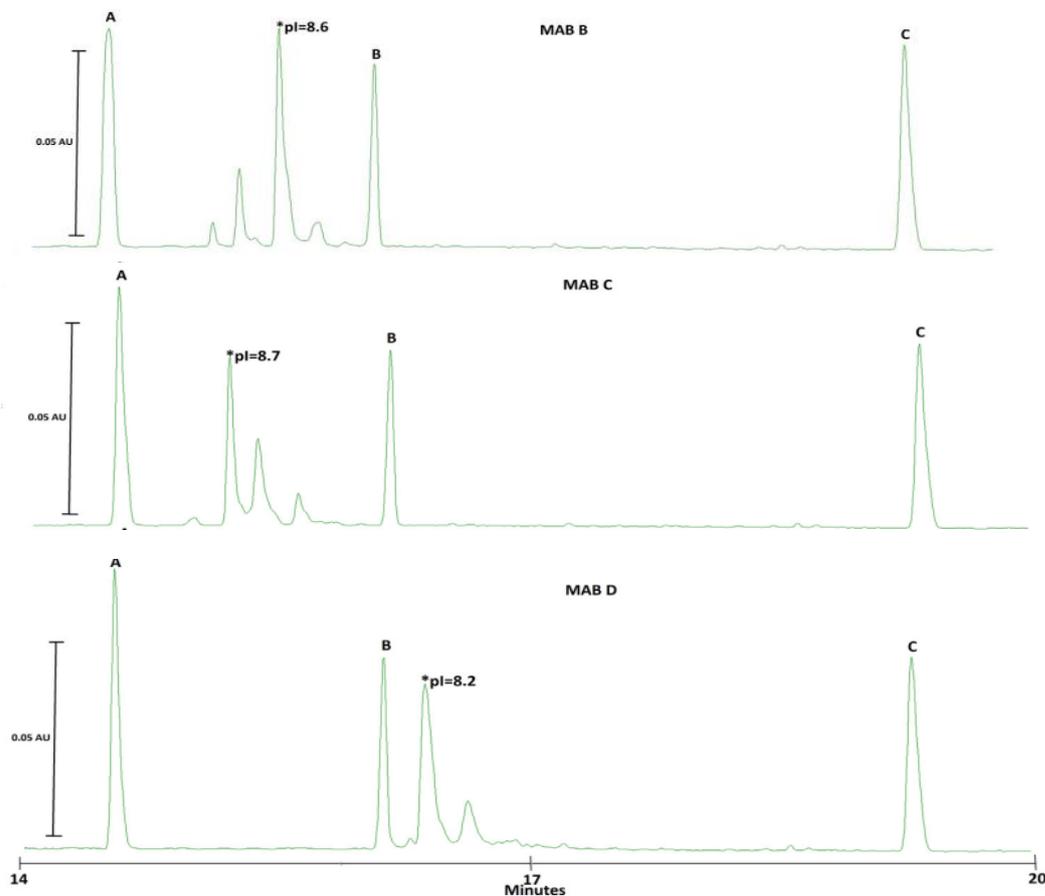


Figure 14 : Électrophérogrammes de trois Acms thérapeutiques différents (MAB B, MAB C, MAB D). Focalisation 10 min à 30 kV et mobilisation 20 min à 30 kV (100 mM acide acétique) (Suba et al., 2015) [145].

Une des avancées majeures qui a permis à l'IEF de s'imposer en industrie, notamment dans le domaine du contrôle qualité, a été le développement d'une technologie appelée focalisation isoélectrique capillaire « en image » (*imaged capillary isoelectro focusing*, icIEF) proposé pour la première fois par Wu et Pawliszyn en 1992. Cette méthode a permis de visualiser les analytes focalisés directement sur toute la longueur du capillaire sans nécessiter d'étape de mobilisation, ce qui constitue un grand avantage.

La séparation et la détection s'effectuent donc en une seule étape de focalisation,

éliminant ainsi les problèmes de résolution associés à la mobilisation (**Figure 15**). L'icIEF permet d'obtenir ainsi une résolution et une reproductibilité plus élevées dans un temps d'analyse plus court que la cIEF conventionnelle [116]. Ce principe de détection aide à suivre en temps réel le déplacement des protéines dans le capillaire. La focalisation en une seule étape sera davantage détaillée dans le paragraphe suivant de ce chapitre.

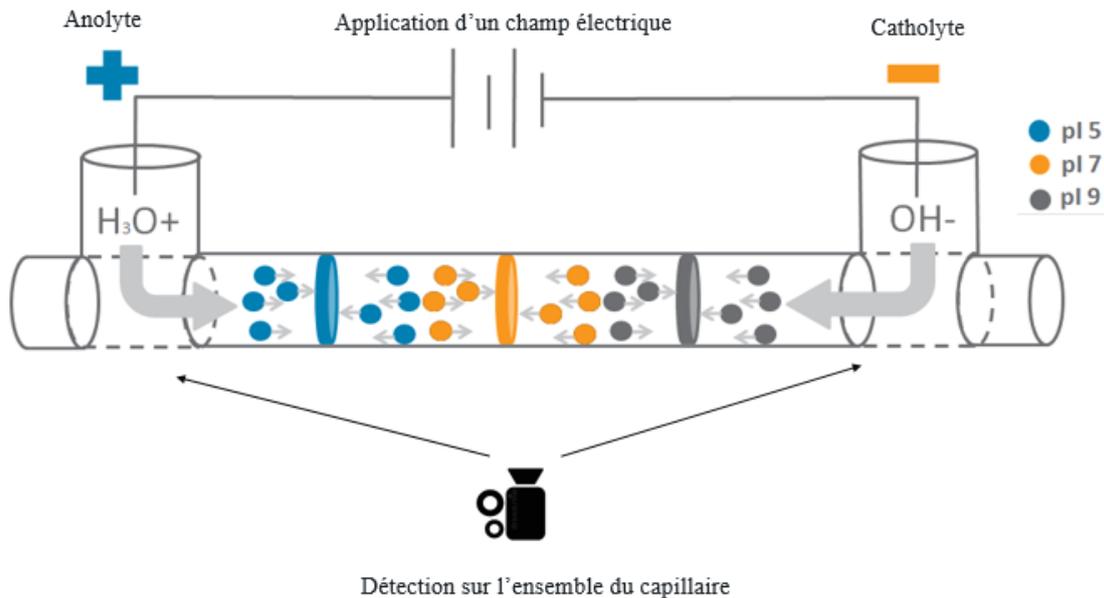


Figure 15 : Représentation schématique de l'étape de focalisation par icIEF.

b) Composition des ampholytes

Les échantillons et les ampholytes sont injectés simultanément dans le capillaire. Il existe quatre marques commerciales d'ampholytes (Pharmalyte, Servalyt, HR, and SH AESlyte) et dont les propriétés en termes d'intervalles de pH et du nombre d'espèces amphotères par unité de pH ont été comparés [146], [147].

Un contributeur majeur de la bonne résolution des variants de charges en cIEF est la composition du mélange d'ampholytes qui forme le gradient de pH. Des solutions d'ampholytes peuvent être choisies pour couvrir une large gamme de pH (c'est-à-dire ampholytes 3–10) ou pour améliorer la résolution dans une gamme de pH plus étroite (c'est-à-dire ampholytes 5–8 et 8–10,5). Pour les échantillons complexes ou contenant des protéines à large distribution de pI, un mélange d'ampholytes à large spectre (pH 3-10) est généralement utilisé. Dans le cas de protéines ayant des pI proches, des intervalles de pH étroits sont sélectionnés seuls ou ajoutés en mélange avec des ampholytes à intervalle de pH plus large pour obtenir une résolution élevée dans un intervalle initialement sélectionné [148].

En effet, Turner et al. ont étudié l'influence de diverses combinaisons de Pharmalytes 3–10 (large gamme) et de Pharmalyte 8–10,5 (gamme étroite) pour déterminer une

résolution optimale des variants de charges du NISTmAb [149]. La proportion totale d'ampholytes dans l'échantillon a été fixée à 4,8 vol%. En général, la diminution de la proportion de Pharmalyte 3–10 par rapport au Pharmalyte 8–10.5 améliore la résolution des variants de charges NISTmAb. En comparant les électrophérogrammes en **Figure 16**, ils ont constaté une amélioration de la séparation des variants de charges lorsque le ratio pharmalytes (3-10)/ pharmalytes (8-10) passe de 3:1 à 1:5 [149]. On observe également que, la séparation est similaire pour les ratios 1:2, 1:3 et 1:5, la valeur médiane (1:3) a donc été choisie comme valeur optimale en supposant ainsi que la méthode serait davantage robuste.

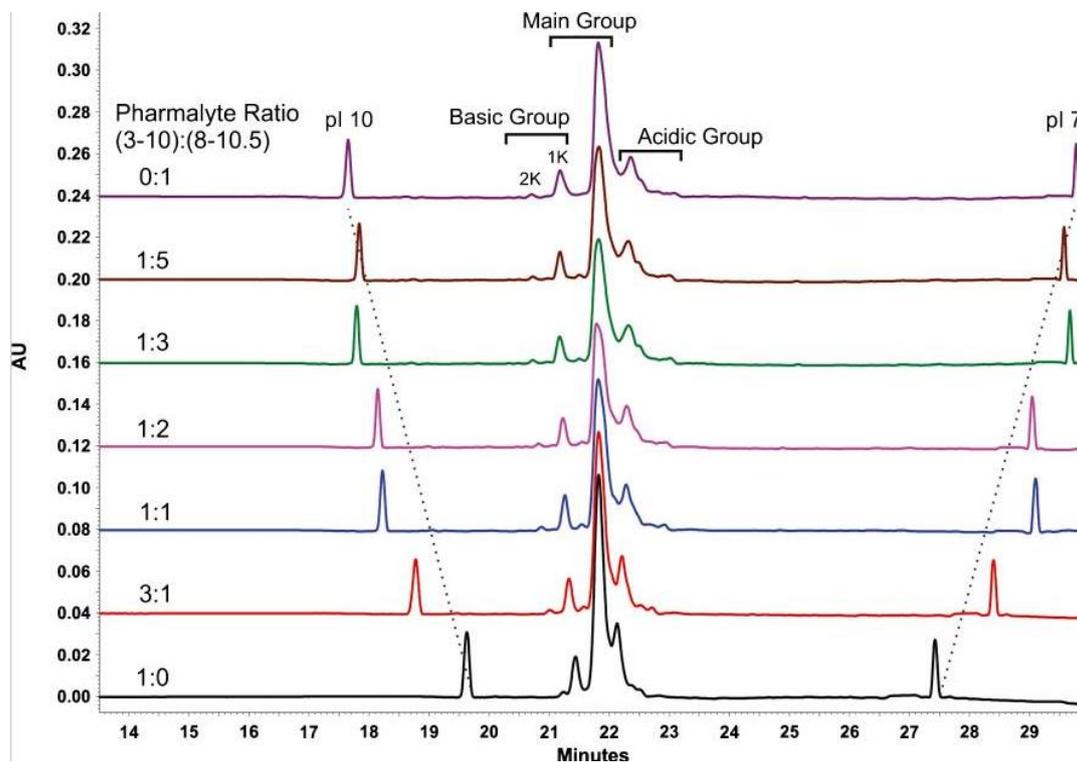


Figure 16 : Effet de la composition d'ampholyte sur la résolution des variantes de charge du NISTmAb (Turner et al, 2017) [149].

c) La focalisation (une seule étape)

Une fois la solution échantillon-ampholyte injectée dans le capillaire, la focalisation commence en plaçant une extrémité du capillaire dans une solution d'anolytes (généralement acide phosphorique), l'autre extrémité dans une solution de catholytes (généralement hydroxyde de sodium), et un champ électrique est appliqué. Une étape appelée « pré-focalisation », correspondant à une première tension (souvent de 1000 à 1500V) est appliquée, des bandes d'échantillons discrètes commencent à se former aux extrémités du segment échantillon-ampholyte. Lors de la « focalisation », où une tension plus élevée (autour de 3000V) est appliquée, les bandes en double (une à

chaque extrémité) fusionnent en une seule zone correspondant au point isoélectrique de la protéine qui correspond à l'état d'équilibre. L'optimisation de cette étape de focalisation consiste à déterminer le temps optimal de l'étape et l'intensité du champ (voltage) pour produire des zones entièrement focalisées dans un délai raisonnable. Une focalisation incomplète est mise en évidence par des doubles pics correspondant à une seule protéine (qui peuvent être identifiées à tort comme deux espèces distinctes). Cependant, l'augmentation du temps de focalisation après que l'état d'équilibre a été atteint augmentera le risque de précipitations [138].

Ces dernières années, l'icIEF est de plus en plus employée pour l'analyse des anticorps monoclonaux. Des études ont montré que l'icIEF permettait de déterminer le pI de 23 Acms thérapeutiques (e.g., Trastuzumab, Nivolumab, Infliximab) approuvés que par la FDA et l'EMA [116]. Plus récemment, des travaux réalisés à l'aide de l'Acm NIST et l'Infliximab ont mis en évidence la grande efficacité de séparation de l'icIEF [105]. De plus, la détection des Acms à l'aide de la fluorescence native a permis d'augmenter la sensibilité de la méthode de détection. Ainsi, l'icIEF est devenue une des méthodes de choix dans l'industrie pharmaceutique pour caractériser la charge des protéines dans le développement de produits, le contrôle qualité et la libération de lots. Des développements plus récents, recourant à des modes de détection plus sensibles, tels que la fluorescence et la détection MS [150], [151], [152], ont permis d'étendre l'application de l'icIEF à la recherche en industrie pour une meilleure compréhension de l'implication des variants de charges dans la perte d'efficacité des traitements. En effet, il a été possible de caractériser les variants de charges, acides et basiques, des Acms thérapeutiques tels que l'Infliximab, l'Adalimumab ou le Pertuzumbab par icIEF couplée à la spectrométrie de masse. Une caractérisation fine a été réalisée en couplant les informations sur le pI et la masse molaire de la protéine intacte provenant respectivement de l'icIEF et de la spectrométrie de masse [150]. Cette combinaison icIEF et MS est un couplage récent qui représente une stratégie intéressante pour l'étude et la caractérisation des hétérogénéités.

Lors nos travaux, nous avons choisi l'icIEF pour sa facilité d'utilisation en routine afin de développer des méthodes d'identification pour le contrôle qualité dans les hôpitaux. En effet, les manipulations ont été effectuées sur un instrument spécialisé pour l'icIEF (Maurice) commercialisé par Biotechne®. La manipulation de l'instrument est relativement simple. En particulier, la préparation et l'insertion du capillaire dans la cartouche sont des étapes critiques pour la CE classique. Biotechne® a développé un capillaire intégré dans une cartouche, ce qui facilite grandement son utilisation. Cependant, il convient de noter qu'une grande facilité d'utilisation peut également limiter les paramètres ajustables, et donc réduire la flexibilité. C'est pourquoi cet instrument est propice à une utilisation dans le cadre d'un contrôle qualité systématique, mais est beaucoup moins recommandé pour du développement de méthodes. Toutefois, cet aspect dépend plus de l'instrument que du mode de séparation et est donc discutable selon la finalité de l'analyse.

2.1.1.4 Conclusion : Comparaison de méthodes pour l'analyse des variants de charge

Les variants de charges sont considérés comme des attributs de qualité critique par les autorités. Les méthodes d'analyse actuelles permettent de séparer les variants et de les analyser directement en ligne ou hors ligne, aussi bien pour IEX que l'IEF [106].

Des études comparatives ont tenté d'évaluer le potentiel de ces différentes techniques pour l'analyse de ces variants de charges. Kahle et al. (2019) ont effectué une étude comparant les différentes méthodes de caractérisation des variants de charges : CEX, MEKC (une méthode particulière de CE), icIEF et la cIEF. Les travaux ont été menés à l'aide de l'Infliximab et le NISTmab [105]. Les conclusions diffèrent légèrement entre les deux anticorps. Pour chaque technique, les paramètres tels que la précision, l'efficacité, la sensibilité ont été évalués. Le pic principal de l'Infliximab a présenté la précision la plus élevée avec l'icIEF (RSD : 2,4%) pour 40 injections réalisées en une seule série. La seconde précision la plus élevée a été obtenue avec CEX (RSD : 3,4%). La précision la plus faible a été obtenue avec MEKC (RSD : 12%) dû aux effets d'adsorption. La **Figure 17** présente les différents profils obtenus pour l'Infliximab avec les quatre méthodes [105].

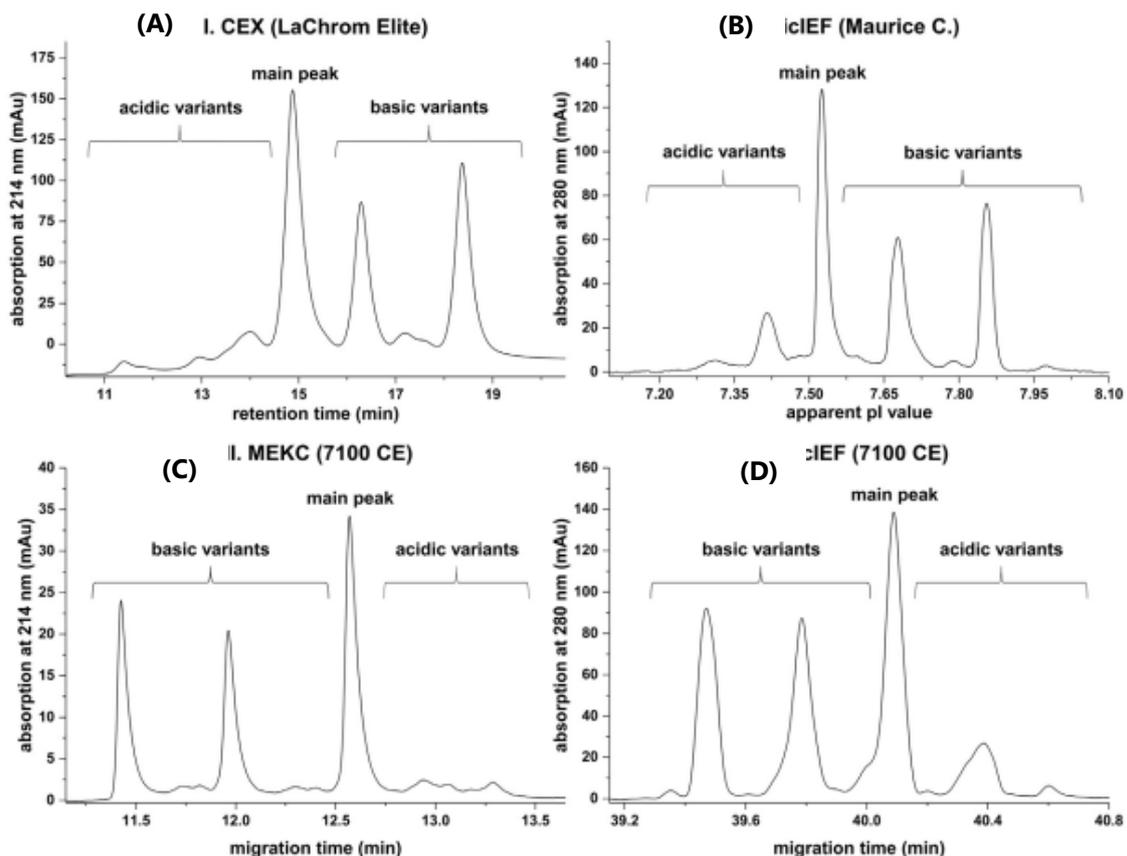


Figure 17 : Profils de séparation de l'Infliximab avec les quatre modes de séparation. **(A)** CEX, mesuré à 2,0 mg/ml ; **(B)** icIEF, mesuré à 0,2 mg/ml ; **(C)** MEKC, mesuré à 1,0 mg/ml ; **(D)** cIEF, mesuré à 0,2 mg/ml. (Kahle et al. 2019) [105].

Le nombre d'espèces acides et basiques sont comparables entre les différents modes de séparation, ce qui ne permet pas de discriminer les techniques selon leurs capacités à séparer un mélange complexe de biomolécules. Cependant, en cIEF, dix espèces ont été identifiées, et neuf en icIEF et CEX. La comparaison des proportions observées de variants de charges obtenus dans cette étude avec la littérature actuelle montre des tendances similaires pour CEX, mais un peu différente pour la cIEF. L'hypothèse formulée par Kahle et al. est que cette différence peut être due aux ampholytes utilisés pour le cIEF dans cette étude présentant un intervalle de pH plus faible, ce qui augmente l'efficacité de la séparation, comme décrit précédemment. La conclusion de cette étude est donc que chacune de ces techniques a ses avantages. Cependant, la simplicité d'utilisation de l'icIEF et son mode de détection par fluorescence native sont des avantages pour des applications demandant une automatisation, une robustesse et une sensibilité élevée.

En conclusion, il est important de souligner qu'en IEX, les méthodes sont fondées sur la distribution de charges de surface. Elles sont non dénaturantes et peuvent être employées en mode préparatives ou séparatives. Elles sont très utilisées pour l'isolement, la séparation et la caractérisation ultérieure des variants de charges correspondants. Les méthodes développées peuvent facilement être adaptées à chaque laboratoire dans lesquels d'autres méthodes chromatographiques sont déjà disponibles. Ainsi, la collecte de fractions par chromatographie peut facilement être réalisées en utilisant les mêmes colonnes analytiques [106]. Les méthodes par IEF sont fondées sur la charge nette intrinsèque des protéines, et non sur la distribution de charge de surface. Par conséquent, ces méthodes basées sur l'IEF sont essentielles pour déterminer le pI des variants de charges, ce qui ne peut pas être accompli avec précision par des techniques chromatographiques. Ainsi, les méthodes établies sur IEF sont donc complémentaires des approches chromatographiques pour caractériser les variants de charges des anticorps. D'autres parts les méthodes IEF ont récemment évoluées, permettant maintenant, à l'aide de systèmes et préparations d'échantillons spécifiques, un couplage MS en ligne ou par fractionnement (hors ligne). Cette évolution dans les applications en IEF tend à étendre son utilisation en contrôle qualité en milieu industriel.

Enfin, l'étude des variants de charges peut permettre d'évaluer la fonctionnalité de l'anticorps. La caractérisation structurale et fonctionnelle des isoformes est essentielle pour définir les attributs de qualité critiques lorsqu'il existe une hétérogénéité de variants de charges significative [153], c'est le cas, par exemple, dans les études comparatives de biosimilaires [102]. Beyer et al., où les isoformes de variants de charges de l'Infliximab (Remicade) et de trois biosimilaires (Inflectra, Remsima et Flixabi) ont été isolés et caractérisés, grâce à des méthodes électrophorétiques et chromatographiques à haute résolution [154]. Ils ont montré des différences quantitatives et qualitatives significatives entre les variants de ces quatre biosimilaires au niveau des lysines

terminales. En effet, le clivage de la lysine C-terminale sur la chaîne lourde a également été quantifié et a montré des niveaux similaires entre Remicade, Remsima et Inflectra (50 %), cependant pour Flixabi 98% des chaînes lourdes sont dépourvues de lysines. Sur les profils de charges, les variants basiques correspondent aux variants comportant les lysines C-terminales. Pour le Flixabi l'absence des pics basiques peut s'expliquer par le clivage des lysines C-terminales. Néanmoins, malgré ces différences, l'étude conclue que dans le cas de l'Infliximab, ces variations n'affectent pas son activité biologique uniquement liée à son affinité avec sa cible et non ses fonctions effectrices[154].

Il semble donc important de considérer des approches alternatives et combinatoires, chromatographiques et électrophorétiques, pour l'étude des variantes de charges, qui devrait idéalement être suivi d'analyses fonctionnelles de chaque variant séparé pour une compréhension complète. Ces études fonctionnelles approfondies sont réalisées par d'autres approches complémentaires et orthogonales telles que la SPR, l'ELISA et les méthodes basées sur la culture cellulaire. Enfin, notre choix s'est finalement porté sur l'icIEF, en raison de sa simplicité d'utilisation, sa rapidité d'analyse et son automatisation.

2.1.2 Variants d'hydrophobicité

Parmi les hétérogénéités des anticorps monoclonaux, les variants d'hydrophobicité jouent un rôle important dans la stabilité et le potentiel d'agrégation des protéines thérapeutiques. Ceux-ci peuvent être discriminés par chromatographie de phase inverse ou chromatographie d'interaction hydrophobe. En effet, la structure complexe des anticorps est en partie déterminée par les interactions hydrophobes des acides aminés non polaires, tels que la phénylalanine, le tryptophane ou la valine. Ces interactions influencent majoritairement le repliement des protéines et la stabilisation de la structure aussi bien secondaire, tertiaire, que quaternaire. L'apparition de variants d'hydrophobicité au cours du cycle de vie de la protéine peut en partie être liée à des modifications conformationnelles responsables du changement d'hydrophobicité. Ceci peut être observé, par exemple, dans le cas de certaines PTM à l'origine de modifications de structure [155]. Il a également été démontré que ces variations d'hydrophobicité pouvaient également avoir un impact sur l'agrégation des anticorps, et ainsi avoir une importance pour l'immunogénicité du traitement. Meyer et al. (2021) ont démontré que ces variants d'hydrophobicité identifiés par HIC pouvaient former des petits agrégats en analysant chacun de ces variants par chromatographie d'exclusion stérique [94].

2.1.2.1 Chromatographie liquide haute performance en phase inverse

La méthode classiquement utilisée pour séparer les analytes selon leur hydrophobicité est la chromatographie en phase inverse (*Reverse Phase Liquid Chromatography*, RPLC). Cette méthode est très largement utilisée dans l'étude des protéines en réalisant des cartes peptidiques (*peptide mapping*) [66], [156], en analysant des anticorps intacts [157] et des sous unités [158], [159], [160], [161] (approches middle-up). Son avantage principal est qu'elle peut directement être couplée à la MS grâce à une phase mobile pouvant être ionisée (contenant souvent de l'acétonitrile et 0.1% TFA) [162].

Cependant, cette approche comporte un inconvénient majeur dû à son utilisation accrue de solvants organiques pouvant dénaturer les protéines. De plus, elle ne permet pas le maintien des structures à l'état natif et des différentes interactions inter et intramoléculaires ce qui rend cette méthode peu adaptée pour étudier des altérations de conformation des protéines, aussi cette méthode ne sera pas développée dans cette thèse bien qu'elle soit largement utilisée et peut permettre de répondre à de nombreuses questions sur certaines modifications [110].

2.1.2.2 Chromatographie d'interactions hydrophobes

Comme alternative à la RPLC, la chromatographie d'interaction hydrophobe (*Hydrophobic Interaction Chromatography*, HIC) peut être proposée. C'est un mode chromatographique qui peut être non dénaturant et qui sépare également les protéines selon les différences d'interactions hydrophobes [163]. Cette méthode est utilisée pour étudier les modifications pouvant être à l'origine d'un changement d'hydrophobicité (agrégation, oxydation...) [110]. D'autres PTM telles que les dégradations, les fragmentations, l'isomérisation de l'acide aspartique, les cystéines non appariées peuvent aussi entraîner une modification de l'hydrophobicité. Ainsi, il est important de pouvoir suivre l'évolution de ces variants qui témoignent de la stabilité structurale des anticorps, et peuvent dans certains cas être considérés comme attributs de qualité critiques [164], [165].

La HIC a été utilisée pour évaluer l'hétérogénéité et la stabilité des Acms. La **Figure 18** montre un exemple de séparation des espèces d'Acms soumis à un stockage à 40 °C pendant 12 semaines (Douglass et al. 2008) [165].

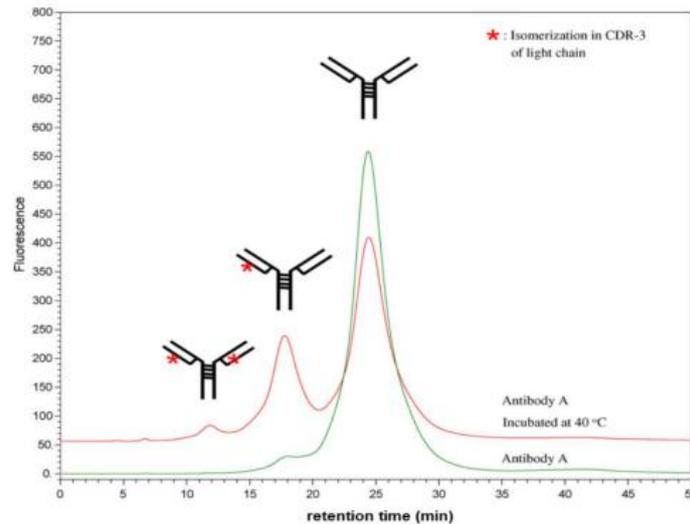


Figure 18 : Séparation HIC de l'anticorps A (IgG2) modifié en CDR-3 de chaîne légère. L'incubation de l'anticorps A à 40 °C durant 12 semaines modifie un seul résidu dans la chaîne légère d'Asp en iso-Asp. Les populations d'anticorps contenant 2, 1 et 0 chaînes légères modifiées sont mis en évidence dans la séparation de l'anticorps stressé A (Douglass et al. 2008) [165].

L'analyse de ces anticorps montre l'apparition de pics additionnels sur le profil correspondant à l'anticorps stressé par comparaison avec l'anticorps non stressé. D'après les auteurs, ces pics correspondent à des modifications asp versus isoasp.

La rétention par HIC est favorisée par les effets de « salting-out » induits par la présence de fortes concentrations de sels cosmotropes (définis dans la série de Hofmeister) [166], [167]. En diminuant la concentration en sel, les molécules retenues peuvent être éluées de la colonne. Cette méthode peut être utilisée pour purifier les Acms en fonction de leur hydrophobicité relative [168]. La **Figure 19**, montre l'hydrophobicité relative de 51 Acms déterminée par HIC pour une séparation effectuée sur la même phase stationnaire [168].

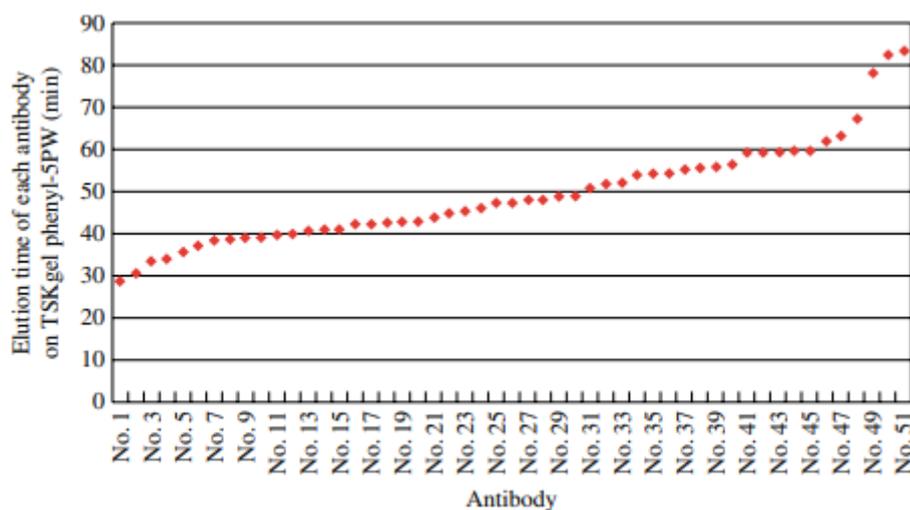


Figure 19 : Hydrophobicité de 51 Acms de souris différents selon leur rétention sur TSKgel Phényl-5PW. Conditions chromatographiques : gradient linéaire de sulfate d'ammonium 1,8 M dans 0,1 M phosphate de sodium, pH 7,0, à phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,0, en 60 min à 1 ml/min. Détection UV à 280 nm (Vajda et al, 2017)[168].

L'inconvénient de cette technique est qu'elle requiert dans certains cas de fortes concentrations en sels qui peuvent induire des dénaturations ou des phénomènes d'agrégation (généralement 1,5 à 3M sont utilisés dans les phases mobiles) [169]. Des études ont cependant cherché à rendre cette technique la moins dénaturante possible en limitant la quantité de sel à moins de 1M, en diminuant le pourcentage de solvant organique (<15%)[164], en choisissant la nature des sels, le pH, la température et une durée d'analyse appropriée [164]. L'impact des propriétés des phases stationnaires influence également la structure des anticorps par les interactions établies avec la colonne (les interactions étant plus ou moins fortes selon les ligands greffés sur les particules des colonnes et leurs densités) [170], [171]. Des études récentes ont montré que l'on pouvait analyser des anticorps monoclonaux (IgG1) par HIC en conservant la protéine intacte. La méthode développée a permis de séparer des variants présentant des degrés d'hydrophobicité différents et d'évaluer leur stabilité ainsi que leur capacité à former des petits agrégats [93].

Il a également été possible d'adapter la phase mobile pour coupler la HIC à une détection par spectrométrie de masse en utilisant des sels d'ammonium.

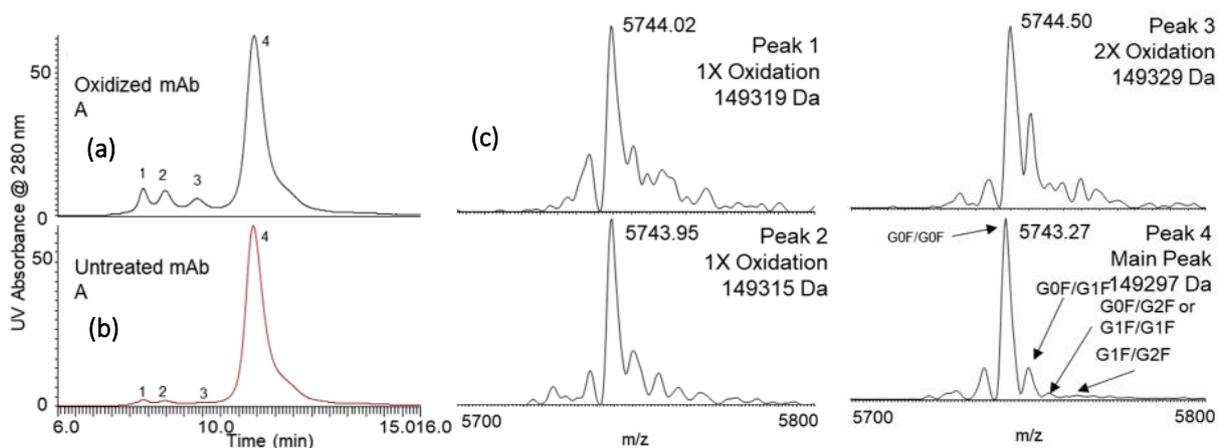


Figure 20 : Chromatogramme de *mAb A* par HIC-UV (a) oxydé et (b) natif (non traité), (c) spectres de masse élargis de l'état de charge le plus abondant (26+) et masses déconvoluées des pics 1 et 2 (oxydation 1 ×), pic 3 (oxydation 2 ×) et pic 4 (principal). (Wei et al, 2019) [172].

Wei et al. ont étudié la stabilité d'un IgG1 (*mAb A*) à l'état natif et traité avec du dichlorhydrate de 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPH) entraînant son oxydation (**Figure 20**) [172]. Dans un premier temps, une analyse de *mAb A* a été réalisée à des concentrations supérieures à 150 mM d'acétate d'ammonium qui a permis une discrimination de l'AcM de ses variants. Une optimisation a ensuite conduit à l'utilisation d'une concentration en acétate d'ammonium plus faible (inférieure à 150

mM). Sur la **Figure 20A**, on peut observer une discrimination des Acms oxydés/non oxydés et une intensité plus importante des pics 1, 2 et 3 après le traitement AAPH qui correspond à des espèces oxydées. L'identification est confirmée par la masse déconvoluée de chaque pic individuel (**Figure 20C**). La masse déconvoluée du pic 4 correspond bien à la masse théorique du mAb A intact. À partir de la masse déconvoluée, le pic 2 a été identifié comme le variant protéique avec une seule oxydation et le pic 3 a été identifié comme une double oxydation.

Une solution alternative utilisant un système 2D composé d'une colonne de dessalage, en seconde dimension, a également montré son efficacité pour séparer les variants [173]. Etkirch et al. ont, en effet, développé une méthode HICxSEC-IM-MS pour l'analyse du Brentuximab, où la SEC permet un dessalage avant la mobilité ionique et l'analyse MS. Cependant, c'est une analyse complexe à mettre en œuvre en termes d'instrumentation et dont la manipulation inclut de nombreuses étapes.

2.1.2.3 Conclusions

Contrairement aux variants de charges, il existe une moins grande diversité d'approches pour l'analyse des variants d'hydrophobicité. De plus, certaines méthodes classiquement utilisées, comme la RPLC, sont fortement dénaturantes, ce qui rend plus difficile l'attribution des modifications de structure liées à l'exposition aux stress extérieurs. Or, ces variants pouvant être considérés comme des attributs de qualité critique, des méthodes moins dénaturantes ont été développées afin de pouvoir étudier ces hétérogénéités. La HIC en conditions dites « natives » est une solution jusqu'à maintenant privilégiée pour suivre les éventuelles modifications de structure affectant l'hydrophobicité des molécules.

2. ÉTUDE DES INSTABILITÉS PHYSIQUES

2.2.1 Variants de taille

2.2.1.1 Les différences de tailles des particules

De nombreuses voies de dégradations chimiques peuvent conduire à des altérations physiques modifiant les différentes structures des Amcs [174]. L'évaluation de ces modifications sur les charges et l'hydrophobicité a été abordée dans les parties précédentes. Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons les techniques d'analyse de ces modifications en fonction des niveaux de structure, notamment pour détecter les changements de conformation, les phénomènes d'agrégation (auto-association), et de fragmentation.

L'hétérogénéité de taille est un aspect critique de la caractérisation physico-chimique d'un produit biologique [175]. Les agrégats (dimères, trimères, tétramères et multimères), de poids moléculaires élevés (*High Molecular Weight*, HMW), et les fragments de faibles poids moléculaires (*Low Molecular Weight* LMW), sont souvent

considérés comme des attributs de qualité critiques nécessitant une surveillance étroite pendant la fabrication, la libération de lots, la stabilité et le stockage. Les « HMW » et « LMW » pouvant se former doivent répondre aux critères d'acceptation établis pour minimiser le risque de réponses immunitaires négatives et/ou conduire à la réduction de l'activité biologique [176].

Les techniques analytiques permettant l'étude des « HMW » et « LMW » sont classées en fonction de la taille des particules qu'elles sont capables de détecter (**Figure 21**). On distingue les techniques caractérisant le domaine du visible et sous-visible. Les directives réglementaires recommandent l'utilisation de méthodes orthogonales. C'est pourquoi de nombreuses techniques fondées sur différents phénomènes sont utilisées, tels que la chromatographie d'exclusion stérique, l'électrophorèse sur gel, le fractionnement en flux de champ à flux asymétrique, les méthodes par microscopie, les méthodes par diffusion de la lumière, la centrifugation, les méthodes par spectroscopie et imagerie, et enfin, les inspections visuelles.

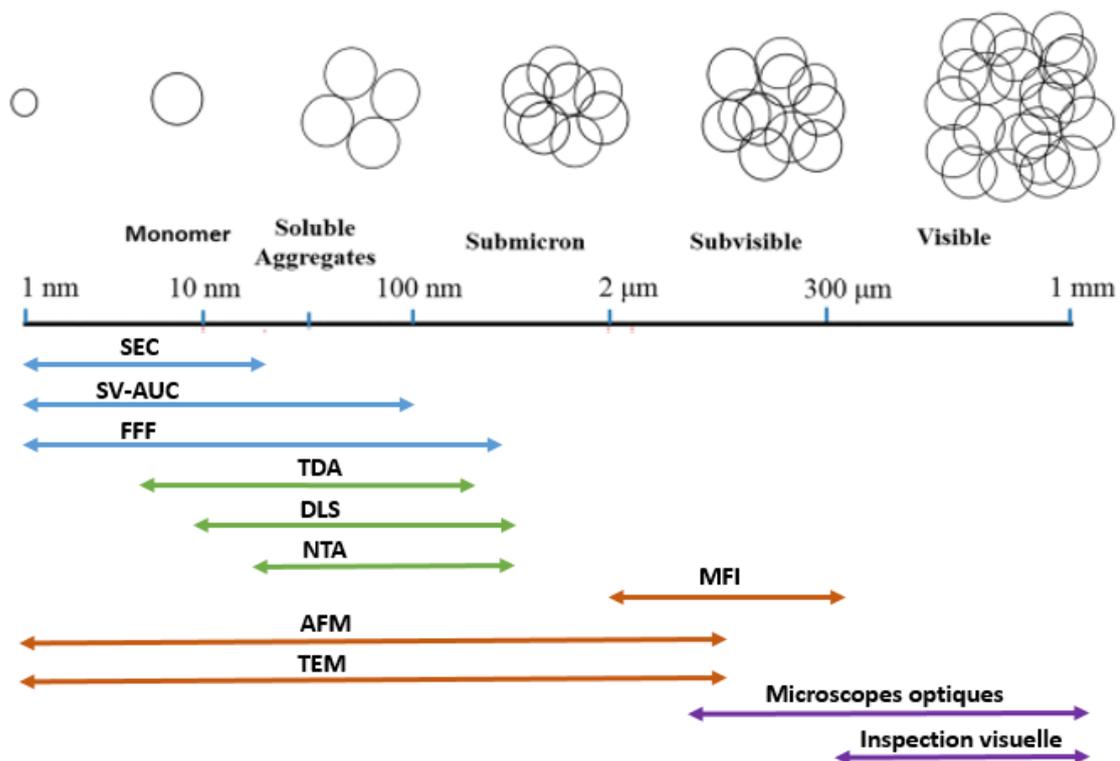


Figure 21 : Méthodes permettant la caractérisation d'agrégats (de quelques nanomètres à quelques millimètres).

Tableau 3 : Récapitulatif des techniques de caractérisation pour déterminer la taille des anticorps, de leurs agrégats et fragments.

Technique	Abréviation	Intervalle de taille	Agrégats d'anticorps détectés	Principe	Quantification
Microscope à force atomique	AFM	0.1 nm-100 µm	Oligomère	Microscopie	Non
Microscope à transmission électronique	TEM	1 nm-100 µm	Oligomère	Microscopie	Non
Imagerie par Micro-flux	MFI	2 µm à 300 µm	Oligomère	Imagerie	Oui
Diffusion de lumière dynamique	DLS	10 nm à 1µm	Dimère<	Diffusion de lumière	Non
Analyse par distribution de Taylor	TDA	5 nm à 500 nm	Dimère<	Méthode séparative	Non
Analyse de suivi de nanoparticule	NTA	30 nm à 1 µm	Trimères<	Imagerie	Oui
Ultracentrifugation Analytique	AUC	1 nm à 100 nm		Méthode séparative	Oui
Fractionnement par couplage flux-force à flux asymétrique	A4F-MALS	1 nm à 1µm	Petits agrégats et fragments	Méthode séparative	Oui
Chromatographie d'exclusion stérique	SEC-MALS	1 nm à 25 nm	Petits agrégats et fragments	Méthode séparative	Oui
Photométrie de masse	MP	30 kDa- 5 MDa	Petits agrégats et fragments	Imagerie	Oui
Électrophorèse capillaire par SDS	CE-SDS	1 kDa- 1 MDa	Petits agrégats et fragments	Méthode séparative	Oui

2.2.1.2 Les agrégats de haut poids moléculaire : Inspection visuelle (opalescence)

La première méthode de vérification du taux d'agrégation de particules en suspension peut se réaliser à l'œil nu par comparaison d'opalescence d'un échantillon à celle d'un

échantillon standard. La méthode d'évaluation du degré d'opalescence par comparaison visuelle des formulations liquides est décrite dans la Pharmacopée Européenne [177]. Cette technique permet de distinguer quatre degrés d'opalescence différents (clair, légèrement opalescent, opalescent et très opalescent) [178]. Cette méthode de contrôle non analytique de l'agrégation est utilisée dans l'industrie comme test préliminaire, mais peut être effectué à l'hôpital comme contrôle qualité après reconstitution.

2.2.1.3 Les particules sous-visibles, sous-micron et agrégats de poids moléculaire modérés

Les organismes de réglementation accordent de plus en plus d'importance aux particules sous-visibles, et ont exprimé leurs inquiétudes croissantes quant à l'impact de ces agrégats sur la sécurité et l'immunogénicité des produits. Les particules sous-visibles comprennent généralement des agrégats de protéines allant de 0,1 à 100 μm [179]. Il existe une multitude de techniques utilisées pour caractériser la taille des agrégats et estimer leur quantité, néanmoins chacune de ces techniques comporte des avantages et inconvénients. Dans cette partie, nous allons présenter les techniques actuelles les plus employées et détailler davantage celles qui ont été utilisées lors cette thèse.

a) Techniques microscopiques

La microscopie électronique à transmission (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) est une technique de microscopie dans laquelle un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon pour former une image. L'image est formée à partir de l'interaction des électrons avec l'échantillon lorsque le faisceau est transmis à travers l'échantillon (**Figure 22A**). Cette technique permet d'acquérir des informations structurales sur les anticorps et petits oligomères (dimères), tels que les conformations, les tailles, les longueurs, les formes, ainsi que la localisation des fragments impliqués dans la dimérisation. Plusieurs études sur les dimères d'Acms, obtenus suite à des dégradations forcées, montrent les différents types de dimérisation possibles. Il a été démontré que les différences de dimérisation étaient liées aux méthodes de stress et donnent lieu à des conformations de dimères différentes selon les stress [180], [181].

Par exemple, Plath et al. ont démontré que selon la température appliquée, des dimères d'anticorps (IgG1) pouvaient avoir des sites de dimérisation différents et des formes plus ou moins compactes [181]. De même, Rajeskhar et al. ont utilisé le TEM pour montrer les différentes voies de dimérisation et déterminer s'il s'agissait de dimères covalents [180]. Les dimères obtenus par exposition à des pH acides (**Figure 22B et 22C**) sont non covalents et ont une affinité pour leur cible biologique semblable à celles de l'échantillon non dégradé, tandis que ceux obtenus après exposition à la lumière UV présentent plusieurs modifications conduisant à des dimérisations différentes et une perte d'activité biologique.

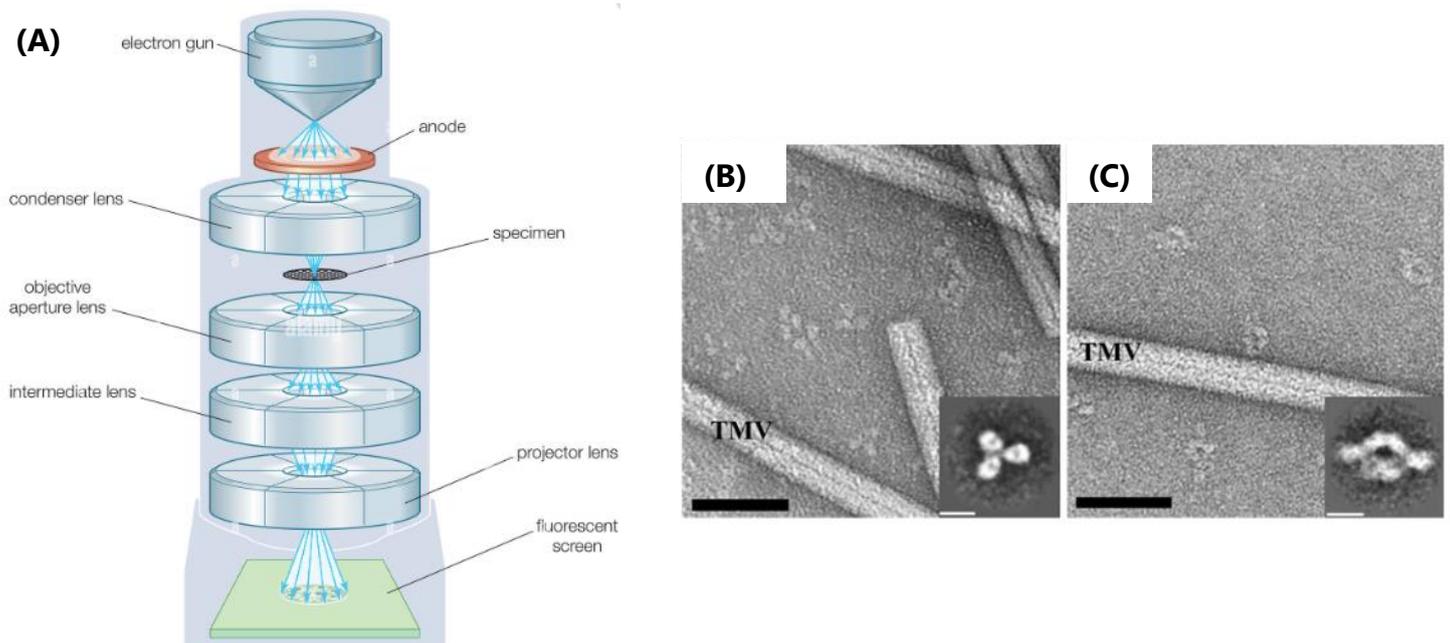


Figure 22 : (A) Schéma de fonctionnement du TEM (B) Images obtenues par TEM de (a) monomère (b) dimères obtenus par conditions de pH acides. (Rajeskhar et al., 2012) [180].

b) Imagerie par micro-flux

Un autre outil pour estimer les particules sub-visibles est l'imagerie par micro-flux ou la microscopie par imagerie en flux (*Micro flow Imaging, MFI*), schématisé en **Figure 23**. En effet, le MFI s'est avéré être une technique utile pour sa sensibilité aux petites particules en permettant la détection de particules transparentes (dont l'indice de réfraction est semblable à celui du milieu). Cette technique offre une différenciation entre les sous-populations ayant des morphologies différentes via des filtres d'imagerie [92]. La technologie capture des images numériques de particules en suspension dans un fluide lors de leur passage à travers une zone de détection, ces images sont automatiquement analysées pour fournir une archive numérique des paramètres de particules tels que le diamètre circulaire équivalent, le rapport d'aspect, la circularité et l'intensité [182]. Le MFI permet la caractérisation de particules de 2 à 300 μm et a déjà été utilisé pour l'analyse d'agrégats d'anticorps monoclonaux sans préparation d'échantillon.

Cette technique a notamment été utilisée par Bansal et al. pour déterminer la formulation conduisant à la formation du plus grand nombre d'agrégats d'Acms (IgG1) dans cette gamme de tailles [92]. Il a ainsi été montré que la formulation comportant le plus grand nombre d'agrégats en un temps très court est à base de tampon citrate (100 mM de citrate + 100 mM NaCl, 30°C, 24h), alors que le tampon à base de glycine (100 mM de glycine + 100 mM NaCl, 30°C, 198h) minimise ce phénomène d'agrégation. Néanmoins, l'équipe a également constaté que la tendance à l'agrégation varie également selon les anticorps.

Cependant, un des inconvénients de cette technique est sa tendance, lorsque les concentrations d'agrégats sont faibles, à surestimer leur nombre en comparaison avec les méthodes orthogonales de diffusion de lumière.

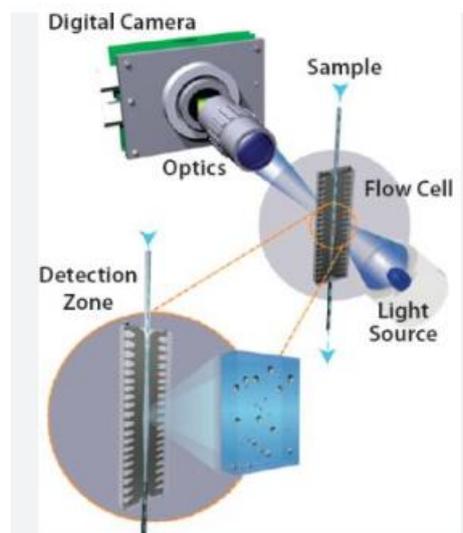


Figure 23 : Schéma de fonctionnement du MFI.

c) La diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS) est une technique permettant de déterminer la taille des particules dans une gamme de tailles comprise entre 1 nm et 5 μm [92]. Facile d'utilisation, elle est déjà implantée dans de nombreux laboratoires académiques et industriels pour détecter les agrégats, garantissant la stabilité des traitements. Elle apparaît comme technique complémentaire aux techniques séparatives (chromatographie, ultracentrifugation...) [183], [184], [185]. Les oligomères en suspension sont soumis à un mouvement brownien aléatoire dans lequel les petites particules se déplacent plus rapidement que les plus grosses. Un faisceau lumineux traversant la suspension provoque la diffusion de la lumière laser à différentes intensités (**Figure 25**). La DLS ne permet pas la séparation des monomères du reste des agrégats, mais calcule plutôt la taille moyenne des particules dans l'échantillon (rayon hydrodynamique). L'avantage principal associé à la DLS est sa sensibilité élevée aux petites quantités d'agrégats. Le principal inconvénient de la DLS

est que les informations obtenues après analyse sont semi-quantitatives. La DLS ne permet pas de déterminer la proportion des différentes espèces agrégées, il s'agit uniquement de moyennes. De plus, la sensibilité de la technique augmente avec l'augmentation de la taille des particules, cela peut permettre de détecter de minuscules quantités de très grosses molécules agrégées. Cependant, cela peut également conduire à masquer, des populations de plus faibles poids moléculaires [185].

Bansal et al. cités précédemment ont également utilisé la DLS pour étudier une autre gamme de tailles d'agrégats (10 nm à 5 μm) [92]. Cela a permis de démontrer que l'augmentation en % du nombre d'agrégats est plus rapide dans le tampon citrate (100 mM citrate, 100 mM NaCl) que dans les tampons acétate et glycine pour les deux Acms (IgG1 biosimilaire anti CD6 et IgG1 biosimilaire anti VEGF) étudiés confirmant ainsi les observations réalisées par MFI. De plus, ils ont confirmé que la concentration de protéines dans l'échantillon semble avoir un impact sur l'agrégation, une concentration plus élevée entraîne des agrégats de plus grande taille [92]. Dans ces travaux, Bansal et al. expliquent le rôle clé de la DLS comme méthode de première intention pour évaluer la taille des particules. Si les particules sont considérées comme petites (<25 nm), une seconde analyse est effectuée en chromatographie d'exclusion stérique, a contrario si les particules sont jugées plus grosses (>2 μm), elles seront analysées par MFI. Le schéma **Figure 24** présente cette démarche.

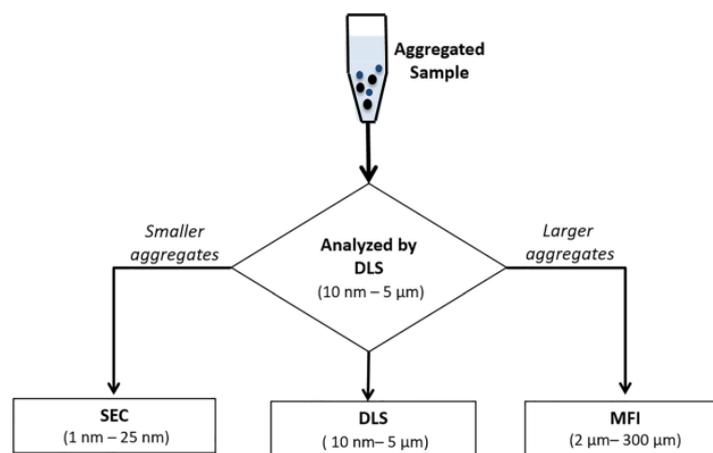


Figure 24 : Démarche pour l'analyse des agrégats grâce à différents outils analytiques selon la taille des particules agrégées. (Bansal et al. 2019) [92].

Une autre limitation que nous avons rencontrée avec cette méthode, lors d'expériences au laboratoire, est qu'elle nécessite des volumes importants par comparaison à d'autres méthodes d'analyse (même à l'aide de cuves à faibles volumes de 400 μL). Pour s'affranchir de cette difficulté une dilution de la préparation a été réalisée. Cependant, celle-ci peut en partie altérer les interactions intermoléculaires (agrégats) mais surtout peut conduire à une concentration trop faible pour garantir la fiabilité des résultats.

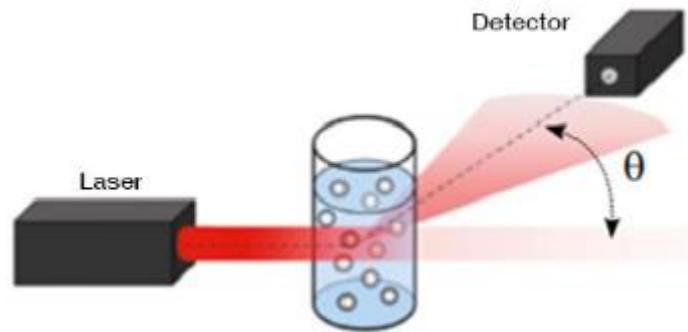


Figure 25 : Schéma de fonctionnement DLS [186].

d) L'analyse de suivi des nanoparticules

L'analyse de suivi des nanoparticules (*Nanoparticles Tracking analysis, NTA*) est une technologie plus récente d'imagerie qui a récemment gagné en popularité, notamment pour détecter les agrégats de protéines thérapeutiques [187], [188]. Comme la DLS, elle est fondée sur la diffusion de la lumière et le mouvement brownien des particules en suspension, mais cette approche permet un suivi individuel de toutes les nanoparticules présentes dans le milieu. Cette technique mesure le coefficient de diffusion de particules individuelles à l'aide d'un microscope et d'une caméra (**Figure 26A**). Elle a notamment montré son efficacité lors d'une étude réalisée par Filipe et al. portant sur différentes protéines, dont des Acms (IgG1), soumis à un stress thermique afin de former des agrégats. Dans cette étude, le diamètre des agrégats mesuré par ces deux techniques, DLS et NTA, était similaire (**Figure 26B et 26C**) [187]. Néanmoins, cette méthode a une limite de détection élevée, ce qui ne permet pas la détection correcte des petits agrégats [185]. Cette dernière observation s'est vérifiée sur nos échantillons, en effet, la NTA ne permettait pas de détecter les petits agrégats obtenus quel que soit le stress appliqué.

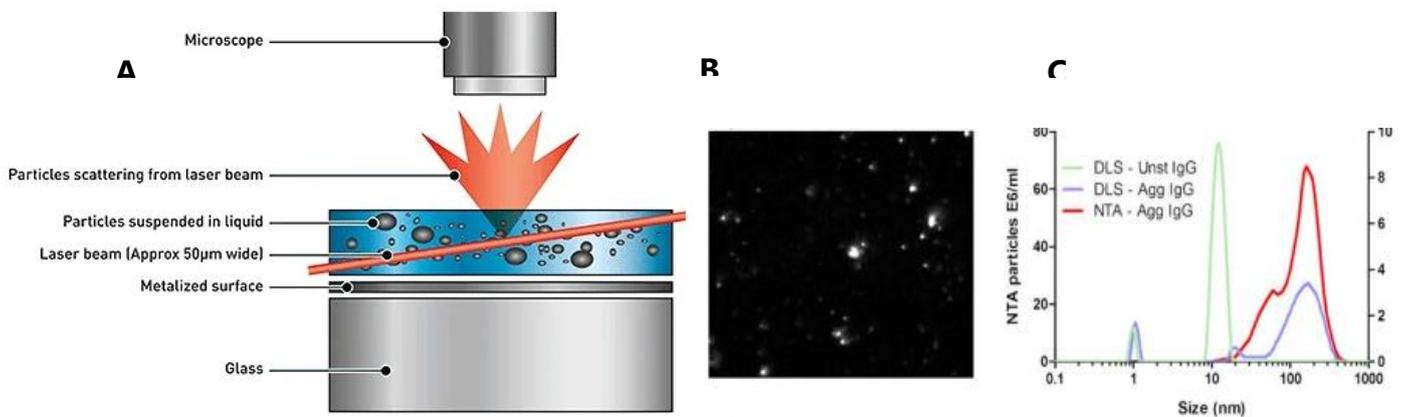


Figure 26 : (A) Schéma de fonctionnement de la NTA (B) Image de NTA représentant des agrégats d'IgG (obtenus par stress thermique), (C) distribution de taille correspondante mesurée avec NTA et DLS. (Filipe et al. 2009) [187]

e) Analyse par dispersion de Taylor

L'analyse par dispersion de Taylor (*Taylor Dispersion Analysis, TDA*) est une technique relativement peu utilisée pour déterminer les coefficients de diffusion et les rayons hydrodynamiques des molécules.

La dispersion de Taylor est un phénomène de dispersion qui se produit lorsqu'une molécule est exposée à un flux laminaire dans un tube. Son principe est schématisé sur la **Figure 27A**. Le profil de vitesse d'un écoulement laminaire dans un tube (microcanal cylindrique) est parabolique, schématisé ici par des flèches [189]. La vitesse du fluide est plus forte au milieu du tube et est presque nulle vers les parois.

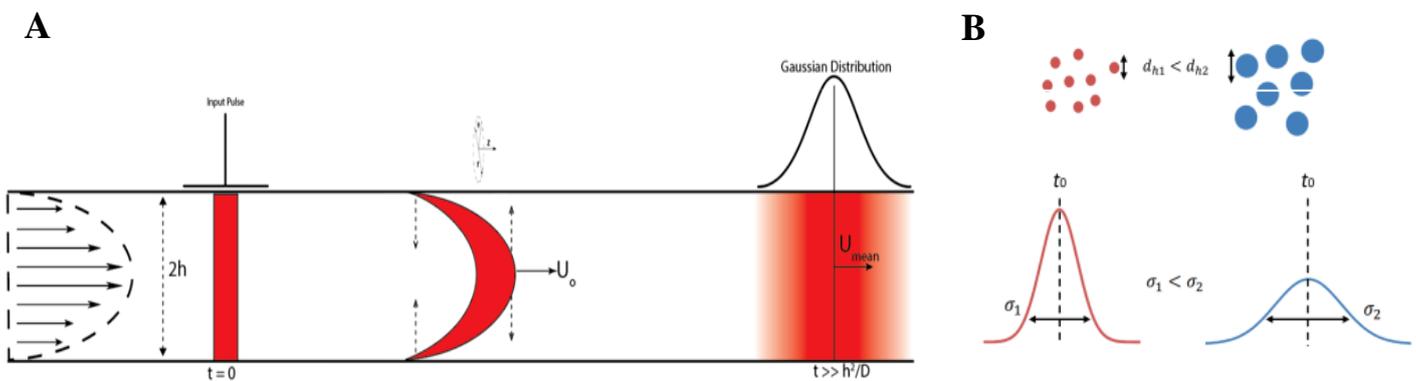


Figure 27 : (A) Schéma de fonctionnement de la TDA (B) Représentation schématique d'un taylogramme en fonction de la taille des particules. ;

Les analyses par dispersion de Taylor sont souvent réalisées sur un instrument de CE classique [190]. En effet, les dimensions de capillaire permettent de conserver le régime laminaire et la pression est adaptée pour le contrôle du flux. Ainsi, le signal détecté à la sortie du capillaire (typiquement la fenêtre de détection d'un capillaire d'un instrument CE) en fonction du temps est alors assimilable à un pic gaussien appelé taylogramme.

L'application de la TDA aux protéines thérapeutiques est plus récente par comparaison à d'autres méthodes comme la DLS [185]. Cependant, cette technique a aujourd'hui montré son potentiel pour déterminer le rayon hydrodynamique de 130 Acms différents (formulés dans le PBS à une concentration en Acms de 1,5 mg/mL, dont 106 Acms humanisés et 24 chimériques). Pour cette expérience, un faible volume d'échantillon (63,3 nL à 1,5 mg/mL) est utilisé et ne nécessite pas d'étape de préparation d'échantillon [191]. Cette étude de Lavoisier et al. a permis la comparaison des rayons hydrodynamiques obtenus en DLS et TDA. Les auteurs ont observé que ces deux techniques montrent des résultats similaires lorsqu'il s'agit de populations relativement homogènes (ne comportant que des monomères). Par ailleurs, d'autres études ont utilisé la TDA afin de déterminer la stœchiométrie, la taille, la cinétique d'interaction, ainsi que la constante d'affinité des complexes anticorps-antigènes [192]. Pederson et al. ont montré les différentes stœchiométries que pouvaient présenter un

complexe composé par un anticorps (Adalimumab) et sa cible (le TNF-alpha), et par conséquent, refléter des différences d'affinité [193]. La **Figure 28** montre comment les fractions des complexes de stœchiométries différentes évoluent en fonction de la concentration en Adalimumab pour une concentration fixe en TNF- α (100 nM).

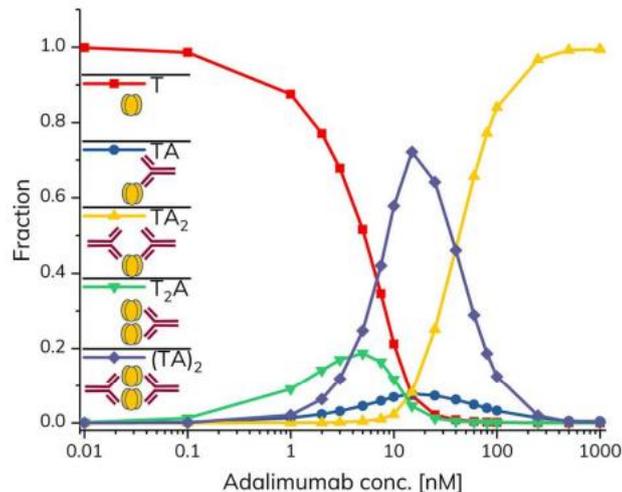


Figure 28 : Étude simultanée des différentes populations de complexes de l'Adalimumab et du TNF- α en fonction de la concentration en Adalimumab, pour une concentration fixe en TNF- α (100 nM) par TDA (Pederson et al. 2011) [193].

Lorsqu'un échantillon est injecté par pression, les espèces au milieu du tube se déplacent plus vite que les espèces interagissant avec les parois, ce qui entraîne la formation d'un gradient de concentration. La dispersion des particules se fait uniquement par diffusion radiale (diffusion longitudinale est négligée) et dépend de leur taille des particules [194]. La **Figure 27B** présente la forme du pic en fonction de la taille des particules. En effet, les espèces atteignent une vitesse moyenne, celles au cœur du capillaire se dispersent vers les parois tandis que celles proches des parois sont entraînées vers le centre. Les petites molécules diffusent rapidement, elles ont donc une dispersion moindre, dans ce cas le pic est fin. En revanche, la diffusion d'un analyte plus gros, comme une protéine ou une nanoparticule, est plus lente, donc le pic observé est large.

Les différences entre DLS et TDA dans leur sensibilité apparente pour détecter l'agrégation peuvent s'expliquer par les différents principes de mesure qui sous-tendent ces deux techniques. La mesure par DLS est biaisée pour les grandes tailles, car l'intensité de la lumière diffusée par les grandes tailles masque celle des plus petites. En revanche, la TDA, est basée sur la concentration molaire, qui suppose que les protéines sous forme de monomères ou d'agrégats sont détectées de manière égale (en négligeant la contribution de la diffusion de la lumière à la densité optique) et ainsi la moyenne des rayons hydrodynamiques des mélanges est une moyenne numérique. La TDA est donc plus pondérée et adaptée aux études se focalisant sur les interactions protéine-protéine, tandis que la DLS identifiera plus facilement les

agrégats de plus grande taille [185].

2.2.1.4 Agrégats de faibles poids moléculaires et fragments

a) Chromatographie d'exclusion stérique

Parmi toutes les méthodes analytiques, la chromatographie d'exclusion stérique (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) est la méthode de référence pour une évaluation qualitative et quantitative des petits agrégats. Elle est également employée pour réaliser des études de stabilité d'Acms comme d'autres méthodes chromatographiques (RP, IEX, HIC) [195].

Cette méthode est considérée comme non dénaturante, car ses conditions d'analyse permettent de conserver les protéines à l'état natif, c'est-à-dire sans modification de structure ou conformation. La SEC est fondée sur une séparation selon le rayon hydrodynamique des molécules. La phase stationnaire est constituée de particules sphériques poreuses avec des tailles de particules et de pores contrôlés et judicieusement choisies selon la taille des molécules que l'on souhaite séparer. Les molécules diffusent à l'intérieur de la colonne sans mécanisme de rétention et vont se déplacer à l'aide de la phase mobile. En SEC, il est supposé qu'il n'y ait pas d'interaction entre la phase stationnaire et les analytes afin que les séparations soient uniquement fondées sur la taille des analytes, ainsi les phases stationnaires sont inertes [196].

La SEC peut permettre de détecter des oligomères dans la plage de taille de 1 nm à 50 nm et offre de nombreux avantages tels qu'une analyse rapide des échantillons (20-40 min), un débit élevé d'échantillons (séquences automatiques), une capacité pour différencier les monomères des oligomères [92]. Malgré tous ces avantages, cependant, la SEC souffre de plusieurs limitations. Celles-ci incluent, en particulier, l'adsorption d'agrégats sur le support de la colonne, bien que les interactions secondaires soient supposées négligeables.

Sélectivité de la SEC

Idéalement en SEC, la séparation est exclusivement régie par l'exclusion de taille. Le volume d'élution des protéines V_e est défini comme :

$$V_e = V_i + K \cdot V_p \quad (5)$$

où V_i , K , V_p sont respectivement le volume interstitiel, le coefficient de partage du soluté et le volume des pores. En traçant le logarithme du poids moléculaire (*Molecular weight*, M_w) en fonction du volume d'élution, un ajustement polynomial peut faire correspondre les points expérimentaux avec une partie linéaire dans la plage d'élution.

$$\log M_w = A \cdot V_e + B \quad (6)$$

A et B sont respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine. La pente est déterminée par la distribution de la taille des pores, tandis que l'intersection dépend du diamètre moyen des pores. Les valeurs $\log M_w$ ont été tracées en fonction du volume de colonne normalisé (V_N) défini comme le rapport du volume d'élution (V_e) et du volume de colonne (V_c), comme il suit :

$$V_N = \frac{V_e}{V_c} \quad (7)$$

Ainsi, la limite d'exclusion (grosses molécules non retenues) et la perméation totale (petites molécules retenues) des différentes colonnes sont directement comparables [197]. Les limites des colonnes SEC peuvent donc être déterminées graphiquement comme montré **Figure 29**.

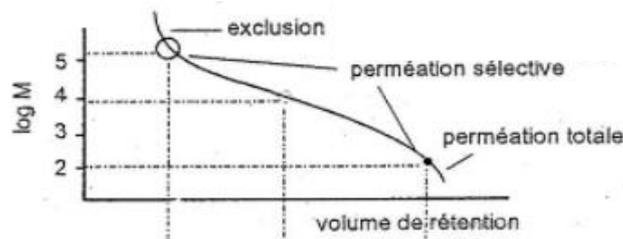


Figure 29 : Schéma de calibration en chromatographie d'exclusion stérique en représentant le $\log M_w$ en fonction du volume de rétention. Cette méthode de calibration permet de déterminer les volumes d'exclusion et de perméation totale.

Choix de la phase stationnaire

- Choix des particules

Afin de pallier les problématiques d'adsorption, plusieurs phases stationnaires ont été développées pour limiter les interactions non spécifiques (hydrophobes ou électrostatiques) entre les particules de silice de la phase stationnaire et les analytes [197]. Ainsi, des colonnes remplies de particules de silice BEH (hybride d'éthylène ponté) de $1,7 \mu\text{m}$ ont été introduites pour des applications en SEC permettant de réduire les interactions, et donc d'améliorer la diffusion des analytes.

Ces particules BEH sont constituées de silice et d'organo siloxanes qui forment des polymères de poly-ethoxyoligosilane. Cette technologie permet de réduire considérablement les interactions avec les silanols résiduels.

- Choix des tailles de pores

Par ailleurs, le choix de la phase stationnaire est également influencé par l'efficacité de la colonne. En chromatographie, l'efficacité (capacité cinétique) d'une colonne peut être décrite mathématiquement par l'équation de Van Deemter.

$$H = A + B/v + Cv \quad (8)$$

Le terme A correspond à la diffusion turbulente (Diffusion d'Eddy) et dépend du chemin suivi par la molécule à l'intérieur de la phase stationnaire. La diffusion longitudinale traduite par le coefficient B correspond à la dispersion de l'analyte à l'intérieur de la colonne dans la phase mobile. Enfin, le terme C est la résistance au transfert de masse de l'analyte entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Dans le cas des macromolécules telles que les anticorps monoclonaux, le terme- C de cette équation est important et est à l'origine d'une perte d'efficacité des colonnes. Ce terme- C correspond à la résistance au transfert de masse et traduit le temps nécessaire à l'analyte pour traverser la particule. Il dépend donc de la taille des particules et de la diffusion des analytes à travers les colonnes. La taille des pores a en conséquence une influence importante sur les performances cinétiques d'une colonne. De larges pores permettent aux Acms de circuler avec une plus grande facilité dans la phase stationnaire, ce qui diminue la résistance au transfert de masse (terme- C) [198].

La taille des pores détermine également l'intervalle de poids moléculaire (M_w) des protéines qui peuvent être analysées (**Figure 30**). Lorsque les agrégats sont de tailles trop importantes, ceux-ci vont co-éluer, en effet, au-delà d'une certaine taille, les molécules ne rentrent plus dans les particules et ne peuvent donc plus être séparées. Il est généralement admis que les colonnes sont adaptées lorsque les pores des particules sont trois fois supérieurs à la taille des molécules ciblées. Pour les anticorps, il est estimé que les colonnes avec des pores à partir de 300 Å sont adéquates.

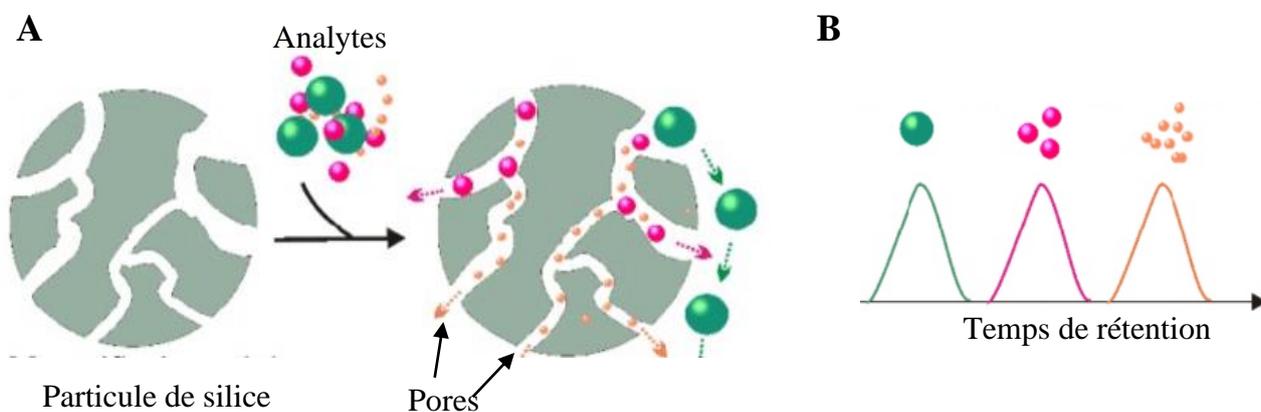


Figure 30 : (A) Représentation schématique des particules de chromatographie d'exclusion stérique. En vert sont représentés les analytes de M_w élevée par rapport à la taille des pores, en rose les analytes de M_w intermédiaire, en orange ceux de M_w faibles. (B) Schéma du chromatogramme obtenu en fonction de la taille des analytes (Yang et al., Theranostics, 2020, vol 10, 3684-3705).

Importance de la phase mobile

Une fois que la phase stationnaire est sélectionnée, la phase mobile doit être optimisée. L'enjeu ici est de conserver les interactions intermoléculaires afin de ne pas dissocier les agrégats en monomères. Ainsi, la SEC native nécessite l'utilisation de concentrations modérées en sels. Par exemple, les sels à base de phosphates sont largement utilisés entre de 0,1 et 0,4 M à des pH relativement neutres (pH 6,2 et 7,4) pour respecter les conditions natives [196]. Les sels permettent de limiter les interactions électrostatiques avec la silice, en particulier avec les silanols résiduels, lorsque que le pH est supérieur à 6,8 (la silice est alors protonnée). Goyon et al. a notamment cherché à démontrer que le choix des ions des différents sels affecte fortement les interactions, et notamment, les ions potassium, par exemple, étant plus encombrant que les ions sodium, vont permettre de mieux masquer les résidus de silice non protonnés [197].

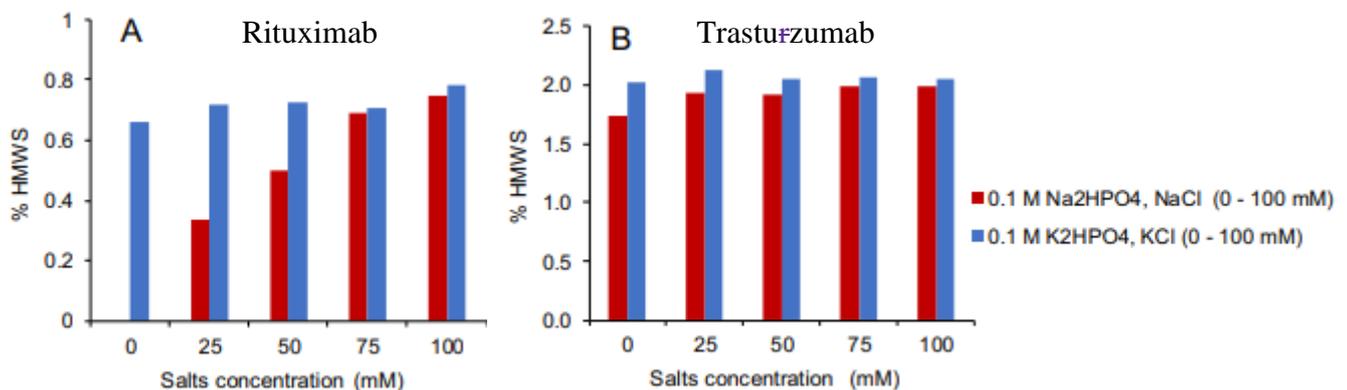


Figure 31 : Analyse de petits agrégats de Rituximab (A) et Trastuzumab (B) à l'aide de phases mobiles à base de sodium et de potassium. La comparaison a été obtenue avec des phases mobiles contenant 100 mM de phosphate de sodium dibasique ou de phosphate de potassium dibasique en faisant varier le NaCl ou le chlorure de potassium par incrément de 25 mM avec un pH égal à 6,8 et une température de colonne à 25°C. (Goyon et al. 2017) [197]

En effet, dans cette étude, des phases mobiles à base de sodium et de potassium ont été comparées lors de l'analyse du Trastuzumab et du Rituximab (**Figure 31**). La concentration de phosphate de sodium dibasique ou de phosphate de potassium dibasique a été maintenue à 100 mM (pH 6,8), tandis que la concentration de NaCl ou de chlorure de potassium a été modifiée de 0 à 100 mM par pas de 25 mM. Des niveaux similaires d'agrégation ont été mesurés avec le Trastuzumab quel que soit les phases mobiles. Pour le Rituximab, le niveau de HMW est resté constant (0,7 à 0,8 %) avec la phase mobile composée de potassium (100 mM, pH 6,8), tandis que la quantité de HMW augmente de 0 à 0,8 % lors de l'utilisation de la phase mobile à base de sodium (100 mM, pH 6,8). Alors que 0,6 % de HMW ont été mesurés en utilisant uniquement le tampon dibasique de phosphate de potassium 100 mM, aucun agrégat n'a été détecté avec le tampon dibasique de phosphate de sodium 100 mM. Par conséquent, les cations de potassium ou de sodium peuvent exercer deux effets : (1) réduire les interactions électrostatiques secondaires en protégeant les silanols acides de la phase,

(2) favoriser les attractions hydrophobes entre les protéines monomères en protégeant leurs charges. D'après la série de Hofmeister pour les cations, le potassium a une capacité supérieure à celle du sodium à augmenter la tension superficielle des solutions, donc à augmenter la stabilité des protéines et réduit ainsi le risque de générer des agrégats lors de l'analyse SEC [199].

De même, les contre-ions vont également jouer un rôle selon leur effet de « salting-out » qui va amplifier l'hydrophobicité des molécules, et ainsi moduler ce type d'interaction secondaire avec la phase stationnaire. Un des moyens pour réduire les interactions hydrophobes est alors de diminuer la force ionique de ces contre-ions. Cependant, ces ions contribuent aussi à une séparation efficace des composés analysés. Il s'agit donc de trouver un compromis entre interactions non spécifiques et résolution des pics.

Enfin, une alternative pour réduire les interactions hydrophobes avec la phase stationnaire est l'ajout de solvants organiques dans la phase mobile. Néanmoins, les proportions de solvants organiques doivent rester limitées afin d'éviter de dénaturer les protéines.

La détection

La SEC à l'avantage d'être compatible avec plusieurs types de détecteurs tels que les détecteurs, UV, à fluorescence (Fluoresce Laser Detection, FLD), ainsi qu'à diffusion de la lumière multi-angle (Multi Angle Light Scattering, MALS). Ce dernier fournit des informations sur la distribution des sous-populations, de manière quantitative et qualitative. Le MALS associé à un détecteur de concentration (réfractomètre ou UV) permet aussi de déterminer la masse molaire de chaque population [200], [201]. Enfin, la SEC peut être couplée à la MS à condition que les sels de la phase mobile soient volatiles (sels d'ammonium) [199].

Utilisation de la SEC

Pour ces travaux de thèses, nous avons cherché à respecter ces recommandations sur le choix de la phase stationnaire et de la phase mobile. De plus, sachant que notre problématique était liée à la détection de formes dégradées d'Acms, il était important de garantir des conditions analytiques permettant de préserver les agrégats pendant l'analyse et éviter les artéfacts liés à la méthode analytique pouvant provoquer la formation de petits oligomères. À ce titre, nous avons vérifié nos résultats, et ainsi montré que les agrégats observés étaient indépendants de la méthode par SEC, grâce au fractionnement par couplage Flux-Force à Flux asymétrique (A4F) dont le principe sera détaillé dans le paragraphe suivant.

b) Fractionnement par couplage flux-force A4F

Une autre technique basée sur la séparation et le fractionnement des Acms en fonction de leur taille est le fractionnement flux champ-flux (FFF). Cette technique est constituée d'un canal de diamètre allant de 5 à 500 μm et d'une membrane perméable située en bas du canal (paroi d'accumulation). L'échantillon est transporté le long du canal par un flux laminaire jusqu'aux détecteurs. La séparation est possible grâce à une force appliquée perpendiculairement au flux laminaire. Cette force peut être de nature différente (hydrodynamique, électrique, thermique...), elle détermine le mode de FFF [202]. Le mode de FFF le plus classique applique une force hydrodynamique et un flux de phase mobile perpendiculaire au canal qui entraîne la séparation des molécules selon leurs tailles. Il s'agit du fractionnement flux champ-flux asymétrique (AF4) (voir **Figure 32**).

En effet, dû à leur plus grand coefficient de diffusion, les petites molécules se déplacent au centre du canal, tandis que les molécules de tailles plus importantes s'accumulent au bas du canal. Le profil d'écoulement étant parabolique, les petites molécules au centre du canal, où la vitesse du flux est plus élevée, migreront plus rapidement. Celles plus proches de la paroi, les molécules de plus grandes tailles, sont entraînées par le flux et leur vitesse sera plus faible.

La FFF peut séparer les protéines et autres particules sans phase stationnaire et sous des pressions beaucoup plus faibles que dans les méthodes chromatographiques conventionnelles [203]. En effet, cette technique ne repose pas sur un phénomène de rétention à l'aide d'une phase stationnaire contrairement aux méthodes chromatographiques classiques (en supposant que la membrane soit complètement inerte). La phase mobile, joue uniquement le rôle de vecteur qui déplace les molécules, elle peut être choisie de manière à obtenir des conditions non dénaturantes (milieu physiologique, par exemple). Cette technique a l'avantage d'être compatible avec plusieurs types de détecteurs qui peuvent même être placés en série ; UV, diffusion de la lumière multi-angle (MALS) et le réfractomètre, fournissant des informations sur la distribution de taille et la masse des agrégats.

Cependant, les inconvénients majeurs de la FFF sont la quantité de matière à analyser et la forte dilution des échantillons liée à la technique en comparaison avec la SEC par exemple. C'est notamment pour cette raison que nous n'avons pas poursuivi avec cette technique.

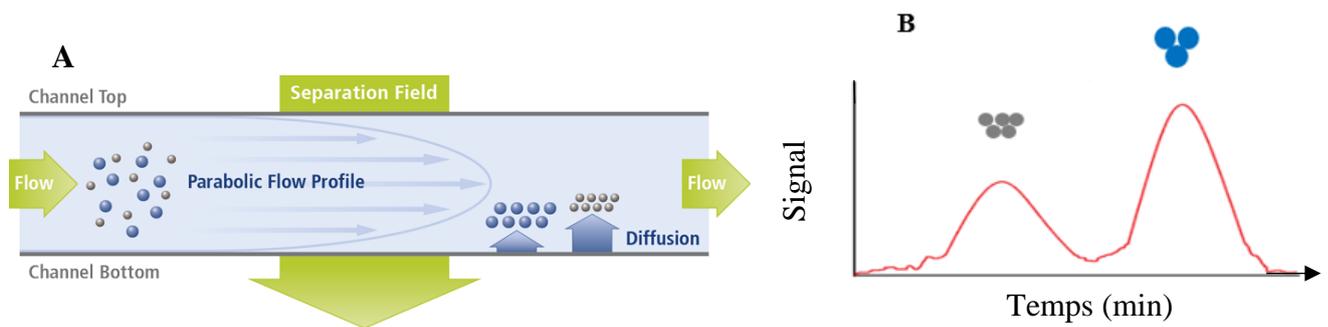


Figure 32 : (A) Représentation schématique d'un canal FFF. La position de l'échantillon est déterminée par deux courants d'écoulement indépendants, à savoir l'écoulement axial du liquide porteur et l'écoulement transversal vertical, propulsant les composants de l'échantillon vers la paroi d'accumulation. (B) Schéma du fractogramme résultant [204].

c) CE-SDS

CE-SDS est une méthode électrophorétique standard utilisée dans le but d'évaluer l'hétérogénéité de taille des protéines dans des conditions dénaturantes. Lors de la préparation des échantillons, les échantillons sont chauffés avec un excès de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour dénaturer les protéines. Cet agent réducteur clive les ponts disulfures et interagit avec les parties hydrophobes de la protéine (partie dodecyle) et charge la protéine négativement (partie sulfate de sodium). Le SDS conduit ainsi à des rapports masse/charge similaires des protéines [205]. Ainsi, les complexes SDS-protéine migrent avec la même mobilité sous l'effet d'un champ électrique. Les molécules ne sont alors discriminées que par leurs tailles [206], [207].

Cette approche étant fortement dénaturante, elle ne sera donc pas développée dans ce manuscrit.

d) Ultracentrifugation analytique

Depuis le début du XXI^e siècle, l'ultracentrifugation analytique de la vitesse de sédimentation (Sedimentation Velocity - Analytical Ultra Centrifugation, SV-AUC) est de plus en plus utilisée par l'industrie pharmaceutique pour caractériser quantitativement les agrégats d'anticorps, en particulier, les agrégats d'anticorps solubles d'un diamètre inférieur à 100 nm [208]. La SV-AUC repose sur un principe simple : lorsque des molécules en solution sont soumises à une force centrifuge, elles se déposent à une certaine vitesse par sédimentation. Avec une corrélation mathématique entre le comportement de sédimentation et les propriétés hydrodynamiques, il est possible de déterminer la taille de ces molécules en suspension. L'avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas de changer le milieu des anticorps. Néanmoins, en comparaison, la SEC a des avantages : la quantification d'agrégats, la vitesse, la sensibilité (limite de quantification de 0,1% d'agrégats contre 0,6 à 1,0% dans le cas de SV-AUC) et une reproductibilité élevée [208].

Les **Figures 33A et 33B** montrent un exemple de distributions des coefficients de sédimentation $c(s)$ de l'échantillon d'anticorps natif et de l'échantillon comportant des dimères d'anticorps [209].

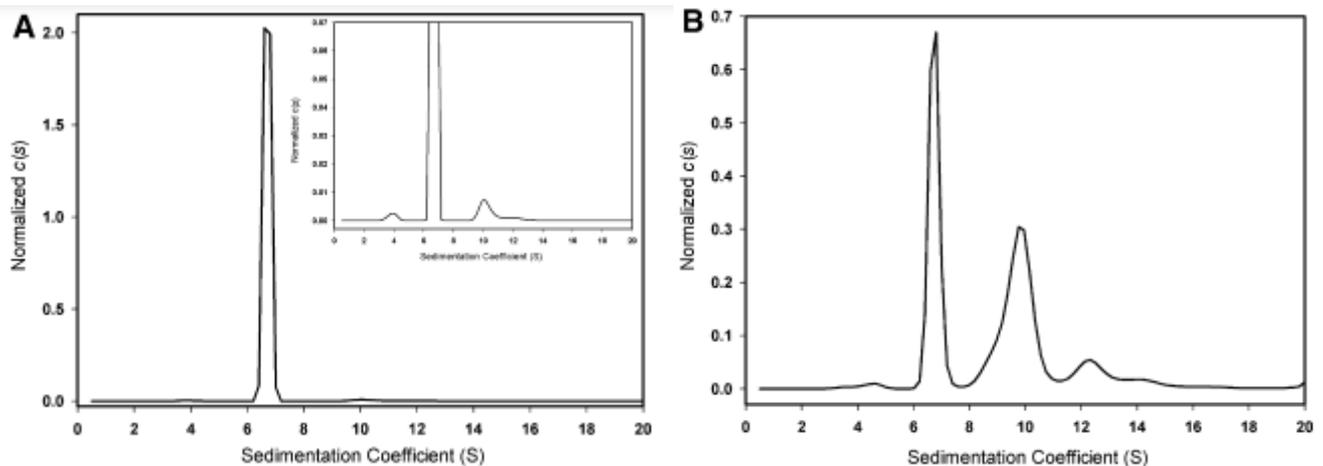


Figure 33 : Distributions du coefficient de sédimentation $c(s)$ déterminées par AUC–SV pour un anticorps purifié **(A)** et une fraction chromatographique de la même protéine enrichie en agrégat **(B)**. (Pekar et al. 2007) [209].

e) Indice d'agrégation par spectroscopie UV

L'indice d'agrégation fournit une analyse semi-quantitative de l'agrégation des anticorps et peut être déterminé en mesurant simplement le spectre UV/Visible de l'échantillon. Afin de déterminer cet indice, l'équation suivante est utilisée :

$$I_A = \left[\frac{A_{340}}{A_{265} - A_{340}} \right] \times 100 \quad (9)$$

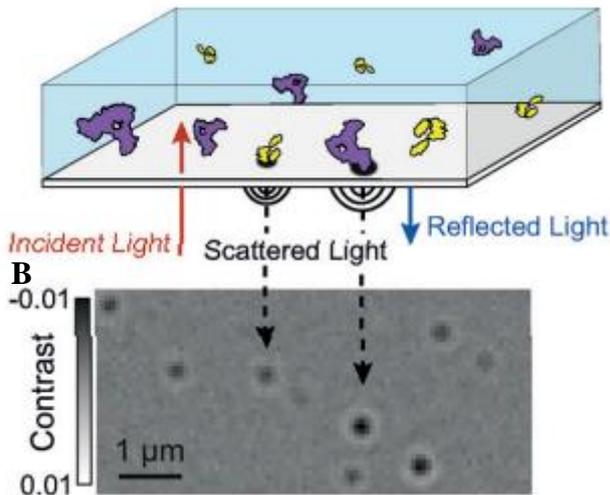
I_A l'indice d'agrégation, A_{340} et A_{265} les absorbances aux longueurs d'ondes 340 nm et 265 nm respectivement. Lorsque l'indice d'agrégation est inférieur à 3, l'échantillon est une solution transparente. De 3 à 30, une certaine agrégation peut exister, et au-dessus de 30, l'échantillon est fortement agrégé [210].

f) Photométrie de masse

Récemment, une nouvelle technique a été proposée pour caractériser les molécules dites de hauts poids moléculaires, la photométrie de masse (*Mass Photometry*, MP) [211]. La MP détecte des biomolécules uniques par leur diffusion de la lumière lorsqu'elles se lient de manière non spécifique à une surface de verre associée à un microscope. Chaque événement (dépôt d'une molécule ou un complexe sur la surface de verre) entraîne une modification de l'indice de réfraction à l'interface verre/eau, ce qui modifie efficacement la réflectivité locale et peut être détecté avec une grande précision en tirant parti de l'interférence entre la lumière diffusée et réfléchi (**Figure 34A et 34B**). Le changement de réflectivité est proportionnel à la masse moléculaire,

avec une résolution de masse allant jusqu'à 20 kDa et une précision de masse de 2% par étalonnage avec des biomolécules de masses connues. L'évaluation des distributions de masse par MP est quantitative. Par ailleurs, des études ont proposé des méthodes pour extraire efficacement, non seulement les affinités de liaison, mais également la cinétique de formation des complexes [212], [213], [214], [213].

A



C

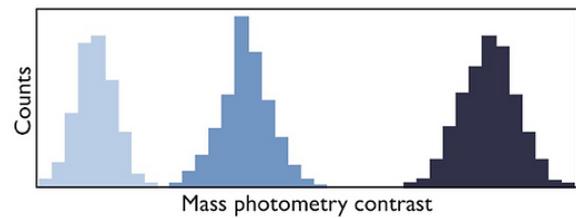


Figure 34 : Principe de détection par photométrie de masse. **(A)** Détection d'une seule molécule par imagerie de l'interférence de la lumière diffusée et réfléchi résultant d'événements à une interface au cours du temps. **(B)** Imagerie des contrastes de molécules. **(C)** Distributions de masse représentées sous forme d'histogramme. (Soltermann et al. 2020) [213].

Wu et al. ont caractérisé les interactions anticorps-antigène par MP. Un des objectifs est notamment de déterminer les constantes d'équilibre d'association pour plusieurs sites de liaisons anticorps-antigène. La **Figure 35** montre les histogrammes de distribution de contrastes obtenus en MP pour des échantillons avec une concentration constante d'AHT (antihumain monoclonal de souris, anticorps anti-thrombine) de 25 nM, et une concentration d'HT (α -thrombine humaine) augmentant de 0 à 120 nM. Le premier histogramme (**Figure 35A**) montre un seul pic représentant l'AHT libre ($M_w = 149$ kDa). Un très faible épaulement sur cet histogramme peut représenter un faible pourcentage de dimères, d'agrégats ou d'impuretés d'AHT. Avec l'augmentation de la concentration de HT, les populations d'AHT complexées augmentent (**Figure 35B – F**) et deux pics de masses moléculaires plus élevées se forment. Ces deux pics représentent les complexes AHT.HT ($M_w = 186$ kDa) et AHT.HT₂ ($M_w = 223$ kDa). La distribution MP pour le mélange 25 nM HT et 60 nM AHT (**Figure 35E**) montre la présence d'une population de monomères (AHT) et deux populations de complexes (AHT·HT et AHT·HT₂), de gauche à droite, respectivement [215].

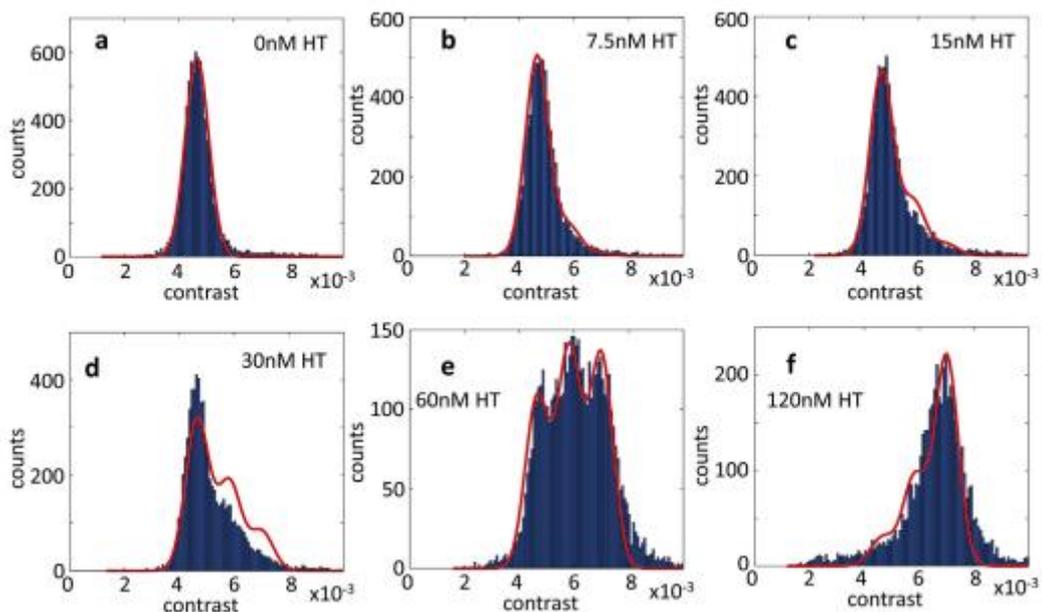


Figure 35 : Évaluation des affinités AHT et HT et des données obtenues par photométrie de masse. Les histogrammes de distribution de contraste notés de **a** à **f** pour des solutions de 25 nM d'AHT et de l'HT à des concentrations de 0, 7.5, 15, 30, 60, et 120 nM, respectivement. (Wu et al. 2020) [215].

L'avantage majeur de la photométrie de masse est qu'elle permet de limiter les préparations d'échantillons, ne nécessite pas de marquage, et évite les inconvénients liés aux colonnes en chromatographie (adsorption). De plus, cette technologie est simple à mettre en œuvre, facile à utiliser et à interpréter. Néanmoins, une étape de dilution est nécessaire (concentration moyenne tolérée 10 nM), celle-ci peut déstabiliser les équilibres monomère-oligomères et peut conduire à des erreurs d'interprétation.

2.2.1.5 Conclusions

La caractérisation des agrégats est complexe. Premièrement, chaque technique analytique a ses avantages et inconvénients, c'est pourquoi une combinaison de diverses techniques est souvent recommandée. Ces techniques reposent sur des principes différents, ce qui permet l'obtention de données équivalentes ou complémentaires. Les agrégats sont des attributs de qualité critiques auxquels les autorités accordent une grande importance [175]. Actuellement, en réponse aux problématiques de caractérisation des variants de tailles, la solution est de confronter les résultats obtenus à l'aide des différentes technologies pour conclure sur l'état d'agrégation de l'échantillon. Pour les agrégats de l'ordre des nanoparticules (dimères, trimères...), la chromatographie d'exclusion stérique reste la méthode de référence, cependant des nouveaux outils émergent, c'est le cas notamment de la photométrie de masse.

2.2.2 Variants de structure

Tous les niveaux de structures des protéines ont leurs impacts sur la stabilité des anticorps, il est donc nécessaire de les évaluer pour limiter les risques sur la santé des patients [62]. La séquence d'acides aminés (structure primaire) donne un indice important sur le fait qu'une protéine est sujette ou non aux modifications de conformation. Des variations subtiles dans la séquence et la structure des Acms peuvent influencer leur stabilité, et en particulier, lorsque ceux-ci sont exposés à des conditions de stress [216]. Il a été démontré notamment sur des biosimilaires que la séquence primaire était le principal facteur affectant la stabilité lors de la comparaison des deux anticorps.

De même, la structure tertiaire peut exercer une influence non négligeable sur l'agrégation, selon le dépliement de la molécule. En effet, d'autres travaux ont montré que les protéines partiellement dépliées sont plus sujettes à l'agrégation que les protéines natives [19].

2.2.2.1 Structure primaire : *peptide mapping*

Une méthode courante pour évaluer la structure primaire d'un anticorps monoclonal et d'autres produits pharmaceutiques est la cartographie peptidique [156], [217], [218] (*peptide mapping*). Cette méthode était souvent réservée pour comparer des séquences. Cependant, plus récemment, elle s'est imposée dans de nombreuses procédures de contrôle qualité grâce à sa capacité de suivi simultané de plusieurs PTM ou autres dégradations [69]. En effet, le *peptide mapping* couplé à la MS s'intègre parfaitement dans la démarche de MAM (décrite dans le **Chapitre I**) et offre l'avantage de mesurer plusieurs modifications protéiques en une seule analyse MS.

La cartographie peptidique consiste à digérer les biomolécules d'intérêts à l'aide d'une protéase, cela permet de cliver la protéine en peptides spécifiques [68]. Ces peptides sont séparés par LC [219] ou CE [15], [206], [207], [220], et analysés par absorbance UV-vis [221] ou par spectrométrie de masse [13], [66], [68], [222]. La cartographie peptidique est devenue un outil précieux pour le secteur de la biotechnologie, permettant le suivi de l'oxydation [223], [224], de la désamidation [225], [226], [227], et d'autres produits de dégradation des échantillons (cyclisation N-terminale [228], lysine C-terminale [229] et N-glycosylation...). Les cartes peptidiques permettent également de déterminer la présence de liaisons (disulfure, des cystéines non appariées, des groupes thiol libres). La **Figure 36** permet de visualiser l'ensemble des informations qui peuvent être obtenues par *peptide mapping*.

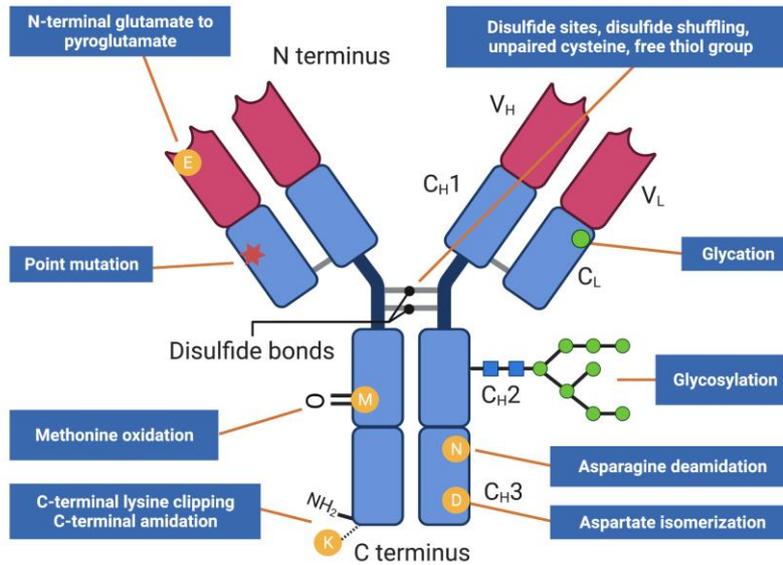


Figure 36 : Infographie montrant les types d'hétérogénéité des anticorps qui peuvent être analysés par cartographie peptidique [230].

La première étape pour effectuer un *peptide mapping* consiste en une préparation d'échantillon en trois temps appelée approche *bottom up* décrite **Figure 37**. L'anticorps initialement à l'état natif est dénaturé, puis réduit et alkylé, puis digéré enzymatiquement en peptides [127].

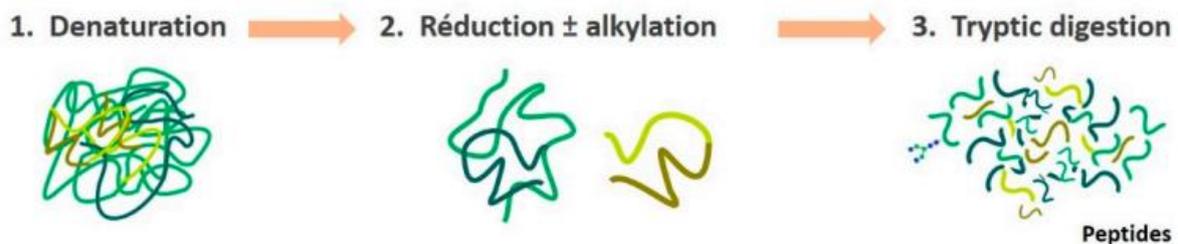


Figure 37 : Étapes de l'approche *Bottom up* pour l'obtention de peptides. [127]

L'étape suivante du *peptide mapping* est la séparation des différents peptides par LC ou CE. Enfin, une étape importante est le traitement de l'information obtenue par les détecteurs (UV ou MS). Ces successions d'étapes sont présentées dans la **Figure 38** ci-dessous.

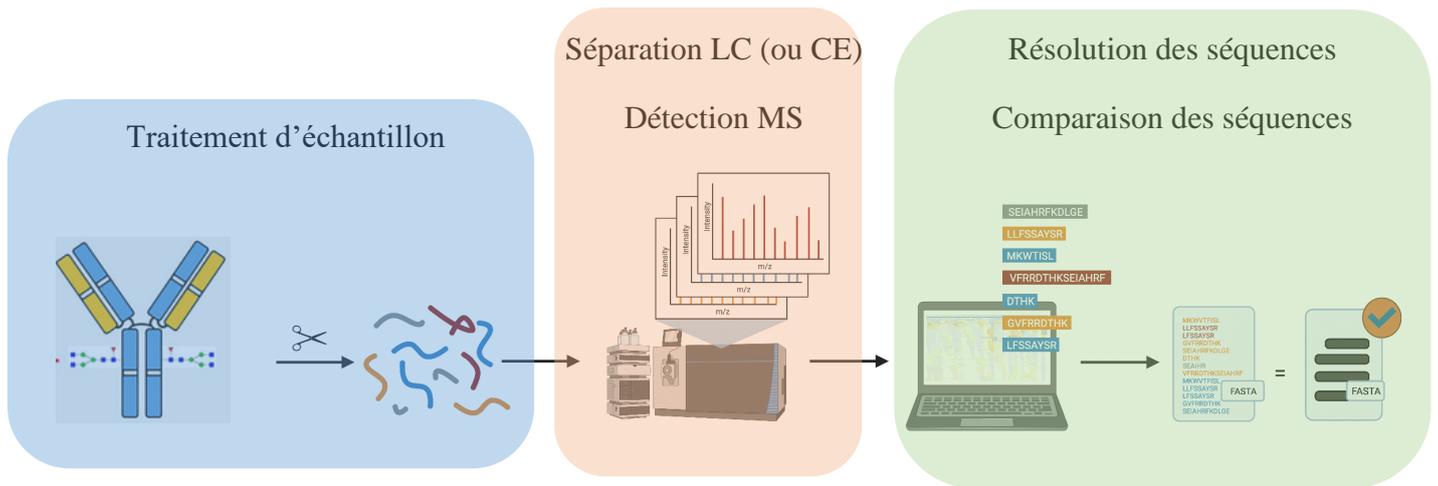


Figure 38 : Représentation schématique des étapes pour l'obtention de la carte peptidique et le traitement de données.

La cartographie peptidique est donc une approche nécessaire pour une étude approfondie des variants de structure (primaire) et tend à être optimisée pour être intégré au mieux dans un processus de contrôle qualité (plus rapide, automatisée, simplification du traitement de données par les opérateurs) [221].

2.2.2.2 Structures secondaires et tertiaires

Pour chaque niveau de structures, il existe une attente réglementaire pour fournir des informations sur les différents ordres de structures (primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire). Pour les protéines de hauts poids moléculaires telles que les anticorps monoclonaux, la détermination des structures d'ordres supérieurs peut être réalisée par plusieurs techniques déjà appliquées en routine comme le dichroïsme circulaire, et les différents types de spectroscopies.

a) Spectroscopie Raman et Infrarouge

Les spectroscopies infrarouges (IR) et Raman ont largement été utilisées dans la caractérisation structurale des protéines, en particulier pour déterminer les changements dans la structure secondaire et/ou tertiaire des protéines dans différentes matrices. Plus récemment, ces techniques ont également montré leur capacité à suivre les PTM [231], [232].

La spectroscopie Raman est une technique vibrationnelle qui peut fournir des empreintes moléculaires en utilisant des vibrations uniques de différentes liaisons au sein d'une structure moléculaire pour identifier les groupes fonctionnels et l'arrangement chimique global de la molécule analysée. Cependant, les Acms sont des protéines complexes avec plusieurs domaines constitués de centaines d'acides aminés qui peuvent tous influencer le profil de la protéine. Le traitement des données demande donc les connaissances spécifiques pour interpréter les spectres [180], [233],[234].

L'équipe Zhang et al. a développé une méthode par spectroscopie Raman associée à la chimiométrie pour identifier les échantillons comportant des agrégats. En effet, la **Figure 39B**, permet d'effectuer une comparaison entre deux échantillons, un échantillon standard d'Acm natif et un échantillon comportant 50% d'agrégats obtenus par fractionnement (en SEC). Cette figure montre que plusieurs différences spectrales, liées à la présence d'agrégats dans l'échantillon, peuvent être mises en évidence. En particulier, la zone dans l'encadrement en pointillé a pu être utilisée par la suite pour des analyses multivariées afin de quantifier le niveau d'agrégation [235].

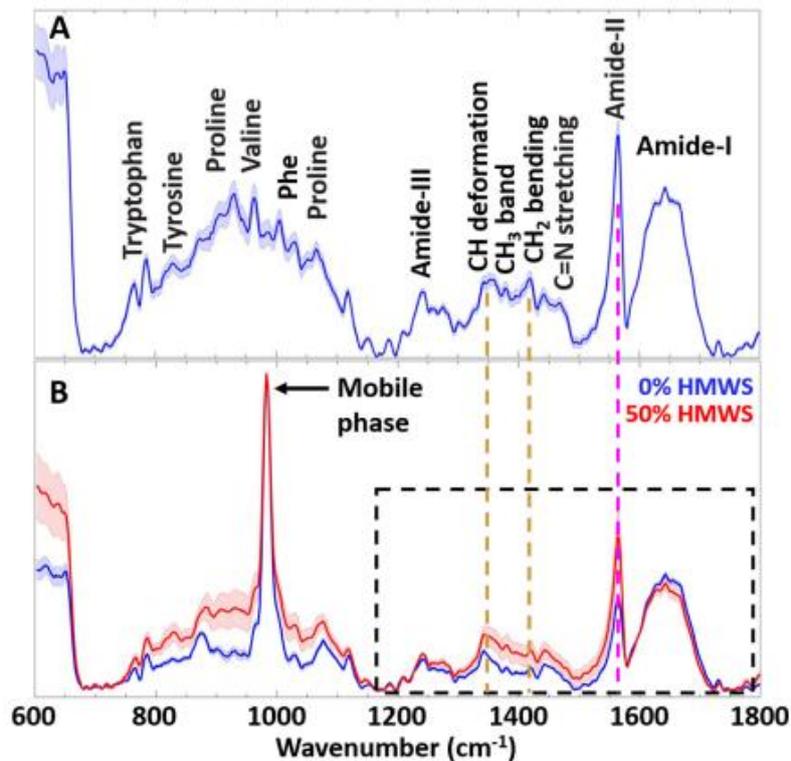


Figure 39 : (A) Spectres Raman d'un anticorps monoclonal. Les pics Raman de la gamme 600 à 1800 cm^{-1} sont identifiés et correspondent à différents acides aminés caractéristiques. (B) Spectres moyens obtenus à partir d'échantillons d'anticorps standard (courbe bleue) et un échantillon comportant 50 % (courbe rouge) d'agrégats obtenus par fractionnement. (Zhang et al. 2020) [235]

La spectroscopie infrarouge (*Fourier Transform Infrared spectroscopy*, FT-IR) a un principe proche du Raman, fondé sur l'identification des bandes spécifiques associées à la structure secondaire. Des peptides et protéines avec une composition connue d'hélice- α et de feuillet- β ont été utilisés comme éléments de comparaison pour déterminer la structure d'autres protéines. Cette technique est appliquée dans le contexte de contrôle qualité au cours des étapes de production des biothérapies et a permis également un suivi de la stabilité des anticorps soumis à des stress (stress thermique, agitation, pH) [25], [236].

b) Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (*Circular Dichroism*, CD) est l'une des techniques non destructives la plus utilisée pour évaluer les changements de conformation tels que la structure secondaire et tertiaire des protéines [203], [237].

Cette technique utilise une lumière polarisée circulairement dans laquelle le champ électrique tourne autour de l'axe de propagation à une amplitude constante. Ce champ électrique peut être considéré comme étant composé de deux composantes polarisées circulairement, l'une tournant dans le sens antihoraire (*Left-handed circularly polarized*, LCP) et l'autre tournant dans le sens horaire (*Right-handed circularly polarized*, RCP). Le dichroïsme circulaire fait référence à l'absorption différentielle par les molécules de ces deux composantes LCP et RCP (**Figure 40A**) [238]. Les composés actifs optiques tels que les protéines présentent une absorption différentielle de ces composantes et ont donc un profil type en dichroïsme circulaire. En conséquence, le différentiel d'absorption est représenté par la loi de Beer Lambert suivante :

$$\Delta A = A_L - A_R = \Delta \epsilon \cdot c \cdot l \quad (10)$$

Où ΔA est le signal d'absorption, A_L et A_R sont les absorptions de polarisation de la lumière orientées gauche et droite, respectivement, et $\Delta \epsilon$ est la différence entre les coefficients d'extinction molaire entre les deux composantes gauche et droite ; c est la concentration et l est la longueur du chemin optique. Cependant, les résultats en dichroïsme sont souvent rapportés en ellipticité qui est obtenue par une relation linéaire avec la différence d'adsorption : $\theta = 33 \Delta A$ avec θ en degré. Les spectres correspondent au tracé de θ en fonction de la longueur d'onde.

Il existe deux régions centrales pour étudier l'absorption des protéines par CD, l'UV lointain (190-250 nm), pour l'adsorption des liaisons amides et l'UV proche (350-250 nm) pour l'absorption des acides aminés aromatiques, soit tryptophane, tyrosine, phénylalanine. Pour l'UV lointain, les bandes d'absorption contiennent des informations sur la structure secondaire de la protéine étudiée, tandis que l'UV proche rend compte de la structure tertiaire (**Figure 40B**). Le principal inconvénient de l'utilisation de la région UV proche est que l'analyse nécessite une grande quantité de protéines en raison du faible nombre de chromophores dans l'échantillon. Dans le cadre de notre étude, la quantité d'échantillons par rapport aux tailles des cuves disponibles a été limitante.

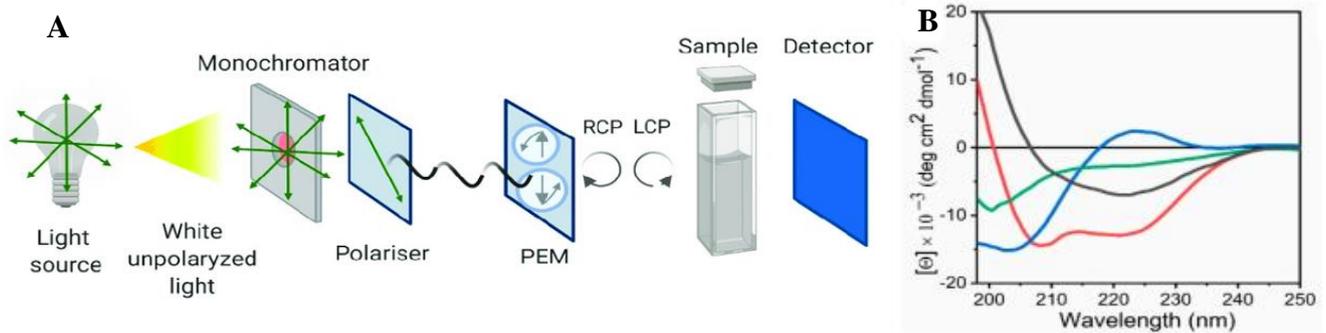


Figure 40 : (A) Représentation schématique du fonctionnement du dichroïsme circulaire. (B) Représentation caractéristique des spectres UV-lointain en dichroïsme circulaire pour les protéines. Enroulement aléatoire (vert), hélice- α (rouge), feuillet- β (noir) and Polyproline II (bleu) [210].

Le dichroïsme est notamment utilisé dans des contextes d'étude de stabilité. Par exemple, Joshi et al. ont étudié l'influence de différents stress sur la structure des Acms par CD [239]. La **Figure 41** illustre les modifications de structures pouvant être observées lors d'un changement de la composition du tampon ou de pH. L'Acm utilisé dans cette étude a conservé sa conformation en feuillet β (pas de changement de spectre) dans un tampon phosphate à pH 6,5 incubé pendant 6 h, mais sa conformation a été altérée dans un tampon citrate à pH 3 avec 100 mM de NaCl lorsqu'elle a été incubée durant 6 h à 4 °C.

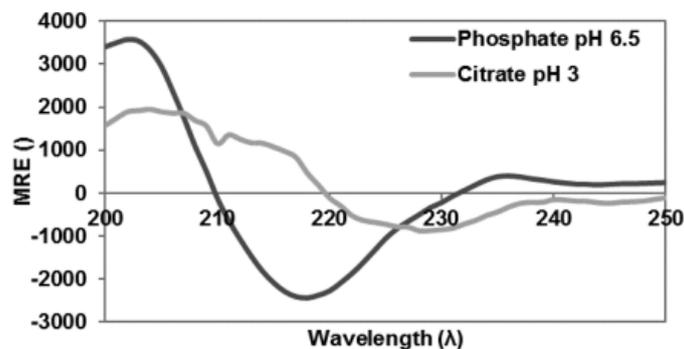


Figure 41 : Comparaison des spectres de CD UV lointain à 4 ° C pour des Acms incubés durant 6 h dans du tampon phosphate 15 mM à pH 6,5 (conformation intacte, teneur en agrégats de 4,3 %) et durant 6 h dans du tampon citrate 100 mM avec 100 mM de NaCl à pH 3 (conformation perdue, teneur en agrégats de 4,5 %). (Joshi et al. 2014)[239]

Le dichroïsme a l'avantage de permettre l'étude des caractéristiques structurales des protéines en solution. De plus, les données sont acquises dans une courte période. Le signal obtenu est peut-être retraité par des outils de chimiométrie permettant une interprétation plus simple des données.

c) Spectroscopie de fluorescence

La fluorescence est devenue l'une des propriétés physico-chimiques des Acms les plus utiles pour l'étude de l'agrégation des protéines, les changements de structures et de conformations. Les analyses par fluorescence sont sensibles, non destructives et offrent

la possibilité d'effectuer des mesures en temps réel pour évaluer le processus d'agrégation ou de dénaturation des anticorps.

Les approches les plus utilisées pour évaluer l'agrégation des protéines sont fondées sur la fluorescence intrinsèque des protéines. Celle-ci est basée sur les propriétés fluorescentes des acides aminés aromatiques (tyrosine (Tyr), tryptophane (Trp) et phénylalanine (Phe)). Ainsi, plusieurs études utilisent l'excitation sélective du tryptophane (295 nm) pour évaluer la stabilité des conformations des anticorps, ainsi que les changements de leur structures secondaires et tertiaires. En effet, les Trp sont très sensibles à leur environnement. Lorsque le nombre de Trp responsables de l'émission de fluorescence varie (selon la structure de la molécule qui les rend plus ou moins accessibles), par exemple, lors d'une dénaturation de l'anticorps, le profil en DC est affecté, ce qui traduit un changement de conformation [19], [240], [241].

d) Mobilité Ionique

La spectrométrie de mobilité ionique (*Ion Mobility*, IM) est une technique de séparation sélective selon la charge et la forme des ions. Cette technique est fondée sur la séparation en phase gazeuse des ions dérivant sous un champ électrique faible à travers une chambre remplie d'un gaz inerte circulant à contre-courant des ions. La séparation par IM est donc une forme d'électrophorèse capillaire en phase gazeuse, qui pour chaque ion rapporte un temps de dérive. Pour un même ion (même état de charge) avec deux conformères (des formes différentes), l'un avec une structure compacte et l'autre avec une structure étendue, la IM conduit à l'observation de deux temps de dérive différents. La forme compacte sortira en premier, car elle sera moins ralentie par le gaz en comparaison à la forme étendue qui sortira plus tard de la chambre de dérive. De plus, les temps de dérive peuvent être convertis directement ou après un étalonnage approprié selon les instruments en distributions de section efficace de collision (CCS), qui sont des projections bidimensionnelles des formes tridimensionnelles des ions [242], [243].

Il existe différents types de cellule de mobilité ionique pour séparer les ions, dont les plus courantes sont les cellules DTIMS (« *Drift Tube Ion Mobility Spectrometry* ») dans lesquelles un champ électrique linéaire et homogène est appliqué, et les cellules de type TWIMS (« *Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry* ») où des « vagues » de potentiels sont appliquées en continu, la fréquence et la hauteur (volts) de ces dernières permettent la séparation des ions. Le DTIMS permet le calcul direct des CCS tandis que le TWIMS nécessite un étalonnage.

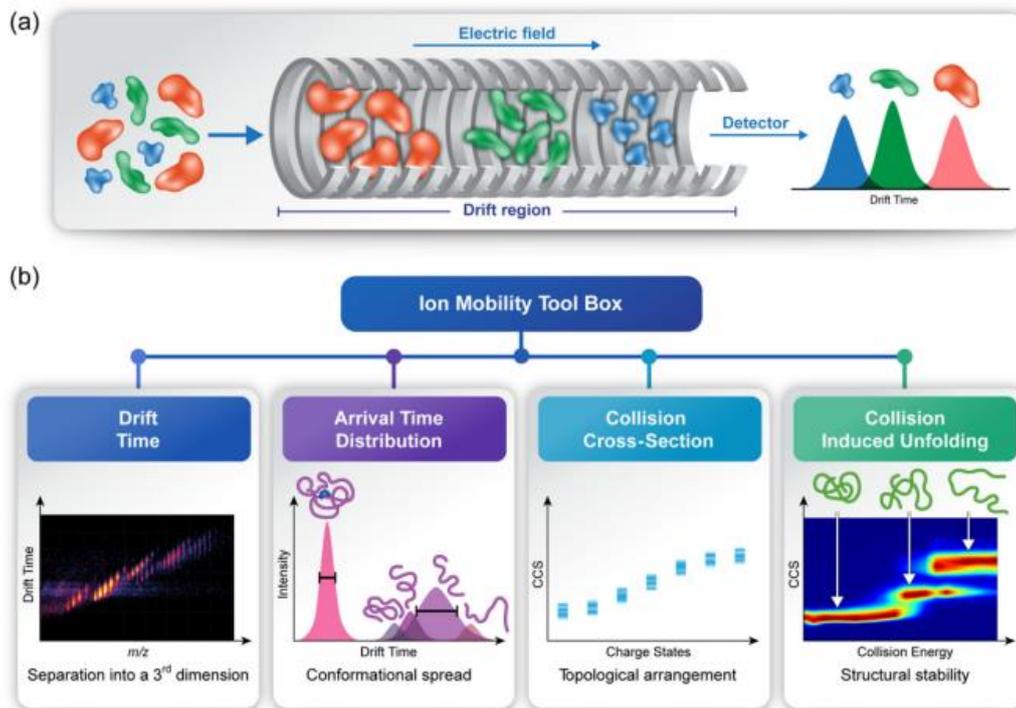


Figure 42 : (a) Représentation schématique du mécanisme de séparation par mobilité ionique. (b) Les différentes données extraites par IM-MS : évaluation et distribution des différents conformères, valeurs des CCS permettant de déduire la stabilité et le repliement des protéines. (Ben-Nissan et al. 2018) [244].

La mobilité ionique est rarement utilisée seule, elle est presque toujours associée à la spectrométrie de masse (IM-MS) pour permettre l'identification des protéines après séparation des conformères.

Il a été rapporté que la combinaison de la MS native et la mobilité ionique permettait de fournir une image plus générale de la structure et du repliement des anticorps. La MS native assure, grâce à un processus d'ionisation particulier, la conservation des oligomères non covalents durant l'analyse MS. Ainsi, la combinaison IM et MS-native permet d'accéder à des informations telles que la section efficace de collision mesurée par IM d'ions ayant des liaisons non covalentes, ce qui n'aurait pas été possible en MS « traditionnelle ». Cependant, cette méthode est considérée comme peu résolutive pour les molécules de conformations proches [245].

Pour pallier ce manque de résolution, une autre méthode a été développée et repose sur le contrôle du repliement/dépliement des ions (Acms ionisés) grâce à un gaz vecteur supplémentaire. L'énergie nécessaire pour initier les transitions de dépliement est induite par collision, cette méthode est appelée (*Collision Induced Unfolding*, CIU) et permet d'évaluer le repliement de l'Acm en phase condensée. Le dépliement induit des modifications importantes des CCS, cependant, il renseigne également sur l'état de repliement initial de la molécule, et sur le domaine de liaison avec le ligand. Cette méthode a permis la distinction sans ambiguïté des différentes sous-classes d'IgG sous leur forme intacte et en sous-unité [246]. Deslignière et al. ont montré le potentiel de

la CIU pour caractériser les hétérogénéités de conformations résultant notamment de la complexité croissante des formats d'Acms innovants [245].

De même, Vallejo et al. ont effectué des études de stabilité en appliquant différents stress à deux IgG1 modèles [21]. Ils ont aussi montré le potentiel de l'IM-MS et des mesures en CIU sur des monomères et les dimères Acms obtenus avec diverses conditions de dégradations forcées (températures 50°C et pH acides). Les deux IgG1 diffèrent uniquement par leurs séquences des CDR (IgG1 α et IgG1 β), et ont pu être comparées. Des modifications structurales et des agrégats variés (obtenus par différents mécanismes) ont été observés pour chacune des IgG1 grâce à la IM. Le stress par changement pH produit des modifications à la fois de CCS et d'empreinte CIU qui diffèrent d'un Acms à l'autre. Les différences de séquence sont donc très probablement la cause des différences de stabilité de ces deux Acms.

Malgré le manque de sensibilité et de résolution de ces méthodes, les travaux s'accordent pour confirmer que des améliorations de la technique et des traitements d'informations permettront de meilleures prédictions de structures.

3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

De nombreuses études de stabilité sur les Acms thérapeutiques ont été publiées. Ces études tendent à montrer une stabilité physico-chimique des traitements à base d'Acms afin de prévenir au mieux l'immunogénicité dans certains contextes (dégradations). La stabilité physico-chimique des Acms est liée à de nombreux facteurs tels que la formulation, l'environnement, les manipulations... Elle doit être étudiée en profondeur à l'aide de plusieurs techniques analytiques complémentaires, chacune apportant des informations spécifiques. Dans cette optique, plusieurs démarches de caractérisation utilisant des méthodes orthogonales et complémentaires ont été mises en place pour répondre au mieux aux exigences qualités définies lors de la détermination des CQA de chaque produit. Selon les variants, des techniques d'analyse plus ou moins sensibles et approfondies ont été développées pour caractériser chacun de ces variants (tailles, charge, conformation). Notamment, les techniques de séparation (par exemple, les méthodes basées sur la chromatographie et l'électrophorèse) sont des outils importants pour la caractérisation des Acms thérapeutiques.

En chromatographie, l'IEX a été largement utilisée pour déterminer les variants de charges, tandis que la SEC est utile pour évaluer les variants de tailles ou l'agrégation. Ces techniques « historiques » sont largement utilisées, mais souffrent d'une résolution encore limitée dans certains cas. Cependant, les solutions se multiplient pour permettre de nouveaux couplages, atteindre des rendements d'analyse plus élevés, des traitements de données simplifiés et adéquates pour des utilisations en routine (développement de phase mobile, simplification de la LC-2D, colonnes ultra-courtes, logiciels et algorithmes de traitement).

Dans une démarche qualité, il est nécessaire de développer des méthodes pouvant être couplées avec une détection aussi puissante que la spectrométrie de masse pour des études approfondies, mais certains contextes ne nécessitent pas autant de précision. À l'hôpital, des méthodes plus accessibles, moins coûteuses, avec un traitement de données simple, et garantissant un contrôle qualité de routine rapide, sont requises. De manière similaire, les approches CE et IEF peuvent être employées pour les mêmes objectifs que la SEC et l'IEX, respectivement, et sont utilisées par l'industrie comme techniques de références ou alternatives. Une fois encore, des développements importants sont en cours pour permettre à ces méthodes d'être couplées à la MS, mais également d'assurer un suivi des CQA efficace selon les contextes de contrôle qualité avec d'autres détecteurs ou logiciels de traitement plus accessibles.

À ces approches classiques pour l'étude des protéines fondées sur la séparation des variants, d'autres techniques axées sur la détection ont aussi été développées de manière complémentaire. Celles-ci regroupent toutes les techniques par microscopie, par diffusion de lumière, par spectroscopie et par imagerie. Chaque méthode comporte ses avantages et inconvénients à considérer. C'est pourquoi une compréhension complète des modifications liées à la dégradation nécessite une combinaison de méthodes de séparation et de détection. Ces approches holistiques demandent une plus grande capacité de traitement, d'interprétation, de prédiction et de gestion de données. Pour répondre à ces besoins, des solutions impliquant des outils chimiométriques se démocratisent pour l'amélioration continue des systèmes qualité.

3 CHAPITRE III : POTENTIEL DE LA CHIMIOMETRIE : PERSPECTIVES POUR LE CONTROLE QUALITE EN CONTEXTE HOSPITALIER

Classiquement, dans le contrôle qualité des thérapies à base d'anticorps monoclonaux, l'étude des signaux issus d'instruments analytiques, était fondée sur la qualité de l'intégration des pics, puis la comparaison visuelle des signaux (chromatogrammes, électrophérogrammes, fractogrammes, spectres...). Cette méthode visuelle et commune de comparaison de signaux est simple, mais très subjective, laborieuse et rarement quantitative. L'augmentation de la sensibilité des instruments analytiques, de la quantité de données générées et l'évolution des pratiques en contrôle qualité contribuent à développer de nouvelles méthodes de traitements de données.

Les autorités émettent l'hypothèse que l'amélioration des contrôles qualité peut être réalisée en partie grâce au développement d'approches statistiques multivariées fondées sur la modélisation, la classification et la prédiction de certains paramètres critiques [247]. Dans ce chapitre, nous décrivons dans quel contexte les analyses multivariées ont été introduites en contrôle qualité. Puis, nous détaillerons, au travers d'applications, deux approches chimiométriques de référence : l'analyse en composantes principales et la régression des moindres carrés partiels.

1. LE ROLE DES ANALYSES MULTIVARIEES DANS LE CONTROLE QUALITE

1.1.1 L'intérêt de l'analyse multivariée pour l'industrie

Dans le contexte du contrôle qualité, les autorités favorisent une approche « *Quality by Design* » (QbD), recommandant aux fabricants de commencer, lors du développement du médicament, par la définition des attributs de qualité à cibler dans une démarche de gestion de risques. Ce principe rassemble l'utilisation de tout type d'outils scientifiques (mathématiques, chimiques, immunologiques) pour générer une compréhension des processus et définir les stratégies de contrôle aux différentes étapes, depuis la conception jusqu'à la délivrance du produit, et à l'administration aux patients [248].

Le QbD est constitué de l'ensemble des démarches permettant d'apporter des informations sur l'identité du médicament, sa quantité, sa pureté et sa stabilité. Ce principe regroupe en particulier toutes les approches qui peuvent permettre des analyses multi-attributs. Un bel exemple d'une approche QbD a été démontré par Carillo et al. (2022) [249], en associant trois méthodes de séparations (CEX-MS, RP-MS et SEC-MS) appliquées aux anticorps monoclonaux intacts pour atteindre des informations sur l'identité, la pureté et l'état de dégradation du médicament (**Figure 43**). Dans ces travaux, trois études de cas ont été détaillées : la première est dédiée à l'identification des échantillons de l'Infliximab analysés à l'aide de la RP-MS sur 13 jours. La deuxième étude se consacre à l'Adalimumab et l'impact du stress thermique sur les

variants de charge grâce à la CEX couplée à la MS ; enfin, la troisième étude de cas tend à identifier de nouvelles entités ou composants manquants en comparaison avec une référence standard du Trastuzumab. Ces analyses ont été réalisées par SEC-MS avant et après dopage de l'échantillon avec différentes quantités de formes déglycosylées.

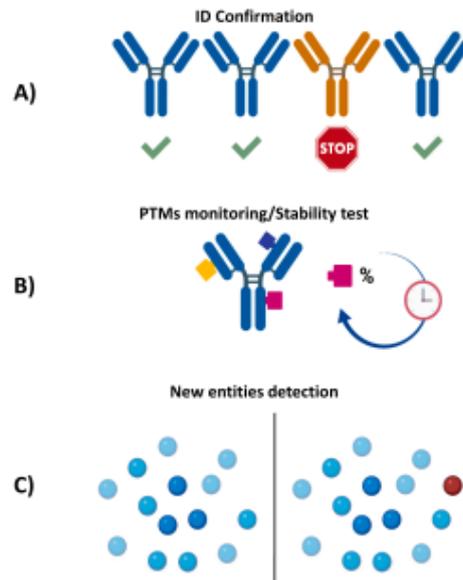


Figure 43 : Démarche de Carillo et al (2022) **(A)** l'identification des protéines par RP-MS **(B)** la surveillance et la quantification des attributs de qualité par CEX-MS **(C)** la détection de nouvelles entités par SEC-MS [249].

Par ailleurs, de plus en plus de méthodes en LC-MS dites « multi-attributs » (*Multi attributs method*, MAM) sont développées [73]. Celles-ci permettent le suivi de plusieurs attributs de qualité simultanément pour une seule analyse MS. Les méthodes MAM sont des outils puissants pour accélérer et améliorer l'analyse des biopharmaceutiques, et témoignent d'un besoin accru en contrôle qualité utilisant des méthodes rapides renseignant sur plusieurs CQAs. L'avantage des MAM est que la plupart des attributs de qualité peuvent être correctement identifiés et quantifiés par une même méthode (une seule préparation d'échantillon, un seul instrument, une seule méthode de traitement de données). Cependant, ces approches multi-attributs nécessitent une bonne gestion et une bonne interprétation des données, ce qui peut rendre la tâche fastidieuse. En effet, la multiplication des attributs à évaluer nécessite une collecte de données démultipliée en comparaison au suivi d'un unique attribut. Les données obtenues doivent ensuite être stockées, transformées, et employées dans divers processus de traitements ou d'interprétations. Ainsi, pour améliorer le contrôle qualité et permettre des interprétations objectives et plus normées sur un grand nombre de données, de plus en plus de méthodes de retraitement des données introduisent des outils statistiques [250]. Néanmoins, actuellement en contrôle qualité, les approches combinant analyses chimiques et statistiques sont davantage implantées dans les phases de conception et production des anticorps en cours de procédés. Elles sont cependant encore rares pour des applications de contrôle sur des produits finis

prêts à l'emploi.

Dans le but d'inciter le développement de méthodes alliant analyses chimiques, traitements de données et statistiques, la FDA a souhaité introduire le concept des technologies d'analyse de processus (*Process Analytical Technology, PAT*). Ce concept tend à encourager l'industrie biopharmaceutique à accroître l'efficacité et le contrôle de la production des produits biopharmaceutiques [251]. L'objectif principal du PAT est de surveiller et contrôler tous les paramètres pouvant avoir un impact sur les CQAs, de préférence en ligne et lors la production. Cela permet d'assurer une qualité de produit constante. Le concept PAT est donc un catalyseur clé de la pratique des approches QbD, en particulier pour la mise en œuvre de plusieurs techniques d'analyses et outils de traitement des données. Ces outils PAT couvrent les méthodologies pouvant provenir aussi bien de la chimie analytique, que de méthodes plus théoriques de modélisations mathématiques ou statistiques [252], [253]. Par conséquent, la chimiométrie et les analyses multivariées sont donc des outils clés du concept PAT et seront détaillés dans la suite de ce chapitre [231], [254], [255].

L'application de la chimiométrie aux biopharmaceutiques a donc déjà été instaurée pour le suivi des CQAs dans le cadre de la production des biopharmaceutiques. Le but étant de garantir la qualité du produit avec des méthodes rapides et peu coûteuses. Dans les travaux de thèses présentés ici, l'objectif est de développer une méthode chimiométrique permettant en une seule analyse ; (i) de confirmer l'identité d'un médicament à base d'anticorps (reconnaissance), (ii) de détecter de formes dégradées d'anticorps sur des médicaments reconstitués avant administration aux patients. De plus, ce développement a été réalisé avec une importante prise en compte de l'environnement hospitalier et de ces contraintes. La libération intra-hospitalière nécessite un contrôle qualité rapide et fiable, par des méthodes analytiques simples et un traitement de données automatisé.

1.1.2 Chimiométrie

La chimiométrie est une discipline de la chimie qui utilise des méthodes statistiques et mathématiques pour obtenir des informations pertinentes sur un système (ici anticorps). La chimiométrie applique des analyses multivariées et des modèles empiriques aux données chimiques et extrait des résultats significatifs à partir de grands ensembles de données. Le rôle de la chimiométrie comprend le suivi, la modélisation, et l'étalonnage de paramètres pour améliorer l'analyse et la qualité des données [252], [256].

Par exemple, l'analyse de spectres bruts (Raman, FT-IR, UV-vis...) s'appuie sur l'observation des différences d'intensités, ou utilise les aires des pics. Ces méthodes analytiques sont dites multivariées, c'est-à-dire, l'analyse et les corrélations de données sont réalisées sur plusieurs longueurs d'onde (ou variables) simultanément (parfois le

spectre en entier), et sur un grand nombre d'individus (nombreux spectres provenant de plusieurs échantillons), ce qui rend l'analyse de plus en plus complexe.

De plus, les anticorps étant considérés comme des molécules de hauts poids moléculaires, la quantité et la complexité des données générées, sont propices à leur utilisation dans le cadre de la chimiométrie. Étonnamment, bien que les méthodes d'analyse utilisées puissent être les mêmes dans le contexte de l'analyse des anticorps et de la métabolomique (en particulier l'utilisation de la MS), l'exploitation des données par des outils chimiométriques est plus courante pour cette dernière [257], [258]. Cependant, cela reste des applications relativement récentes qui s'étendent également à d'autres domaines [259].

1.1.3 L'analyse de données multivariées

L'analyse de données multivariées (*Multivariate Data Analysis*, MVA) utilise des méthodes statistiques pour analyser des ensembles de données composés de plusieurs variables ou de plusieurs types de variables. Avec ces méthodes, les variables sont analysées simultanément pour effectuer des études exploratoires, des régressions ou des classifications de données [260].

Grâce au développement de techniques analytiques de plus en plus perfectionnées, les acquisitions de données se multiplient, et par conséquent, l'élaboration de méthodes d'analyses et d'interprétations pour de telles quantités de données est devenue un enjeu important et non négligeable garantissant la qualité des produits pharmaceutiques [247].

En effet, les approches multivariées sont nécessaires pour une analyse plus complète et fiable des données multidimensionnelles issues des différentes techniques analytiques. Les MVA sont donc largement reconnues comme essentielles pour implémenter les concepts PAT et QbD. La **Figure 44** témoigne du rôle des MVA dans les procédés de production, permettant ainsi d'établir un lien entre les CQAs observés

et les paramètres évalués pendant le procédé.

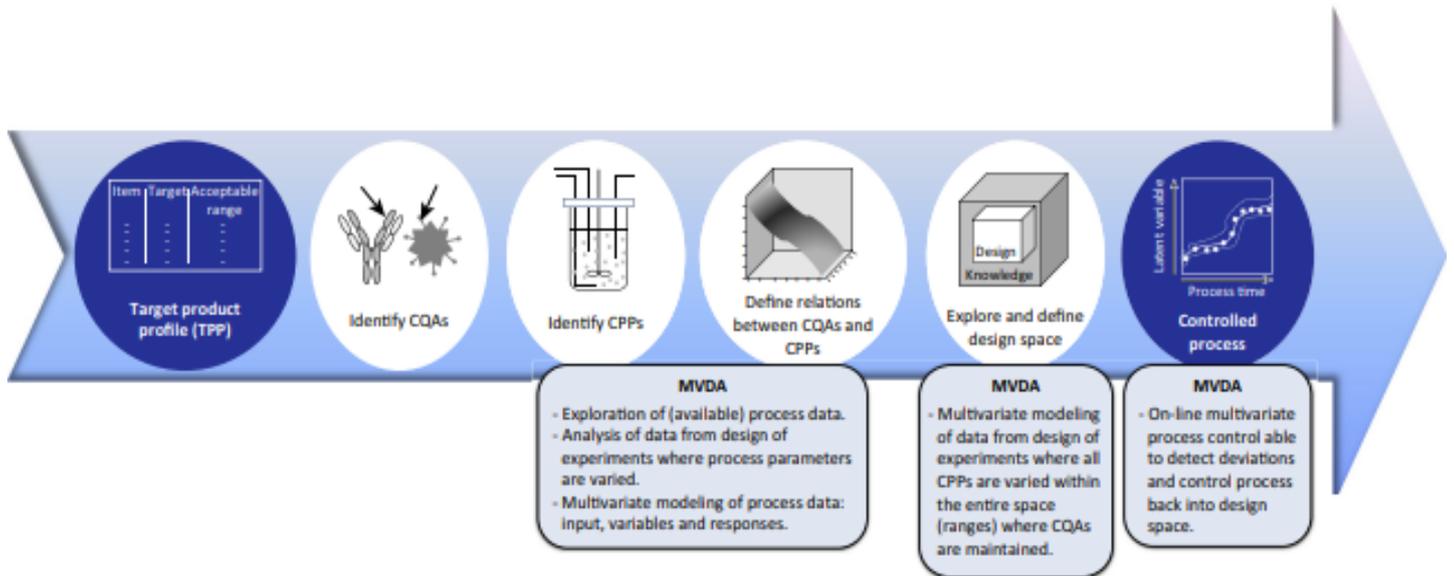


Figure 44 : Représentation schématique du rôle des approches multivariées dans la mise en œuvre de QbD et PAT dans le développement de bioprocédés. Les paramètres critiques du processus (*Critical process parameter*, CPP) sont des paramètres intervenant dans le processus et dont la variabilité a un impact sur un attribut de qualité critique et devrait donc être surveillé ou contrôlé pour s'assurer que le processus produit la qualité souhaitée [247].

L'objectif des MVA dans l'industrie est de maximiser l'exploitation des données obtenues au cours du processus afin d'approfondir la compréhension de ces derniers. L'intérêt de l'industrie pharmaceutique pour les techniques MVA a largement augmenté après le lancement des directives PAT et QbD, où la MVA est explicitement recommandée par les régulateurs [253], [261], [262], [263], [264].

Parmi le panel d'outils MVA, l'Analyse en Composantes Principales (*Principal Component Analysis*, PCA) et la régression des moindres carrés partiels (*Partial Least Square*, PLS) font partie des méthodes les plus communément utilisées et sont souvent appliquées pour visualiser des tendances [265], [266]. Les deux méthodes, expliquées dans la suite du chapitre sont des méthodes de projection qui réduisent l'ensemble initial des données en un nombre inférieur de variables non corrélées. Elles permettent d'expliquer la majeure partie de la variance (ou différence) contenues dans les données initiales.

La PCA est une méthode non supervisée qui vise à identifier paramètres d'influence et les tendances dans un ensemble de données. À l'inverse, la PLS est une méthode supervisée qui analyse la covariance (c'est-à-dire la corrélation) entre des variables à expliquer issues de la technique analytique, et des variables cibles définies en amont (profil de référence par exemple). Ces deux méthodes sont encore aujourd'hui des références et fréquemment appliquées en première intention comme MVA. Elles ont l'avantage majeur d'extraire de manière objective les informations les plus pertinentes à partir des données (ici électrophorétiques) des échantillons. C'est pourquoi, dans nos

travaux, nous avons choisi d'explorer le potentiel de l'icIEF combinée à ces deux méthodes de référence pour le contrôle qualité des anticorps [247].

1.1.3.1 Méthodes non supervisées : l'Analyse en Composantes Principales

a) Principes de la PCA

La PCA est une méthode d'analyse multivariée non supervisée permettant d'observer des tendances dans un ensemble de données. Le caractère « non supervisé » signifie que cette méthode mathématique met en valeur les différences dans l'ensemble de données sans corrélation avec les éventuels facteurs de réponses associés. Par exemple, dans le cas des analyses spectrales, seuls les spectres des analytes sont considérés, indépendamment les uns des autres, sans tenir compte, entre autres, des concentrations des analytes, ou d'autres paramètres de chaque échantillon [267].

Ainsi, les échantillons sont considérés comme des individus et un individu peut avoir un ou plusieurs spectres associés, appelés en chimométrie, observations. Les longueurs d'onde des spectres correspondent, dans ce type d'analyse, aux variables.

- Définition des Composantes Principales

Les données issues des analyses sont présentées sous forme de matrices dont les lignes sont des observations (e.g. signaux, spectres, électrophérogrammes...) et les colonnes sont des variables (e.g. les longueurs d'ondes, le temps, les pl...). La matrice des données \mathbf{X} est constituée de n observations décrites par p variables (notée X_i , $1 \leq i \leq p$), (voir **Figure 45**).

La PCA réduit le nombre de variables explicatives p de la matrice \mathbf{X} ($n \times p$), à un sous-ensemble de N variables appelées composantes principales (*Principal Component*, PC) tel que $N < p$. Ces nouvelles variables tendent à mieux décrire l'ensemble des données en maximisant les différences entre les individus [268]. Durant ce processus, la PCA extrait certaines caractéristiques décrivant les individus en identifiant les variables les plus significatives. Ensuite, de nouvelles variables descriptives, appelées les composantes principales, sont créées pour expliquer ces caractéristiques tout en supprimant les caractéristiques les moins importantes. Plus formellement, les PCs sont des combinaisons linéaires des variables initiales qui garantissent la variabilité maximale entre les individus (mise en valeur des différences). Par ailleurs, chacune de ces PCs sont indépendantes, c'est-à-dire orthogonales, les unes par rapport aux autres.

- Calcul des composantes

Mathématiquement, la PCA calcule la covariance entre les variables X_i , c'est-à-dire, les associations linéaires entre deux variables sont mesurées, puis, regroupées dans une matrice appelée matrice des covariances (notée Σ). Cette étape est décrite ci-dessous dans la **Figure 45**.

Stockage des données

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} \bar{x}_1 & \bar{x}_2 & \dots & \bar{x}_p \\ x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2p} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{np} \end{pmatrix}$$

Calculs des covariances entre deux variables (\bar{x}_j et \bar{x}_k)

$$COV_{jk} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ik} - \bar{x}_k)$$

\bar{x}_j et \bar{x}_k les moyennes de \bar{x}_j et \bar{x}_k

Matrice des covariances

$$\Sigma = \begin{pmatrix} s_1^2 & COV_{12} & \dots & COV_{1p} \\ COV_{21} & s_2^2 & \dots & COV_{2p} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ COV_{p1} & COV_{p2} & \dots & s_p^2 \end{pmatrix}$$

x_{ij} : valeur de la i -ème observation pour la j -ème variable.

Relation linéaire entre deux variables (« corrélation »)

La diagonale étant les écarts types au carré des variables

Figure 45 : À partir d'une matrice \mathbf{X} de donnée (par exemple, en spectroscopie, il s'agit des spectres après prétraitements), la matrice des covariances Σ est calculée pour déterminer les relations entre les variables et de déterminer les PCs [269].

À partir de la matrice Σ , les composantes sont obtenues grâce à des éléments de l'algèbre linéaire, tels que les valeurs propres et les vecteurs propres. Les composantes principales sont donc des vecteurs propres de la matrice de covariance, tandis que les valeurs propres correspondent aux scores des composantes associées. Seules certaines composantes sont retenues, celles avec le score le plus élevé, leur nombre est limité à N ($N < p$), il s'agit donc des composantes principales. Une nouvelle matrice est construite avec les N composantes principales sélectionnées et ordonnées selon leurs scores.

- Résultats des PCA : Représentation graphique des individus sur les PC

Les résultats de l'opération de réduction de la matrice \mathbf{X} de dimension ($n \times p$) en une matrice de dimension ($n \times N$) sont rapportés graphiquement via des projections des individus sur des plans, dont les axes sont les PC, pour lesquels les variabilités entre les individus sont les mieux représentées.

Les individus sont projetés dans les plans définis par deux PCs. Cela permet de visualiser les tendances, et la présence ou non de nuages de points représentatifs des échantillons. Ainsi, il est possible de déterminer certaines tendances qui n'auraient pas pu être mises en valeur avec une simple évaluation ou superposition des signaux. Le **Figure 46** schématise le principe de la PCA depuis la recherche des composantes principales jusqu'à leurs représentations permettant de visualiser les groupes d'individus.

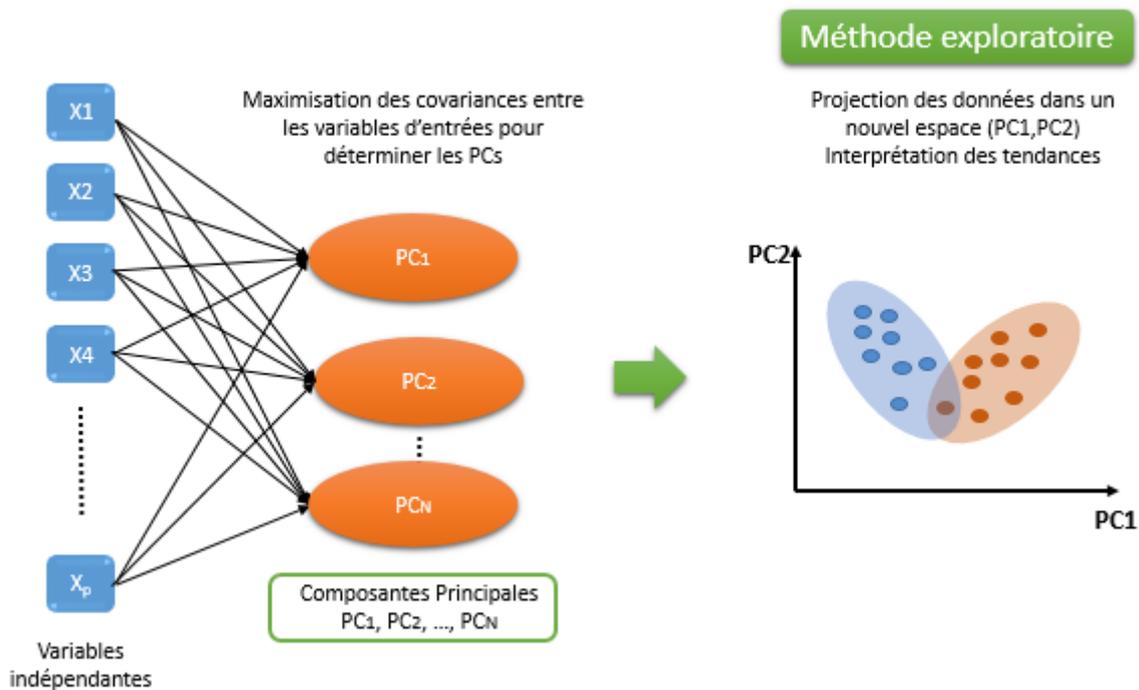


Figure 46 : Schéma représentant le principe de la PCA. Les covariances entre les variables sont maximisées pour en déduire les composantes (PC) permettant d'observer le jeu de données d'un nouveau point de vue où les différences entre individus sont mises en valeur.

La PCA peut donc être considérée comme une méthode de projection qui permet de projeter les données depuis l'espace les décrivant avec p variables vers un espace réduit en N composantes, tout en conservant un maximum d'information par rapport à la matrice \mathbf{X} de départ. L'information expliquée par la représentation graphique est mesurée au travers des scores qui quantifient l'importance des composantes principales dans la description des individus, soit la variance expliquée par la composante. Si le score total associé aux 2 ou 3 premiers axes (PC_1, PC_2, PC_3, \dots) représente un pourcentage suffisant de la variabilité totale de l'ensemble de données, les observations pourront être représentées en seulement 2 ou 3 dimensions, facilitant ainsi grandement l'interprétation. L'enjeu est donc de déterminer le nombre minimal de composantes nécessaires pour une interprétation représentative de la variabilité des données de départ. Le nombre de composantes est établi en fonction du pourcentage total obtenu par la somme des scores de chaque composante. Toutes les composantes sont classées par ordre décroissant en terme score (score $PC_1 >$ score $PC_2 >$... $>$ score PC_N). Ainsi, les caractéristiques d'un individu sont décrites par des variables plus pertinentes et en nombre réduit.

- Interprétations des résultats

En supposant que la première composante principale (PC_1) ne représente pas 100 % de la variabilité dans l'ensemble de données, la seconde composante principale (PC_2), orthogonale à PC_1 , peut être déterminée. Cette seconde composante est aussi une combinaison linéaire de variables qui maximisent la variabilité (avec le pourcentage de variations le plus élevé) parmi toutes les autres combinaisons linéaires orthogonales à

la première (PC1). La représentation des données dans le plan (PC1, PC2) est donc celle expliquant au mieux la variabilité des données.

Le principe de la PCA peut ainsi être résumé comme une méthode permettant de trouver un axe (PC1), issu d'une combinaison linéaire des variables initiales, telle que la variance des individus le long de cet axe soit maximale. Ce processus est réitéré dans des directions orthogonales à PC1 pour déterminer les composantes principales suivantes (PC2, PC3, PC4...). Cette opération permet de représenter les individus dans un plan en 2D par l'association de deux axes, expliquant une certaine variabilité et décrivant éventuellement une tendance. Le plan (PC1, PC2) permettra d'expliquer la plus grande variabilité possible.

b) Applications en PCA

La PCA est largement utilisée en chimométrie comme méthode exploratoire, notamment avec toutes les méthodes spectrales (UV [270], Infrarouge [271], Raman [272], [233], dichroïsme circulaire [273]). En effet, ces données ont la particularité d'être en quantité importante, très redondantes, et avec une forte corrélation entre les variables explicatives.

Dans le cadre de la spectroscopie, lorsque la PCA est appliquée aux données spectrales, les coordonnées des points dans le plan (PC1, PC2) résultent des bandes spectrales ayant conduit à la plus grande variance sur chacune des deux composantes. Cela permet l'identification de bandes spécifiques qui diffèrent d'un groupe d'individus à l'autre, et permettent de former ces groupes visuellement sur le plan (PC1, PC2). Par exemple, Mc Avaens et al. (2019) ont montré la capacité du dichroïsme circulaire, à corréler des dégradations (PTM) avec des bandes spectrales d'échantillons d'IgG4 stressés grâce à la PCA [231]. Ceci a, en particulier, permis de discriminer les échantillons d'IgG4 selon l'origine des stress ayant conduit à ces dégradations. La **Figure 47** montre que les échantillons soumis aux conditions de pH acide, à la lumière et les conditions d'oxydation ont conduit à la formation de groupes d'individus distincts. S'agissant de données issues du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain, ceci démontre que des modifications structurales caractéristiques ont été induites sur les IgG4, pour chacune de ces conditions de stress. Les données ont ici été prétraitées par une étape de correction de lignes de bases, un lissage (gaussien), et une normalisation selon la méthode « *Standard Normal Variate* » (SNV).

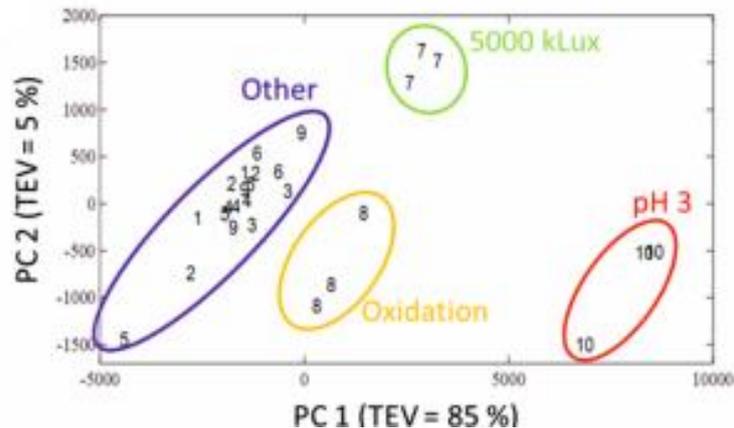


Figure 47 : PCA à partir de données obtenues par dichroïsme circulaire (UV lointain) d'IgG4 ayant subi différentes conditions de stress : pH acide (pH3), oxydation, lumière (5000 kLux), et les différents contrôles ou conditions n'affectant pas la structure (other). (Bethan et al. 2019) [231].

La PCA peut donc être appliquée dans de nombreux contextes comme méthode exploratoire pour mettre en valeur des différences entre les individus et observer des données plus objectivement.

1.1.3.2 Méthodes supervisées : analyse des moindres carrés partiels (PLS) pour l'analyse discriminante (PLS-DA)

a) Principe de l'analyse des moindres carrés partiels (PLS) pour l'analyse discriminante (PLS-DA)

- Principe général

L'analyse discriminante des moindres carrés partiels (*Partial Least Square-Discriminante Analysis*, PLS-DA) est une approche supervisée qui contient à la fois l'analyse des moindres carrés partiels (*Partial Least Square*, PLS) pour la réduction des dimensions de la matrice de données et l'analyse discriminante (DA) pour la classification de ces données. La première étape est donc la PLS.

L'analyse des moindres carrés partiels est une méthode chimiométrique supervisée de régression linéaire, à partir de laquelle un modèle prédictif peut être généré (Wolds et al., 2001)[274].

Dans le cas d'une analyse supervisée, la matrice de données \mathbf{X} (e.g. des spectres) constituée de p variables explicatives X_i (e.g. les longueurs d'onde des spectres) est utilisée au cours des étapes de la PLS en tenant compte de k variables cibles (e.g. profils types), notées Y_j avec $j \in [1 ; k]$ et regroupées dans la matrice cible \mathbf{Y} . L'objectif de la PLS (recherche de composantes, régression) est donc de modéliser la relation de dépendance entre des variables cibles Y_j et un grand nombre de variables explicatives X_i . La PLS est particulièrement appliquée lorsque les variables X_i sont très nombreuses

et fortement corrélées. Ainsi, un tel modèle peut attribuer à un individu des caractéristiques des variables cibles Y_j directement à partir de mesures issues d'analyses chimiques répertoriées dans la matrice \mathbf{X} .

En effet, après modélisation, l'étape suivante est la prédiction. Grâce au modèle obtenu, la prédiction permet d'attribuer à un individu inconnu, à partir de ces variables explicatives X_i , une variable cible Y_j . Dans les diverses applications, lorsque le modèle est construit, c'est la prédiction qui est exploitée.

- Modélisation : recherche des variables latentes

La PLS maximise la variance des variables X_i en tenant compte des corrélations entre les variables X_i et les cibles Y_j . Cet algorithme emprunte la démarche en même temps à l'analyse en composantes principales (PCA) et à la régression. Comme la régression sur composantes principales, le principe est de chercher les composantes pour construire un modèle. Ainsi, un nouvel ensemble de composantes orthogonales est construit à partir des combinaisons linéaires maximisant les covariances des p variables X_i . Dans le cas de la PLS, les composantes sont appelées variables latentes (*Latente Variables*, LV), et leur particularité est qu'elles sont optimisées pour que celles-ci soient également le plus liées possibles aux variables cibles Y_j . Une fois extraites, les LV peuvent être utilisées dans des représentations graphiques, comme les PC en PCA. Ces projections cherchent à expliquer la corrélation maximale entre les variables d'entrées X_i et de sortie Y_j , et en simplifiant au maximum les liens entre \mathbf{X} et \mathbf{Y} par une régression linéaire.

La **Figure 48** illustre le principe de la PLS-DA pour n observations, en partant d'un nombre p de variables explicatives X_i et k variables cibles Y_j , décrivant donc les individus en classes (k classes).

La modélisation consiste à chercher les LV décrivant au mieux les variabilités des X_i en assurant la meilleure corrélation des cibles Y_j . Le nombre de LV est réduit de telle sorte que $p > N$ (avec N le nombre de variables latentes), il s'agit de l'étape de régression.

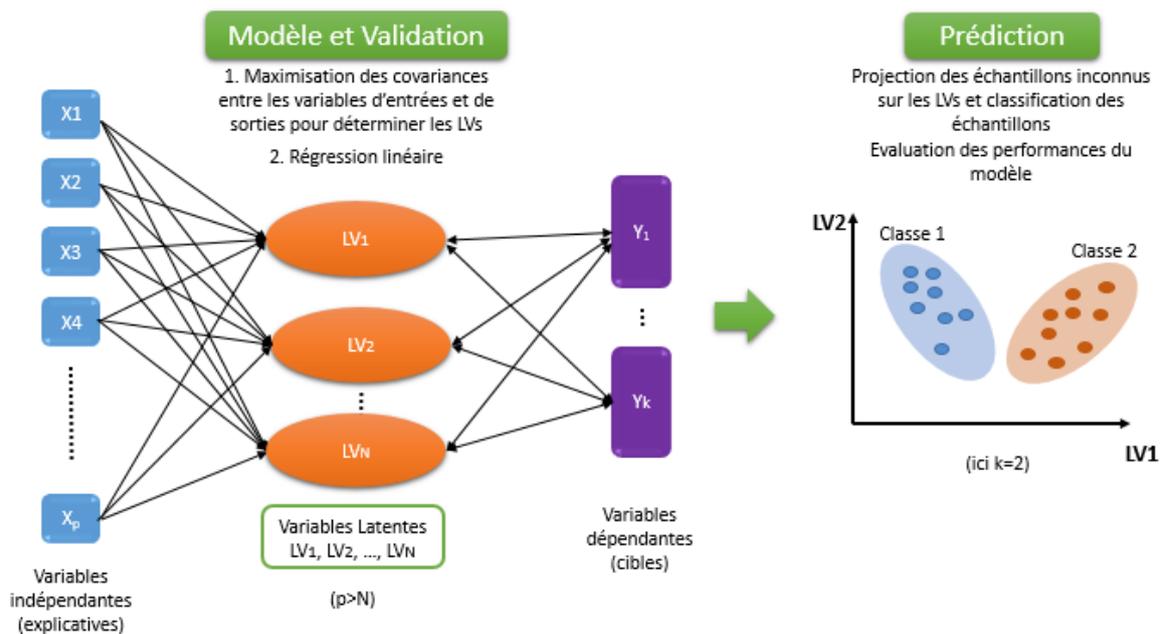


Figure 48 : Schéma représentant le principe de la PLS-DA. Les covariances des entrées X et des sorties Y sont maximisées pour définir les variables latentes (LV) lors de la modélisation. La prédiction utilise les LVs construites pour classer (dans les classes Y_j) de nouveaux individus inconnus.

- Détermination du nombre de variables latentes

Le nombre de LV à extraire à partir des données est inconnu, et le déterminer constitue un des objectifs de la PLS. La procédure communément appliquée pour déterminer le nombre de LV repose sur l'évaluation de critères de qualité du modèle. Ces derniers peuvent entre autres être obtenus par validation croisée de Word [275], nous nous focaliserons dans nos travaux uniquement sur cette méthode.

b) Validation croisée : validation du modèle

La validation croisée subdivise en z sous-groupes un ensemble de données, appelé « set d'entraînement » (données utilisées pour la construction du modèle). Lors de la validation, le modèle est construit sur $(z-1)$ sous-groupes et est testé en le confrontant au dernier sous-groupe exclu. Cette opération est répétée avec chaque sous-groupe (donc z fois). La validation croisée est schématisée dans le **Chapitre IV**.

Un indice significatif obtenu après une validation croisée est la somme des carrés de l'erreur résiduelle prédite (*Predicted Residual Error Sum of Squares*, PRESS). Ce critère est utilisé pour déterminer les erreurs de prédiction du modèle. Le PRESS diminue tant que le modèle est en cours d'amélioration et augmente lorsque le modèle commence à être sur-ajusté. Le choix du nombre de LV est optimal lorsque le PRESS est minimisé

(l'erreur devant être la plus petite possible). Le PRESS n'est pas calculé à partir du set d'entraînement, mais du set de prédiction. Il est calculé comme la somme des carrés des résidus de prédiction pour ces observations. Le PRESS peut être défini de la manière suivante :

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i,-i})^2 \quad (11)$$

Avec y_i la valeur observée pour la variable dépendante pour l'observation i , et $\hat{y}_{i,-i}$ est la prédiction pour l'observation i quand cette dernière n'est pas utilisée pour estimer les paramètres. Il s'agit donc de l'écart entre la valeur obtenue et la valeur prédite par le modèle pour l'observation i (initialement inconnue par le modèle).

Le modèle est optimal lorsque la valeur la plus basse de PRESS est obtenue. Les modèles sur-paramétrés (sur-ajustés) auraient tendance à donner de petits résidus pour les observations incluses dans l'ajustement du modèle, mais de grands résidus pour les observations exclues. Concrètement, le choix du nombre de variables latentes est obtenu en effectuant un compromis entre matrice de confusion (matrice permettant de savoir le nombre d'attributions correctes par le modèle en cours de validation) et la valeur de PRESS la plus basse au cours du processus de la validation croisée.

c) Résumé

Brièvement, l'élaboration du modèle (PLS) revient, tout d'abord, en une première étape, à déterminer les LVs pour répondre à trois objectifs à la fois ; (i) établir la meilleure explication des variables X (maximiser les covariances des X), (ii) établir la meilleure relation entre les variables X et Y, (iii) établir la meilleure explication des variables Y (combinaison linéaire avec les LV). Cette étape est complétée, par une validation du modèle permettant de définir le nombre de variables latentes N nécessaires pour que le modèle soit fiable. Il s'agit dans cette étude d'une validation croisée, celle-ci permettant d'aboutir au PRESS pour conclure sur le nombre de variables, et donc d'obtenir le modèle optimal.

Enfin, la dernière étape de la PLS-DA correspond à l'analyse discriminante, il s'agit de la prédiction, rendue possible grâce au modèle initialement construit et validé en PLS. Dans cette étape, un ensemble de données « inconnues » est analysé pour que, à chaque individu, les valeurs des variables Y inconnues soient déterminées.

d) Analyses discriminantes et Prédiction

- Analyse discriminante

Un des types de PLS très utilisé est l'analyse discriminante des moindres carrés partiels (*Partial Least Square discriminant analysis*, PLS-DA), une alternative à utiliser lorsque

les variables cibles sont des catégories appelées « classes », et non des valeurs numériques. La PLS-DA est un outil bien établi qui est particulièrement utile lorsque le nombre de variables explicatives X l'emporte sur le nombre de cibles Y ($p > k$). Le processus de la PLS-DA permet la construction d'un espace optimisé de dimension réduite constitué des LV, et où les points des données projetés sont séparés distinctement dans les différentes classes [276]. La PLS-DA maximise la variance inter-classe au détriment de la variance intra-classe. Les attributions des individus à des classes reposent sur la comparaison entre les valeurs des réponses prédites par le modèle, en tenant compte d'une valeur seuil prédéterminée (Carvelo et al., Talanta 2021) [277], [278], [279]. Cette valeur seuil permet d'exclure les individus non pris en compte pour la construction du modèle.

- Calcul de la valeur seuil

L'analyse discriminante permet la classification des individus grâce à l'utilisation de fonctions de classement. Les fonctions de classement permettent d'obtenir un score à partir des variables explicatives X de l'individu pour prédire l'appartenance de celui-ci à une certaine classe (variable Y). Lorsque ce score est élevé, la probabilité à l'échantillon d'appartenir à la classe correspondante est élevée. Par conséquent, l'individu est attribué à la classe pour laquelle son score est le plus élevé.

Néanmoins, pour valider l'attribution, un seuil peut être défini. Si le score calculé par la fonction de classement est supérieur au seuil, alors l'individu est affecté à cette classe, sinon il ne l'est pas. Le seuil est sélectionné pour que les nombres de faux positifs et de faux négatifs soient minimisés. Si les scores sont supérieurs au seuil pour plusieurs classes, ou inférieurs au seuil pour toutes les classes, l'individu n'est pas reconnu et peut être défini comme « non attribué ».

Les résultats des attributions pour le set de données sont représentés sous forme de matrice appelée matrice de confusion. La matrice de confusion pour le set de donnée à estimer permet de visualiser le pourcentage d'individus bien classés.

Dans cette thèse, la PLS-DA sera utilisée pour tester la capacité de l'icIEF à identifier différents anticorps à partir de leurs électrophérogrammes. Des modèles dans lesquels, les variables X_i sont les intensités des électrophérogrammes de différents échantillons d'Acms, et les classes Y_j correspondent aux anticorps. L'étape de définition du seuil est détaillée dans le **Chapitre IV**.

1.1.3.3 Prétraitement des données

Issus des différentes techniques analytiques, les signaux bruts obtenus peuvent être très rarement utilisés sans transformation pour de l'analyse multivariée. Des étapes de prétraitements sont nécessaires pour préparer les signaux afin de mettre en valeur les variables souhaitées. En effet, le prétraitement est nécessaire pour minimiser la

variation des données résultant de sources autres que les échantillons (individus) eux-mêmes. En chimie analytique, les sources communes de variance peuvent être liées, en particulier, aux différences dans le volume d'échantillon injecté, à la capacité des instruments à répondre précisément aux consignes, et à la réponse du détecteur. L'utilisation appropriée de procédures de prétraitement garantit que la variance identifiée, par la méthode statistique, reflète les véritables différences intrinsèques (chimiques ou physiques) entre les échantillons. Différentes procédures de prétraitement adaptées aux instruments et aux échantillons sont donc déjà décrites étape après étape pour garantir l'élimination des erreurs liées aux procédures analytiques. La **Figure 49** est un exemple de démarche de prétraitement classique, décrite par l'équipe de Pezzatti et al. (2020) pour le prétraitement de signaux obtenus par HPLC-HRMS. Cette publication est notamment un guide pratique pour préparer les signaux LC-MS à la construction de modèles multivariés dans le cadre de l'étude des métabolites [280].

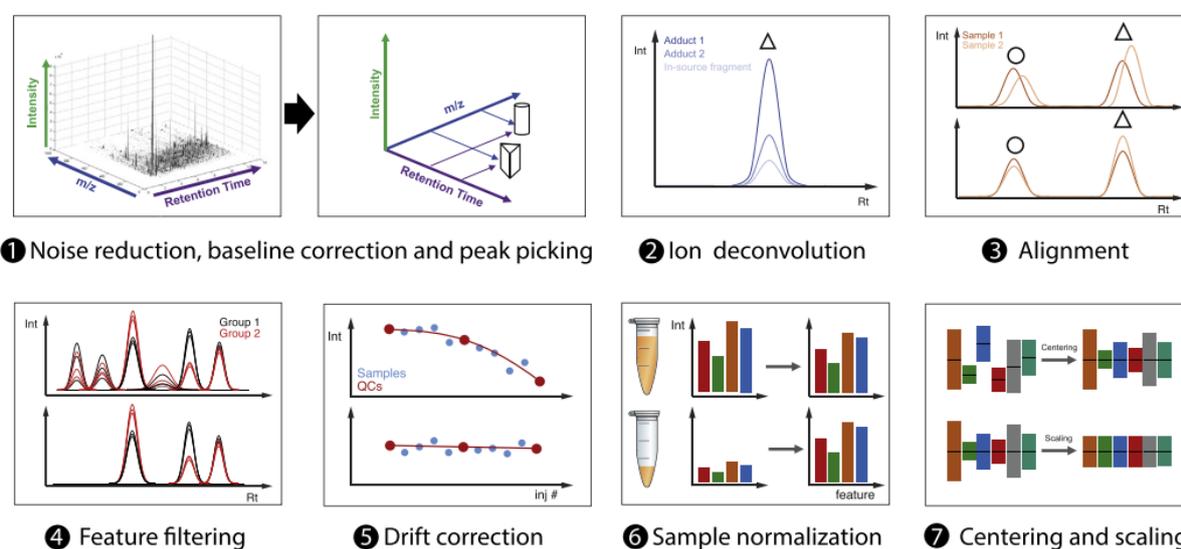


Figure 49 : Étapes de la procédure de prétraitement des signaux obtenus par LC-HRMS. Julian Pezzatti et al. (2020) [280]

Par exemple, pour les données chromatographiques, les méthodes de corrections de fond réduisent les fluctuations ne provenant pas de l'échantillon, les algorithmes de lissage minimisent le bruit aléatoire dans le signal et corrigent la ligne de base, les algorithmes d'alignement des temps de rétention éliminent les dérives dues aux différences de débit de la phase mobile. Les procédures de standardisation corrigent les différences de volumes d'échantillon injectés et les réponses de l'instrument [281].

Cependant, il est important de veiller à ce qu'un minimum d'informations chimiques soit perdu à cause de l'utilisation excessive de ces procédures de « nettoyage » des signaux. Le choix de la méthode de prétraitement peut exercer une influence importante sur les résultats, il faut donc considérer les caractéristiques du jeu de données et l'objectif de l'analyse. Ces procédures de prétraitement sont habituellement appliquées pour augmenter au mieux la justesse de prédiction des modèles

développés. La **Figure 50** montre les étapes standards de prétraitement depuis les étapes expérimentales jusqu'à l'obtention des résultats et leurs interprétations. L'analyse en composantes principales (PCA) est une des approches permettant d'apprécier l'effet du prétraitement des données à étudier [282].

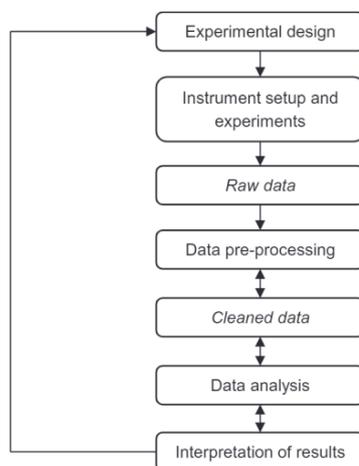


Figure 50 : Schéma décrivant les étapes depuis la conception des expériences jusqu'à l'interprétation des données (Engel et al., 2013) [282].

Les procédures de prétraitements classiques regroupent donc plusieurs étapes classiques comme ; (i) l'atténuation du bruit par lissage, (ii) le réalignement des signaux, (iii) la standardisation des données.

a) Le lissage

Les signaux obtenus par les différentes méthodes analytiques souffrent souvent de bruit de fond. Afin de diminuer celui-ci, les signaux sont « corrigés » à l'aide de différentes méthodes de lissage. L'effet négatif de ce type de lissage est l'élargissement du pic, ainsi qu'une légère perte d'information.

Une des méthodes de lissage les plus fréquemment utilisée est l'algorithme de Savitzky Golay [281]. Cette méthode utilise un polynôme d'un certain degré d considéré comme le plus adapté pour modéliser le signal. Ce polynôme est obtenu grâce à une régression effectuée afin de minimiser l'erreur entre la valeur issue du signal et la valeur lissée. Dans notre étude, les électrophérogrammes étaient déjà lissés par le logiciel *Compass* (Biotechne®) selon une méthode non décrite, un lissage supplémentaire de Savitzky Golay a été testé, mais n'a pas apporté de gain supplémentaire en PCA, cette étape n'a donc pas été conservée dans le cas des analyses par icIEF issues de l'instrument de Biotechne®. Cependant, pour les analyses réalisées en dichroïsme circulaire, cette étape a été essentielle afin de réduire le bruit de fond.

b) Réalignement des signaux

Des fluctuations dans la préparation d'échantillons, dans les conditions d'analyses ou

d'autres facteurs environnementaux peuvent influencer les mesures et provoquer des décalages des signaux. Cependant, lorsque des procédures de statistiques sont appliquées, ces petites différences peuvent être identifiées comme sources de variations et, par conséquent, il est important de minimiser ou de les éliminer. La solution la plus évidente consiste à réaligner les signaux. Il existe plusieurs algorithmes fondés sur différents principes permettant cette correction (par exemple, Correlation Optimal Warping ou icoshift) [282].

Dans notre étude, un algorithme maison a permis d'aligner les signaux des différents anticorps obtenus par icIEF sur le pic principal. Cette étape a permis d'augmenter la robustesse de la méthode.

c) La standardisation

Différentes méthodes de standardisation mettent l'accent sur différents aspects des données et chacune de ces méthodes de prétraitement a ses propres avantages et inconvénients. Le choix d'une méthode de prétraitement dépend de la problématique à laquelle il faut répondre, des propriétés de l'ensemble de données, des techniques d'analyses et des paramètres associés, mais également des stratégies chimiométriques choisies. Par exemple, dans le cas de la PCA, dont le but est d'expliquer autant de variations que possible avec le moins de composantes possibles, la transformation des données peut améliorer les résultats de la discrimination ou au contraire masquer certaines différences entre les signaux selon la méthode standardisation utilisée et les variations mises en valeur par celle-ci [283].

Il est donc nécessaire de connaître le jeu de données utilisé, les paramètres influençant la technique d'analyse chimique, ainsi que la méthode de prétraitement. Il existe plusieurs types de prétraitement que l'on peut associer à la standardisation dont le centrage et la standardisation (ou mise à l'échelle). Le centrage convertit toutes les fluctuations autour de zéro plutôt qu'autour d'une moyenne. Cette étape est décrite par Geladi et Kowalski (1986) comme l'utilisation de la valeur moyenne de chaque variable (calculée à partir du jeu d'étalonnage), en la soustrayant à chaque variable correspondante [284]. Toutes les variables, dépendantes et indépendantes, sont ensuite supposées être centrées sur la moyenne. Cette étape tend à ne laisser que la variation pertinente (c'est-à-dire la variation entre les échantillons) pour analyse. Les méthodes de standardisation (mise à l'échelle) sont des approches de prétraitement des données qui divisent chaque variable par un facteur, le facteur d'échelle. Ce facteur est différent pour chaque variable. Il existe deux sous-classes dans la mise à l'échelle. La première classe utilise une mesure de la dispersion des données (telle que l'écart type) comme facteur d'échelle, tandis que la seconde classe utilise une mesure de taille (par exemple, la moyenne). Les différentes méthodes de standardisation et le centrage, ainsi que leurs objectifs, sont résumés dans le **Tableau 4** ci-dessous présenté par Van der Berg et al. dans le cas de l'analyse des métabolomiques.

Tableau 4 : Aperçu des méthodes de prétraitement (centrage, standardisation). Dans la colonne Unité, l'unité des données après les données, le prétraitement est indiqué. O représente l'unité d'origine et (-) présente des données sans dimension (Van der Berg et al. 2006) [31].

Class	Method	Formula	Unit	Goal	Advantages	Disadvantages
I	Centering	$\tilde{x}_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_i$	O	Focus on the differences and not the similarities in the data	Remove the offset from the data	When data is heteroscedastic, the effect of this pretreatment method is not always sufficient
II	Autoscaling	$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{s_i}$	(-)	Compare metabolites based on correlations	All metabolites become equally important	Inflation of the measurement errors
	Range scaling	$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{(x_{i_{\max}} - x_{i_{\min}})}$	(-)	Compare metabolites relative to the biological response range	All metabolites become equally important. Scaling is related to biology	Inflation of the measurement errors and sensitive to outliers
	Pareto scaling	$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{\sqrt{s_i}}$	O	Reduce the relative importance of large values, but keep data structure partially intact	Stays closer to the original measurement than autoscaling	Sensitive to large fold changes
	Vast scaling	$\tilde{x}_{ij} = \frac{(x_{ij} - \bar{x}_i)}{s_i} \cdot \frac{\bar{x}_i}{s_i}$	(-)	Focus on the metabolites that show small fluctuations	Aims for robustness, can use prior group knowledge	Not suited for large induced variation without group structure
	Level scaling	$\tilde{x}_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_i}{\bar{x}_i}$	(-)	Focus on relative response	Suited for identification of e.g. biomarkers	Inflation of the measurement errors

Dans le cadre de cette thèse, une brève comparaison entre la standardisation de Pareto et la standardisation de VAST (*VARIABLE STABILITY SCALING*, VAST) a été effectuée sur les données issues des électrophérogrammes. Dans le cas de la standardisation de Pareto, les grandes variations sont plus diminuées que les petites variations, ainsi, ces variations sont moins dominantes que les données initiales. La standardisation de VAST se concentre sur la stabilité des variables. Grâce à l'écart-type et le coefficient de variation (CV) comme facteurs d'échelle (Tableau 4). Le CV est défini comme le rapport de l'écart-type et de la moyenne. L'utilisation du CV se traduit par une plus grande importance pour les variables avec de petits écart-types relatifs et une moindre importance pour les variables avec un grand écart-type relatif. Cela permet de valoriser les petites variations au profit des grandes [285]. Lors de notre étude, les résultats en PCA ont montré que la standardisation de VAST était la plus adaptée à notre problématique et permettait d'obtenir des scores de presque 20% supplémentaires sur (PC1, PC2) en comparaison avec les résultats obtenus avec la standardisation de Pareto. À partir de ces analyses préliminaires des données icIEF des Acms, la standardisation de VAST a en conséquence, été sélectionnée pour la suite de nos travaux.

d) Conclusions sur l'importance du prétraitement

Pour garantir l'interprétation correcte des données par des méthodes d'analyses multivariées, il est nécessaire d'effectuer des étapes de prétraitement des signaux afin de minimiser les variations non souhaitées et de focaliser l'étude sur les facteurs visés. Ces méthodes de prétraitement permettent de veiller à minimiser notamment les sources de variabilités instrumentales et autres sources de variations non échantillonnées dans l'ensemble de données, tout en préservant les différences physiques ou chimiques, avant l'analyse statistique. Pour cela, des étapes de réduction du bruit, d'alignement et de standardisation des signaux tendent à rendre ces derniers comparables, et, dans le cadre de la PCA, ces procédures peuvent considérablement renforcer la capacité de discrimination de la méthode statistique tout en préservant les informations chimiques. Néanmoins, selon l'application, le jeu de données utilisé, et de l'objet de l'étude, il est nécessaire de réadapter la procédure de prétraitement. En effet, chaque jeu de données a ses propres sources de variances et ses différentes stratégies de prétraitement pouvant mettre en valeur certaines sources de variances plutôt que d'autres. Ainsi, l'élaboration d'une méthode de prétraitement est une étape importante du développement d'outils en chimiométrie. Dans le cadre de cette thèse, la procédure de prétraitement diffère lorsqu'il s'agit de la reconnaissance entre plusieurs anticorps différents (**Chapitre IV**) ou la discrimination de formes dégradées d'un même anticorps (**Chapitre V**). Ces modifications dans les méthodes sont liées au fait que les écarts entre les profils sont plus subtils lorsque l'objectif est de comparer un même anticorps par rapport à une étude comportant plusieurs anticorps de profils différents.

2. APPLICATIONS DE LA CHIMIOMETRIE AU CONTROLE QUALITE

1.2.1 Applications de la chimiométrie aux méthodes spectrales

La spectroscopie s'intègre parfaitement dans le contexte d'analyse QbD. Elle rassemble un ensemble de techniques rapides pouvant être automatisées, comme la spectroscopie UV [270], Infrarouge [271], Raman [272], [233], le Dichroïsme Circulaire et leurs dérivés [286]. Par ailleurs, ces techniques demandent très peu de préparations ou de manipulations des échantillons. Cependant, la complexité des données spectrales redondantes, bruiteuses et corrélées nécessite une analyse multivariée pour extraire les informations les plus pertinentes avec précision et fiabilité.

Les applications de la chimiométrie aux différentes méthodes spectrales sont largement implantées dans le cadre du concept PAT, et donc pendant les procédés de développement et de production [287]. Néanmoins, des applications de contrôle qualité sur des produits finis se développent de plus en plus. Wei et al. (2022) ont démontré le potentiel de la spectroscopie Raman dans le contexte du contrôle qualité sur des protéines thérapeutiques formulées, en utilisant des régions spectrales spécifiques aux protéines. Ceci a permis l'étude simultanée de plusieurs attributs de qualité lorsque les protéines sont dans différentes formulations [288]. Les spectres

Raman ont ici été prétraités (lissage de Savitzky-Golay, standardisation, et dérivé du premier ordre), puis utilisés pour une modélisation par PLS. En effet, les données spectrales sont affectées par les différentes formulations (**Figure 51A**) et par conséquent, de nombreuses régions spectrales doivent être évaluées simultanément pour témoigner de ces effets (**Figure 51B**). La multiplicité des régions spectrales d'intérêt, et leur détermination, expliquent la nécessité de l'approche par analyses multivariées pour interpréter les résultats. La spectroscopie Raman a été employée pour d'autres problématiques, notamment combinée à la PLS pour de l'identification d'anticorps [289], des prédictions de composition lors de la production, ou combinée à la PCA [290], pour l'étude des PTMs [231], la formation des agrégats [235] et la glycosylation.

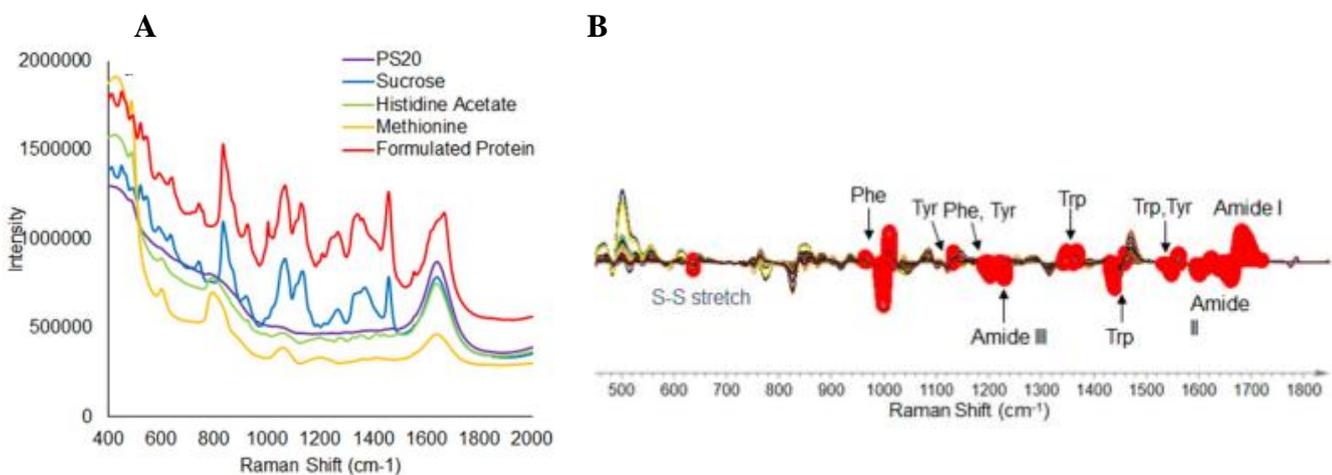


Figure 51 : (A) Spectres Raman pour une protéine formulée (rouge) à une concentration de 30 mg/mL et pour les composants des différentes formulations, y compris l'acétate d'histidine 20 mM (vert), 240 mM de saccharose (bleu), 10 mM de méthionine (jaune) et 0,06 % (p/v) de PS20 (violet), (B) Spectres Raman prétraités superposés de tous les échantillons d'étalonnage. Les cercles rouges mettent en évidence les nombres d'ondes correspondant aux variables ayant le plus d'importance, d'après Wei et al. (2022) [288].

D'autre part, l'association de la spectroscopie UV avec la chimiométrie peut être une alternative aux méthodes classiques telles que la chromatographie liquide. Par exemple Jaccoulet et al. (2021) ont développé une méthode couplant une spectroscopie UV associée à l'analyse par injection en flux (*Flow injection spectrophotometry*, FIS) avec la PCA après avoir effectué une étape de préparation des données (lissage de Savitzky-Golay et dérivée seconde du spectre UV). Le prétraitement permet d'obtenir les données centrées réduites de la dérivée seconde des signaux UV, ce qui est une démarche classique pour ce type de données spectrales. De plus, cette méthode est complémentaire à d'autres approches, celle-ci permet d'analyser les agrégats des anticorps monoclonaux une fois reconstitués [286]. Les informations obtenues sont comparables à celles traditionnellement déterminées en SEC pour le taux d'agrégation et la quantité de protéines perdue. De plus, la FIS évite les inconvénients de la

chromatographie (adsorption des Acms sur la colonne, temps d'équilibration, temps d'analyse et préparation des phases mobiles...). Dans ce cas, la chimiométrie permet un gain de temps et de simplicité.

La suite de ce chapitre est dédiée à la chimiométrie combinée à des méthodes séparatives (non spectrale) et à leurs applications à la biopharmaceutique.

1.2.2 Application de la chimiométrie aux autres méthodes analytiques

Si la chimiométrie est très majoritairement utilisée pour des analyses en ligne durant le procédé de production, elle est encore peu étudiée pour des combinaisons entre des techniques séparatives et la chimiométrie, appliquées aux anticorps monoclonaux ou protéines. Cependant, certaines applications récentes, sur des méthodes non spectrales, ont été introduites pour l'industrie biopharmaceutique. Les études de stabilité, en particulier, sont propices aux analyses multivariées, car elles nécessitent le suivi de plusieurs CQAs et plusieurs paramètres simultanément sur plusieurs semaines pour répondre aux exigences qualité [291].

Très récemment, Kulakova et al. (2023) ont établi une stratégie permettant l'identification de conditions de formulations optimales de manière rapide et fiable pour plusieurs types de protéines [292]. Cinq techniques de caractérisation (nano DSF, SEC-MALS, DLS, ICD, icIEF) ont été utilisées pour obtenir les valeurs de différents paramètres pour 14 protéines structurellement différentes (dont IgG1 et IgG2), formulées dans six tampons (histidine, acétate, ou phosphate avec différents pH et forces ioniques), en présence de différents excipients (280 mM sucrose, 140 mM arginine HCl, and 280 mM proline). Soit 24 conditions par protéine ont été évaluées. Par PCA, il a été démontré qu'il est possible de discriminer les échantillons en fonction du pH du tampon de formulation, le long de l'axe PC1 (**Figure 52**). Les formulations à plus faible pH sont positionnées sur la partie la plus à gauche de la représentation (**Figure 52**). Cette représentation *biplot* montre que les pH inférieurs sont liés à des valeurs inférieures de concentrations (en protéines) et de températures pour lesquelles les protéines sont à 50% de dénaturation (respectivement $c_{1/2}$, $T_{1/2}$), paramètres exprimés dans la partie droite selon l'axe PC1. Ceci est une indication sur l'état de stabilité des protéines qui, d'après les résultats, est plus faible pour les pH inférieurs.

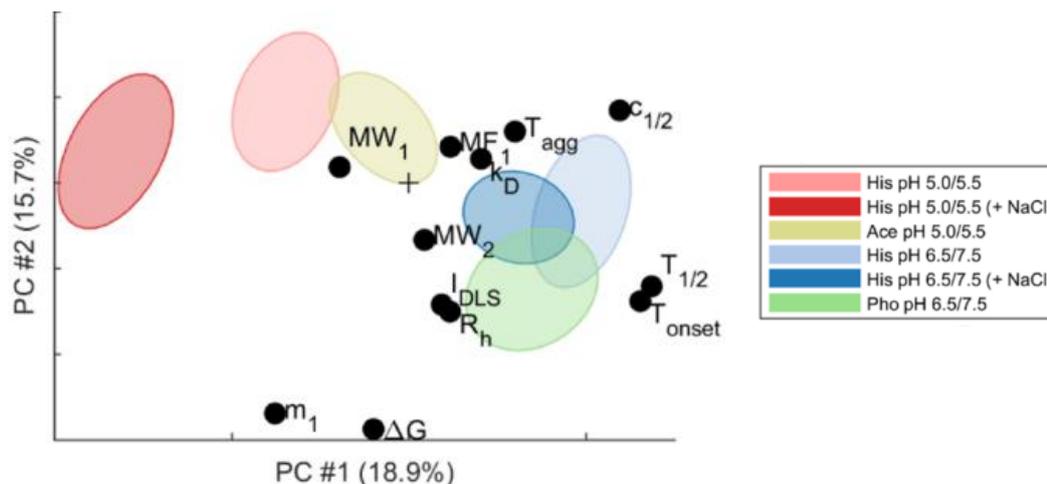


Figure 52 : Représentation *biplot* de PCA, dont les ellipses représentent les différentes formulations, tandis que les points noirs sont des projections paramètres étudiés pour former les axes. Les ellipses sont formées selon le pH et la force ionique des formulations pour 14 protéines différentes (Kulakova et al, 2023) [292].

Dans cette étude, les PCA et les régressions ont été effectuées à partir des paramètres déterminés par les cinq techniques de caractérisation utilisées comme, entre autres, le rayon hydrodynamique (R_h) par DLS, le point isoélectrique par icIEF, les masses molaires des fragments et agrégats par SEC-MALS, $c_{1/2}$ et l'enthalpie libre (ΔG) par dénaturation chimique isotherme (*isothermal chimique dénaturation*, ICD), $T_{1/2}$ par fluorimétrie différentielle à balayage (*Differential Scanning Fluorimetry*, DSF) [293]. Malgré l'apport non négligeable d'information de chaque technique, cette multiplication de techniques demande du temps de préparation des instruments et des échantillons, un certain volume d'échantillon et des expertises différentes pour chaque méthode. Elle ne peut donc pas être appliquée dans un contexte de contrôle qualité rapide, aussi bien pour le suivi de production que pour l'administration de médicament à l'hôpital.

La méthode précédemment décrite utilise les paramètres obtenus par les différentes techniques et non les profils correspondant aux signaux. Cependant, en s'inspirant de ce qui est déjà instauré en spectroscopie, les spectres sont utilisés en tant « qu'empreintes digitales » des molécules étudiées pour effectuer les comparaisons, discriminations ou prédictions par chimiométrie. Des méthodes appliquées directement aux profils chromatographiques commencent à être développées. Shatat et al (2021) ont notamment utilisé les signaux d'échantillons d'anticorps (Trastuzumab et biosimilaires) analysés par différentes techniques chromatographiques pour construire les matrices propices à la chimiométrie. Une simple étape de prétraitement a été suffisante pour centrer et réduire les données afin d'extraire des informations sur l'effet des différents stress [294]. Ainsi, des PCA ont été effectuées à partir de chromatogrammes obtenus par SEC et CEX, et ont permis l'évaluation de la stabilité du Trastuzumab et de ses biosimilaires. Les données exportées à partir de chaque technique d'analyse ont été traitées séparément avant d'être assemblées en une

outils chimiométriques sont développées. Les méthodes présentées ci-dessus combinent les résultats issus de plusieurs techniques complémentaires, pour l'étude de plusieurs CQAs, en exploitant les signaux extraits ou les paramètres déduits. Ces nouvelles applications sont d'autant plus prometteuses qu'actuellement, elles se limitent à des prétraitements simples (les données sont uniquement centrées réduites) pour mettre en valeur les différences entre les échantillons. Cela signifie qu'il peut être possible d'affiner d'autant plus les résultats (issus des méthodes exploratoires ou des modèles) ou d'augmenter leurs fiabilités, en exploitant un jeu de données sur lequel des prétraitements permettant une meilleure discrimination seraient appliqués. Par exemple, des prétraitements envisageables pourraient être ceux déjà actuellement utilisés dans le cadre des analyses spectrales ou ceux décrits pour le domaine de la métabolomique. Ces stratégies s'inscrivent dans le contexte actuel du contrôle qualité qui tend à employer de plus en plus les analyses multivariées, ce qui à terme, permettra d'automatiser et de fiabiliser les résultats dans une démarche de gestion des risques.

3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Nous avons constaté que les combinaisons de techniques séparatives analytiques et chimiométriques étaient peu développées pour des applications sur les protéines et notamment les anticorps monoclonaux. En effet, les méthodes existantes multiplient les techniques de séparation dans le but d'obtenir le plus de paramètres possibles sur un même échantillon, permettant ainsi l'application d'analyses multivariées. Cette stratégie ne peut cependant pas s'appliquer à un contrôle rapide des anticorps intacts dans un contexte hospitalier. Concernant la seconde stratégie permettant l'exploitation des signaux d'une seule méthode séparative comme « empreinte digitale », celle-ci est encore limitée pour ce type d'applications. De plus, les prétraitements des signaux actuellement utilisés peuvent être améliorés pour fiabiliser les résultats et augmenter les scores.

La volonté de développer des méthodes couplées à la chimiométrie est en partie liée à la nécessité d'augmenter les cadences, la multiplication des attributs de qualité à suivre, et l'automatisation du contrôle qualité. Cette nécessité est en particulier présente et très décrite dans l'industrie lors de la production des bioproduits. Cependant, elle est beaucoup moins développée au sein des hôpitaux, bien que le contrôle qualité des médicaments préparés soit important pour la sécurité des patients [287]. Pour répondre à cette problématique, une méthode d'analyse a été développée pour garantir notamment la reconnaissance rapide des médicaments préparés (reconstitués) avant administration aux patients (Jaccoulet et al. 2018) [296]. Cependant, les solutions restent rares et peu mises en pratique dans les hôpitaux français.

Le développement de méthodes analytiques permettant un contrôle qualité des médicaments préparés en tenant compte des contraintes de temps et de moyens humains dans le contexte hospitalier est encore aujourd'hui un défi pour la chimie

analytique. L'objectif de ces travaux de thèse est donc d'apporter une solution pour un contrôle qualité adapté aux hôpitaux, sans ambiguïté, et aussi performant en rapidité de préparation et d'exécution, que peuvent l'être les méthodes spectrales. La méthodologie de traitement de signal appliquée aux électrophérogrammes obtenus est semblable à celle utilisée par les méthodes décrites précédemment.

De plus, nous avons choisi d'orienter les travaux de cette thèse vers le développement d'une méthode fondée sur les signaux obtenus par icIEF, une technique séparative rapide, facile, nécessitant un nombre d'étapes de préparation d'échantillon limité et applicable pour un contrôle hospitalier. À partir de ce développement analytique, nous avons cherché à utiliser le signal des anticorps obtenu par l'icIEF comme une « empreinte » avec des étapes de prétraitement adaptées pour effectuer des études par PCA et PLS-DA. Cette combinaison entre l'icIEF et la chimiométrie tend à vérifier l'identité des anticorps, et a permis d'étudier rapidement la stabilité d'échantillons d'Acms préparés pour être directement administrés aux patients dans les minutes qui suivent.

1. CONTEXTE HOSPITALIER

Les anticorps monoclonaux sont de plus en plus utilisés dans les hôpitaux, en particulier dans le domaine du traitement contre le cancer. Cependant, malgré des succès significatifs dans les traitements en immunothérapie, l'utilisation d'anticorps monoclonaux et d'autres produits biopharmaceutiques, peuvent entraîner une perte d'efficacité du médicament et une réponse immunitaire chez certains patients [297], [298]. Cette réaction peut affecter l'efficacité du médicament administré, notamment en raison de la production d'anticorps dirigés contre celui-ci (*Anti Drug Antibody*, ADA). Par exemple, le Natalizumab, un IgG4 utilisé dans le traitement de la sclérose en plaque, a conduit à une production d'ADA relativement importante chez les patients (près de 3-9%) [299], [300]. La réponse immunitaire dirigée contre les traitements diffère selon les patients, les composés, leurs potentiels immunogènes. Cette réponse peut également être influencée par de nombreux autres facteurs tels que, les étapes de production, la formulation finale du médicament, les manipulations hospitalières et les facteurs environnementaux (UV, températures, cycle de congélation, stockage...)[301]. Ces facteurs introduisent des hétérogénéités dans le médicament (charges, tailles, conformations...)[62], et conduisent ainsi à une immunogénicité chez les patients [36]. Parmi les causes de résistance aux traitements de certains patients, sa dégradation partielle avant administration est une hypothèse non négligeable. En effet, les dégradations pourraient avoir une incidence sur l'efficacité du traitement et la réponse du patient.

Afin de comprendre au mieux les effets des différents facteurs influençant la stabilité de la molécule thérapeutique, des études sont effectuées par les industriels pour élaborer des recommandations d'utilisation et de stockage. Cependant, une fois le médicament délivré par les industriels, de nombreux facteurs, liés à l'environnement hospitalier, peuvent altérer les protéines thérapeutiques. Ainsi, la mise en place d'un contrôle qualité permettant de vérifier l'intégrité du traitement avant administration limiterait peut-être les échappements thérapeutiques (résistance aux traitements). Dans ce contexte, il est important de développer des solutions analytiques adaptées aux contraintes hospitalières.

En effet, les médicaments à base d'anticorps monoclonaux sont administrés en milieux spécialisés, c'est-à-dire, en établissement de santé public ou privé. Dans les hôpitaux français, la préparation des traitements à base d'anticorps est communément centralisée au sein de la Pharmacie à Usage Intérieur (PUI).

Les anticorps sont le plus souvent délivrés par les industriels sous forme de solutions concentrées ou de poudres contenue dans un flacon scellé. Lorsque le médicament doit être administré, plusieurs étapes de préparation sont effectuées par un pharmacien afin d'obtenir une solution administrable au patient (voies injectables

stériles en majorité) à partir des solutions délivrées par les industriels. Cette étape est la reconstitution du médicament, elle consiste à dissoudre ou diluer le médicament concentré. Les solutions isotoniques destinées à diluer l'anticorps jusqu'à la concentration souhaitée sont composées de solutions glucosées (glucose 5%) ou salines (NaCl 0.9%) selon les recommandations du fabricant. Tout au long de cette préparation, le pharmacien engage sa responsabilité pour la qualité du traitement qui sera administré.

Ainsi, afin de respecter les exigences de qualité et d'administrer le traitement dans les meilleures conditions, certains hôpitaux cherchent à améliorer le contrôle qualité au sein de l'hôpital. Le contrôle des médicaments avant administration par analyse physicochimique est une activité récente au sein des hôpitaux datant de 2005 [302]. Cependant, la volonté d'instaurer un tel contrôle est propre à chaque hôpital et dépend de la disponibilité d'équipements adéquats, de la formation de techniciens et de l'élaboration d'un programme de contrôle de qualité conforme aux normes et recommandations. Néanmoins, malgré l'automatisation de certaines étapes, l'informatisation du circuit du médicament [303], l'amélioration de la traçabilité, le risque d'erreur de préparation et de manipulation est toujours une réalité hospitalière [304], et par conséquent, un besoin de développement de solutions analytiques pour le limiter est encore nécessaire.

D'un point de vue réglementaire, en France, les traitements étant préparés dans des PUI, les préparations doivent suivre la réglementation imposée par le Code de la Santé Publique et notamment l'article R5126-9 (Code de la santé publique, 5^{ème} partie, chapitre 6)[305]. En effet, la manipulation de ces produits présente un risque à la fois pour les patients (risques liés à l'administration, risques d'erreurs de dosages, de reconstitutions [306]) et pour les professionnels de santé (préparateurs en pharmacie, agents de service hospitalier, infirmiers, etc.) en contact avec ces substances [59], [60]. Cela justifie que la manipulation et l'utilisation de ces produits thérapeutiques soient encadrées.

Dans ce cadre, la préparation et la reconstitution de ces traitements est également guidée par les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP), rédigées par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM) [307]. Ces recommandations sont destinées aux pharmaciens. Elles permettent d'établir des recommandations sur la gestion du système qualité à l'hôpital, la gestion des anomalies, les lignes directrices des PUI, mais aussi sur les pratiques pour élaborer les différentes préparations. Cependant, les BPP ne sont que des recommandations, les hôpitaux adaptent leur contrôle qualité en fonction de leurs moyens (financiers, matériels, humains) et de leurs besoins (nombre de traitements et de patients)[308]. D'après une étude datant de 2016, sur 39 PUI interrogées, 13 % réalisent un contrôle gravimétrique et seulement 28% réalisent un contrôle analytique [309]. Ces résultats, bien que portant sur un nombre d'établissements limité, montrent de réels écarts entre les exigences et les pratiques de contrôle sur les préparations. Des audits internes

peuvent être réalisés pour contrôler les pratiques professionnelles et détecter les étapes non conformes du circuit. Malgré son aspect « facultatif » sur un plan réglementaire, certains PUI cherchent à améliorer leur système de contrôle des médicaments pour limiter les erreurs et s'adapter au mieux à l'augmentation du nombre d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. Ainsi, les méthodes analytiques tendent à se diversifier et à s'adapter aux contraintes hospitalières (temps, moyens, formation du personnel).

2. CONTROLE QUALITE A L'HOPITAL

Selon les pratiques actuelles, trois catégories de contrôle existent pour vérifier les traitements reconstitués à l'hôpital, un contrôle non analytique, lequel s'opère surtout visuellement, un contrôle gravimétrique et un contrôle analytique.

Ces contrôles cherchent à répondre notamment à plusieurs questions :

- Est-ce le bon traitement qui va être administré au patient ?
- Le dosage correspond-il à la prescription ?
- Le traitement a-t-il subi des dégradations depuis la délivrance de lots par les industriels jusqu'à son administration au patient ?

Actuellement, le contrôle visuel est effectué selon deux modes en fonction des moyens disponibles dans les hôpitaux : le double contrôle visuel (surveillance de préparation) et le contrôle par vidéosurveillance. Ces contrôles sont effectués pendant les étapes de manipulation par le pharmacien (*control in-process*)[310].

Le contrôle visuel est effectué à l'aide d'un second préparateur en pharmacie hospitalière ou pharmacien, qui vérifie à l'aide d'une liste (conforme aux BPP) l'identité des solvants, du principe actif utilisés, ainsi que les volumes retirés et prélevés. Le contrôle visuel est aussi réalisé sur la préparation terminée avant sa libération : conformité de l'étiquetage, aspect de la préparation (couleur, limpidité, absence de particules, absence de fuites), conformité de la tubulure (purge, clampage). L'inconvénient majeur de ce mode de contrôle est le caractère humain-dépendant associant un risque d'erreur.

Comme alternative pour réduire les besoins humains, un contrôle par vidéo surveillance a été mis en place. L'enregistrement vidéo permet de garder la traçabilité de ce contrôle et de plus de revenir ensuite en cas de doute et/ou problème. Cependant, la principale limite de ce second contrôle provient du fait que les images sont analysées à postériori, bien que des systèmes de reconnaissance de traitement soient développés [311]. De plus, cette méthode prend beaucoup de temps et peut conduire à la nécessité de consacrer du personnel à cette activité, sans certitude d'éliminer les erreurs, car tout dépend du facteur humain.

Le second contrôle mis en place dans les PUI est le contrôle gravimétrique. Celui-ci a l'avantage de la simplicité, la rapidité et le faible coût, il consiste à peser le principe actif et les excipients de la préparation ou directement la préparation finale pour garantir que la masse attendue est atteinte. Des logiciels ont également été développés afin d'automatiser la traçabilité de ce contrôle. Cependant, ce contrôle ne permet pas de vérifier l'identité, l'intégrité et la quantité du principe actif.

Dans ce contexte, le contrôle analytique semble donc nécessaire pour répondre aux questions citées précédemment [309]. Plusieurs approches analytiques sont possibles [310], par exemple, la chromatographie liquide [302], [312], la spectrométrie UV/IR [313] et l'UV/Raman [314], et la FIA [296]. Néanmoins, ces méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients qui limitent leurs intégrations dans les PUI. Dans le cas de la chromatographie, plusieurs contraintes liées à la technique limitent son utilisation dans les hôpitaux : le temps d'analyse, le temps d'équilibrage, les préparations des phases mobiles... Ces paramètres peuvent être optimisés avec l'emploi de colonnes plus courtes pour l'analyse, par exemple, mais la gestion de l'instrument et des phases mobiles reste laborieuse pour certains hôpitaux.

Pour pallier à ces problèmes de temps, des méthodes spectroscopiques ont été développées. Notamment, des automates faciles d'emploi pour le personnel hospitalier comme le Multispec[®] (UV/IR) et le QC prep +[®] (UV/Raman), DruLog[®] (UV-visible) ont été implantés dans certains hôpitaux [302], [310]. Le principe est fondé sur la comparaison des spectres obtenus avec des méthodes précises et les spectres renseignés sur un jeu de données. Grâce à ces techniques, l'identité du médicament et une étude quantitative de celui-ci peut être réalisée. La précision et la fiabilité des résultats est renseignée par l'algorithme de « matching » servant aux traitements de données issues des spectres. Cependant, le volume d'échantillon requis pour chaque analyse est de 0,9 à 1,2 mL (problème pour les préparations de faibles volumes) et certaines gammes de concentrations peuvent être limitantes (étape supplémentaire de dilution).

Les hôpitaux sont donc libres de choisir les méthodes de contrôle qu'ils souhaitent mettre en place pour garantir la sécurité du patient. Néanmoins, bien que des solutions analytiques soient accessibles, celles-ci peuvent avoir des aspects limitants pouvant expliquer leurs faibles intégrations en milieu hospitalier.

3. OBJECTIFS

Pour garantir la qualité et l'efficacité des traitements à base d'anticorps monoclonaux, ainsi que la sécurité des patients dans les hôpitaux français, il est important de multiplier les efforts pour développer des solutions analytiques adaptées. Celles-ci doivent, à la fois, permettre un contrôle analytique fiable pouvant aboutir à une décision pharmaceutique finale (administré ou non un médicament), et être adaptées

aux problématiques du quotidien des hôpitaux. L'augmentation de la diversité des traitements à base d'anticorps, le nombre de patients, et la cadence hospitalière tendent à accentuer les besoins de méthodes de contrôle rapides, faciles et fiables. De plus, face à un taux d'échappement élevé pour certains traitements, le contrôle de l'intégrité des anticorps avant administration aux patients devient une problématique clinique pertinente.

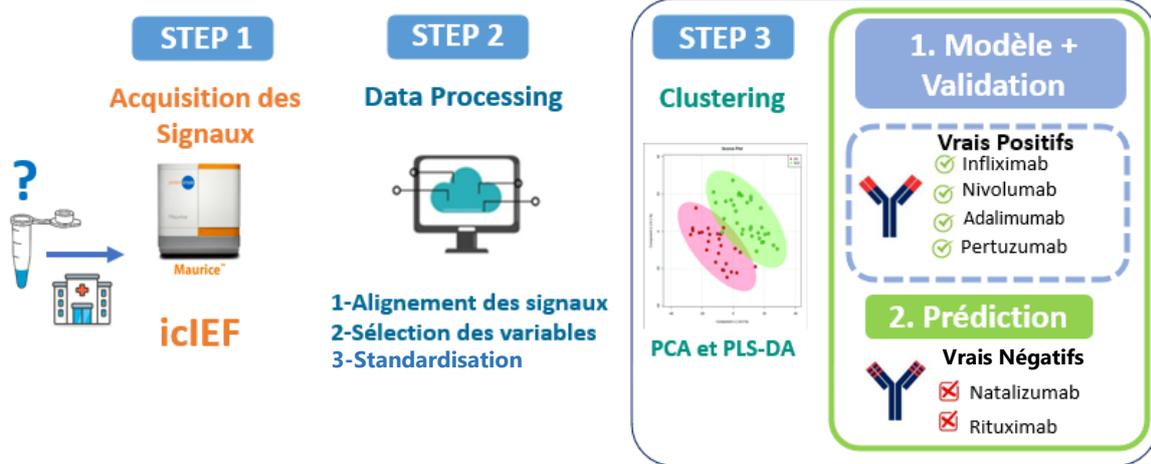
Dans ce contexte, nous avons choisi de faire évoluer ces travaux de thèse selon trois axes résumés par le schéma ci-dessous (**Figure 54**). Le premier axe tend à répondre aux besoins d'identification des médicaments, qui avec l'augmentation de la variété de médicaments à base d'Acms thérapeutiques dans les hôpitaux est une des problématiques actuelles. Une méthode rapide et efficace a donc été développée pour permettre une vérification analytique simple par les pharmaciens avant administration du traitement (**Chapitre IV, Figure 54**).

Une des problématiques que ne résout pas le contrôle analytique actuel dans les hôpitaux est l'intégrité du médicament. Les manipulations et l'environnement hospitalier peuvent affecter les médicaments, les dégradations engendrées peuvent être à l'origine de l'immunogénicité développée par certains patients. Ainsi, nous avons décidé de développer une méthode analytique pouvant être appliquée dans les hôpitaux et permettant de discriminer les formes dégradées d'anticorps monoclonaux (**Chapitre V, Figure 54**).

Enfin, notre dernier axe a pour but de déterminer si les stress reproduisant les conditions hospitalières ont un impact sur l'activité biologique d'un des anticorps les plus utilisés, l'Infliximab. Plusieurs méthodes innovantes ont été testées et comparées pour répondre à cette problématique (**Chapitre VI, Figure 54**).

Identification des médicaments – Chapitre IV

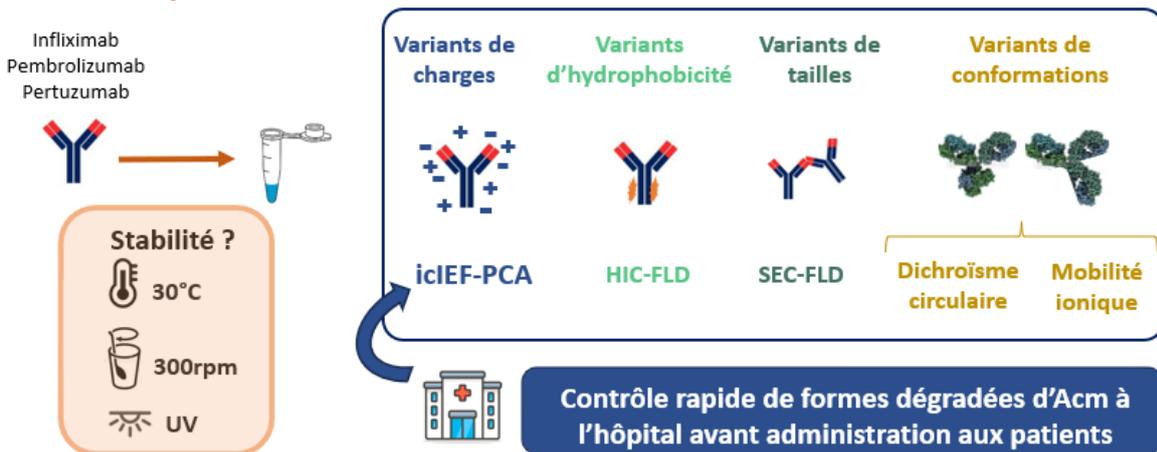
Identification d'anticorps monoclonaux à l'hôpital avant administration aux patients



Etude de dégradations forcées – Chapitre V

Dégradations en contexte hospitalier

Attributs de qualité critiques



Etude des interactions anticorps-cibles – Chapitre VI

Etude de l'impact des stress hospitaliers sur les interactions entre l'Infliximab et le TNF- α par des stratégies analytiques innovantes

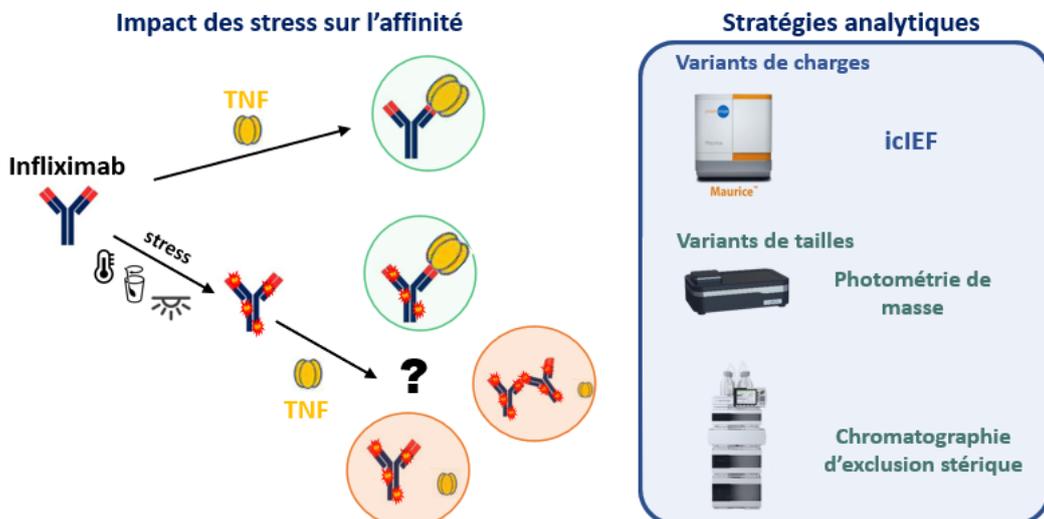


Figure 54 : Schéma explicatif de la thèse

Partie Expérimentale

4 CHAPITRE IV : IDENTIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX PAR ICIEF ASSOCIEE A LA CHIMIOMETRIE

1. INTRODUCTION DE L'IDENTIFICATION DES ANTICORPS AVANT ADMINISTRATION AUX PATIENTS : INTERET DANS UN CONTEXTE HOSPITALIER

Le nombre de traitements à base d'anticorps monoclonaux disponibles dans le commerce a considérablement augmenté ces dernières années. Près de 175 traitements sont en cours d'évaluation réglementaires ou approuvés. D'autres Acms sont en essais cliniques (dont 140 en phase 2), les traitements disponibles sur le marché sont donc en constante augmentation [1]. Dans les hôpitaux, cet essor entraîne une augmentation des prescriptions d'Acms différents et implique la mise en place d'un contrôle qualité plus rigoureux. En effet, ce contrôle est d'autant plus important que le nombre d'Acm est en constante augmentation. En particulier, une part des erreurs d'administration aux patients est liée au fait que le traitement administré ne correspond pas au bon patient, étude a montré que cette part représente 33% des erreurs d'administration réalisées [58].

Actuellement, dans les hôpitaux français, lors de la reconstitution des médicaments à base d'Acms avant administration aux patients, les contrôles effectués sont principalement visuels [311]. Le contrôle visuel est une technique couramment utilisée, car les Acms sont des glycoprotéines complexes et hétérogènes, ce qui rend difficile à mettre en œuvre d'un contrôle rapide, avant administration aux patients, par des techniques analytiques. Celui-ci consiste à vérifier que des particules visibles ne soient pas présentes dans la poche de perfusion et permet également de surveiller le préparateur au moment de la préparation de la poche. Le contrôle visuel sert aussi de contrôle d'identité, néanmoins, le facteur humain reste sa principale limite.

Cependant, face à l'augmentation du nombre de médicaments, le contrôle analytique est devenu un besoin clinique, actuellement non satisfait, mais nécessaire pour réduire les erreurs d'administration. Notamment, en s'assurant de l'identité du médicament, donc que le bon Acm soit administré au bon patient.

Ainsi, nous avons cherché à développer une méthode permettant un contrôle analytique rapide et à haut débit, assurant un contrôle qualité des traitements reconstitués adapté aux hôpitaux. Dans ce chapitre, la conception de la méthode permettant la reconnaissance des traitements à base d'Acms avant qu'ils ne soient administrés aux patients est expliquée et détaillée.

Afin de s'adapter au mieux aux contraintes hospitalières, nous nous sommes intéressés à la focalisation isoélectrique capillaire en image (icief) commercialisé par Biotechne© compte tenu de sa simplicité, sa rapidité et sa robustesse [105]. En effet, cet instrument est accessible à des expérimentateurs non spécialistes et permet, en comptant la

préparation d'échantillon, la préparation de l'instrument, le temps d'analyse et l'interprétation des données, d'obtenir des résultats robustes en moins de 20 min. Une réduction du temps d'analyse à 5 min est envisageable et la préparation d'échantillon peut encore être simplifiée par l'achat à terme de solutions commerciales ; ce qui réduirait cette étape au simple ajout de quelques microlitres provenant de la poche de perfusion. L'icIEF est donc une méthode prometteuse dans un contexte hospitalier.

Dans un premier temps, une méthode par icIEF générique (adaptée au plus grand nombre d'Acms), indépendamment de leurs classes, sous-classes, et de leurs propriétés physico-chimiques, a été développée. Puis, dans un second temps, une combinaison d'approches chimiométriques a été étudiée grâce aux données obtenues par icIEF sur différents anticorps. Afin d'être le plus représentatif de ce qui peut se produire quotidiennement à l'hôpital, différentes sources de variabilités dans la méthode expérimentale ont été introduites (i.e. jours, cartouches, anticorps, préparations d'échantillons et concentrations d'Acms). L'ensemble de ces variabilités a permis de construire un modèle chimiométrique robuste et réaliste, développé à partir de 234 électrophérogrammes.

De plus, comme présenté dans le **Chapitre III**, de plus en plus d'applications utilisent des techniques d'analyses multivariées (*multivariate analysis*, MVA) pour permettre une exploitation plus complète et fiable des données obtenues par les techniques analytiques conventionnelles. L'association de l'icIEF à la chimiométrie semble donc une approche particulièrement adaptée aux contraintes du contexte hospitalier dans le but de répondre au besoin d'identification des traitements. Cela permet notamment de faciliter les interprétations (temps, fiabilité) et par conséquent les prises de décisions cliniques.

4.1.1 Objectifs et méthodes appliquées

Ce travail a pour objectif d'explorer le potentiel de l'icIEF associé à des techniques chimiométriques telles que l'Analyse en Composantes Principales (Principal Component Analysis, PCA) et l'analyse discriminante par régression des moindres carrés (*Partial Least Square Discriminant Analysis*, PLS-DA), préalablement décrites dans le **Chapitre III** [315], [276], [269]. Les représentations statistiques obtenues par ces deux techniques ont été construites à partir d'électrophérogrammes pour identifier et discriminer différents anticorps thérapeutiques reconstitués. Afin de pouvoir utiliser les électrophérogrammes pour les MVA, les signaux doivent être transformés au préalable par une méthode de prétraitement. Une partie importante de ce travail a été d'établir la procédure pour le prétraitement de données [281]. Cette procédure comporte plusieurs étapes classiques, dont l'alignement des signaux et leurs standardisations.

Une fois les données prétraitées, il est possible d'appliquer les techniques de chimiométrie à la base des données issues des électrophérogrammes transformés. La PCA est utilisée en première intention comme technique exploratoire. En effet, elle a

permis dans un premier temps d'établir quelle était la méthode de prétraitement la plus optimale. Puis, l'interprétation des résultats générés a conduit à la mise en valeur de certaines tendances (discrimination et identification des groupes d'individus). Dans notre cas, la PCA a été appliquée dans le but de mettre en place les paramètres de traitement de signaux pour ensuite construire le modèle en PLS-DA. La PLS-DA a donc pour objectif de reconnaître les anticorps les uns des autres. Le modèle de PLS-DA utilise donc le même jeu de données prétraité que celui utilisé en PCA. La PLS-DA s'effectue en trois temps, (i) la construction du modèle à partir d'une grande partie du jeu de données, (ii) la validation du modèle avec cette même partie du jeu de données, (iii) la prédiction à partir d'une seconde partie du jeu de données (non utilisé pour la construction du modèle). Les détails sur l'échantillonnage du jeu de données sont décrits dans la partie 2 de ce chapitre (**Tableau 2**).

La construction du modèle consiste à créer des axes (variables latentes) à l'origine d'espaces à plusieurs dimensions pour visualiser les données référencées (attribution à des classes) de manière optimale à partir des données prétraitées (se référer au **chapitre III**). La répartition des données dans ces espaces permet de discriminer les échantillons selon leur classe. Dans notre cas, chaque classe correspond à un anticorps différent. Les espaces créés permettent donc de visualiser les différents anticorps et de les séparer à partir d'un plus grand nombre de données disponibles. La méthode de validation ensuite appliquée est la validation croisée, celle-ci consiste à faire un échantillonnage aléatoire du jeu de données dédié à la construction du modèle pour former des sous-groupes [316]. Cette méthode de validation teste successivement les échantillons d'un sous-groupe en les confrontant au modèle obtenu à partir de l'ensemble d'autres sous-groupes (voir **Figure 55**). La méthode est validée lorsque chaque sous-groupe a été testé.

Enfin, la dernière étape de la PLS-DA est la prédiction, celle-ci permet d'attribuer un échantillon à des classes obtenues pendant la modélisation. En d'autres termes, la prédiction permet de reconnaître l'anticorps d'un échantillon inconnu, il s'agit donc de l'étape d'identification. La méthode de prédiction est fondée sur une logique simple de prédiction binaire, celle-ci repose sur une réponse « OUI/NON » pour accepter ou rejeter un échantillon. Cette réponse « OUI/NON » est attribuée grâce à une valeur seuil appropriée[278]. Celle-ci permettant au modèle de déterminer les individus à

inclure ou à exclure d'un nuage de points correspondant à un anticorps [279].

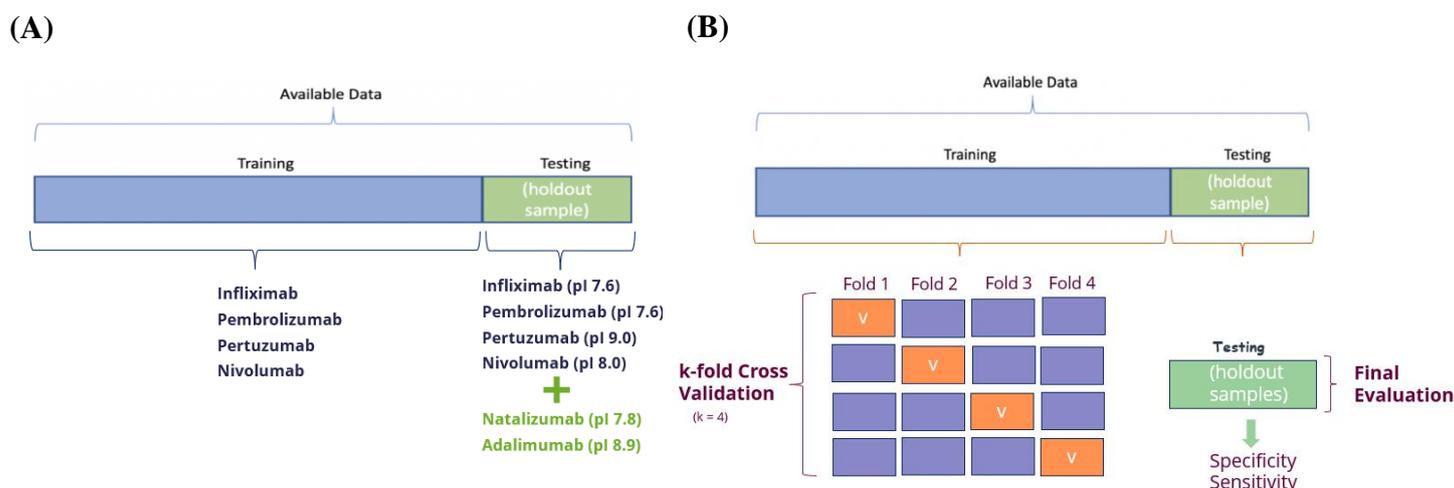


Figure 55 : (A) Schéma explicatif des différents ensembles du jeu de données, les échantillons dans l'ensemble d'entraînement sont utilisés pour la modélisation et la validation croisée représentés en bleu, les échantillons utilisés pour la prédiction sont représentés en vert. (B) Explication du principe de la validation croisée, l'ensemble des données d'entraînement sont divisées en sous-groupes, chaque sous-groupe est utilisé à tour de rôle comme données de validation (orange).

4.1.2 Choix des paramètres analytiques

Pour cette étude, nous avons utilisé des Acms disponibles dans le commerce dont le pl est compris entre de 7.6 à 9.0, gamme classiquement observée pour ce type de produits biothérapeutiques [317], [318]. Les Acms ont été sélectionnés pour leurs propriétés physico-chimiques, mais également en fonctions de leurs différences de générations (chimériques, humanisés et humains complets) et de sous-classes (IgG1 et IgG4, les plus répandues). Nous avons choisi l'Infliximab (chimérique, IgG1) et l'Adalimumab (entièrement humain, IgG4), car il s'agit de deux Acms de générations différentes, mais avec des activités biologiques similaires (tous deux dirigés contre le TNF- α). Le Nivolumab (entièrement humain, IgG4) et le Pertuzumab (humanisé, IgG1) ont été sélectionnés, car ce sont deux Acms parmi les plus employés. De plus, le Pertuzumab est un Acm humanisé correspondant à une autre génération que le Nivolumab. L'utilisation de ces différents anticorps a permis d'introduire une grande variabilité dans le modèle crée aussi bien en termes de génération, de cibles biologiques et de formulations.

Pour valider le modèle, deux Acms considérés comme « Vrais Négatifs » ont été inclus dans le jeu de données, le Rituximab et le Natalizumab. Ces deux anticorps ont été sélectionnés pour évaluer le potentiel du modèle à reconnaître les deux Acms considérés comme « inconnus », en prenant soin de choisir un Acm humanisé et l'autre chimérique (Natalizumab et Rituximab, respectivement). La **Figure 55A** décrit les différents ensembles d'échantillons destinés à la modélisation ou à la prédiction.

Par ailleurs, il a été choisi d'effectuer des expériences à différentes concentrations pour déterminer si ce paramètre affectait l'efficacité du modèle. Les concentrations testées sont parfois plus faibles que les concentrations administrées aux patients. En effet, les concentrations utilisées étaient de 0.5 mg.mL^{-1} , 1 mg.mL^{-1} et 1.5 mg.mL^{-1} . Parmi les anticorps testés, quatre d'entre eux peuvent être administrés par voie intraveineuse (Infliximab, Rituximab, Nivolumab, Pertuzumab) à des concentrations de l'ordre de 1 mg.mL^{-1} , les autres anticorps sont administrés à des concentrations plus élevées. Néanmoins, dans un processus de contrôle qualité à l'hôpital, la dilution d'une solution standard est une opération tolérée par les directives des différentes autorités. Cette dilution effectuée est donc en accord avec notre étude dans un contexte de contrôle qualité dans les hôpitaux.

2. ARTICLE 1 : FOCALISATION ISOELECTRIQUE CAPILLAIRE EN IMAGE ASSOCIEE A L'ANALYSE MULTIVARIEE : UN OUTIL PUISSANT POUR LE CONTROLE QUALITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX THERAPEUTIQUES

Article Talanta accepté 2023

Article 1: Imaged capillary isoelectric focusing associated with multivariate analysis: a powerful tool for quality control of therapeutic monoclonal antibodies

Cécile Tardif¹, Emmanuel Jaccoulet³, Jean-François Bellec⁴, Yannick Surroca⁴, Laurence Talbot⁴, Myriam Taverna^{1,2}, Claire Smadja^{1*}

¹ Institut Galien Paris Saclay, Université Paris-Saclay, CNRS UMR 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), 17 Avenue des Sciences, 91300 Orsay, France

² Institut universitaire de France, 103 Boulevard Saint Michel, 75005 Paris, France

³ AGEPS-APHP- 7 Rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France

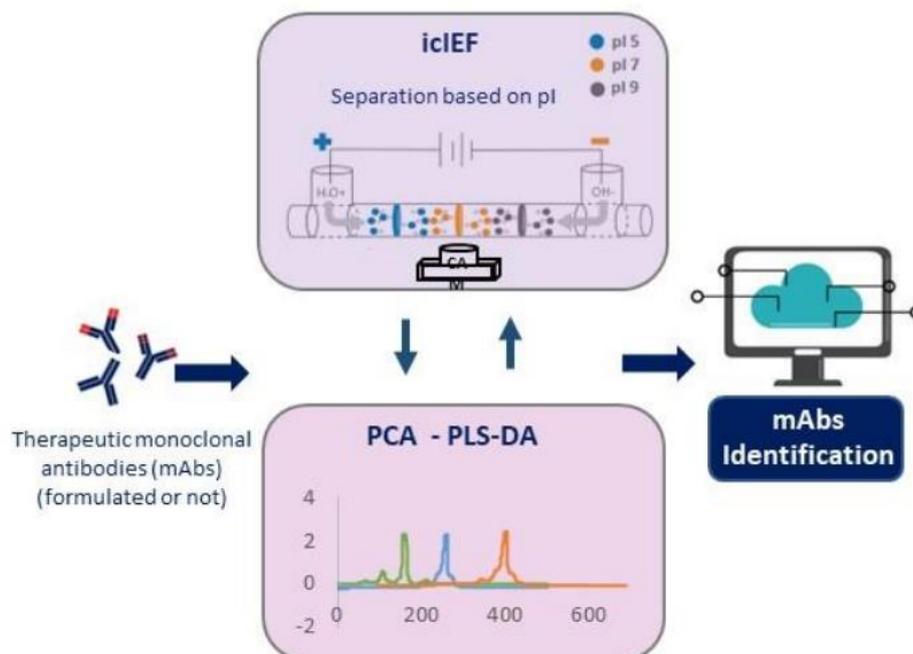
⁴ Biotechne France, 19 Rue Louis Delourmel, 35230 Noyal-Châtillon-sur-Seiche, France

***Corresponding author:** E-mail: claire.smadja@universite-paris-saclay.fr

Abstract and graphical abstract

Monoclonal antibodies are increasingly used in cancer therapy. To guarantee the quality of these mAbs from compounding to patient administration, characterization methods are required (e.g. identity). In a clinical setting, these methods must be fast and straightforward. For this reason, we investigated the potential of image capillary isoelectric focusing (icIEF) combined with Principal Component Analysis (PCA) and Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). icIEF profiles obtained from monoclonal antibodies (mAbs) analysis have been pre-processed and the data submitted to principal component analysis (PCA). This pre-processing method has been designed to avoid the impact of concentration and formulation. Analysis of four commercialized mAbs (Infliximab, Nivolumab, Pertuzumab, and Adalimumab) by icIEF-PCA led to the formation of four clusters corresponding to each mAb. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) applied to these data allowed us to build

models to predict which monoclonal antibody is analyzed. The validation of this model was obtained from k-fold cross-validation and prediction tests. The selectivity and the specificity of the model performance parameters were assessed by the excellent classification obtained. In conclusion, we established that the combination of icIEF and chemometric approaches is a reliable approach for unambiguously identifying compounded therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) before patient administration.



Keywords: Imaged capillary isoelectric focusing; Therapeutic monoclonal antibody; Quality control; mAb formulation; chemometric; Principal Component Analysis

1. Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are increasingly developed for the treatment of a variety of autoimmune and inflammatory diseases, as well as cancer. Their selectivity for biological targets and limited side effects explain the increased interest of the biopharmaceutical industry in these molecules [14]. In a hospital environment, their administration requires a compounding step, mainly performed by diluting marketed mAbs at high concentrations in isotonic solutions. According to good manufacturing practices, online quality control of mAbs before patient administration is mandatory to detect errors (related to treatment or dosage) during the compounding step and avoid administration mistakes that account for 33% of overall pharmaceutical errors (more frequent than prescription errors)[2,3].

mAbs are complex and heterogeneous glycoproteins with a wide range of variants that make quality control using separative methods challenging. Before their release to patients, mAbs compounded at hospitals are typically submitted to visual controls only. However, a much more thorough characterization process assessing their identity (the right mAb to the right patient), micro-heterogeneity, and structural integrity is required to ensure their quality. And in a clinical context (lean production and high demand for outpatient care), a fast, simple, and high-throughput method is critical [15].

Charge variants linked to post-translational modifications (mainly glycosylation) and degradations/modifications in the protein sequence represent the main source of micro-heterogeneity for formulated mAbs and are an important critical quality attribute [16]. Profiling of intact mAbs based on the charge may also help identifying different species, related to conformations, size, and sequence, making it a reliable approach for assessing mAbs identity. To fully identify charge variants of a given mAb, profiling its charge variants using ion-exchange chromatography (IEX) is a powerful and widely adopted approach [17]. However, accurate identification of mAbs often requires liquid chromatography coupled with mass spectrometry (MS)[18]. Besides, "bottom-up" or "middle-up" approaches followed by 2-dimensional liquid chromatography (2D-LC) (e.g. IEX and RPLC)-MS instrumentation allow numerous mAbs variants identification [9, 10]. More recently, online automated multi-dimensional high (ultra) performance liquid chromatography, including ion-exchange chromatography and RPLC-MS, namely 4D HPLC [20], has been shown to separate major and minor charge variants, improving the sequence coverage and thereby mAbs identification. However, these methods involve many different and complementary approaches that do not meet the fast, simple, and high-throughput analysis required for mAbs identity and dosage confirmation in hospitals.

As an alternative to chromatographic approaches and in line with the requirements of the clinic, capillary electrophoresis (CE) has proven to be a reliable tool for routine analysis and has gained acceptance in the field of quality control of mAbs. CE methods like SDS-CGE, CZE, and cIEF have been introduced as potential identification tools based on migration time [21]. The more recent imaged capillary

isoelectric focusing (icIEF), whereby imaging of the entire column eliminates resolution issues associated with mobilization, has emerged as a promising QC method. icIEF provides higher resolution and reproducibility in a shorter analysis time than conventional cIEF and is widely employed to separate protein charge variants based on their isoelectric point (pI) [22]. A recent interlaboratory study involving 12 laboratories [23] demonstrated the robustness of the icIEF methodology for analyzing charge variants of monoclonal antibodies. In addition, this CE method meets the criteria required for quality control at hospitals considering its robustness, the small volume required, the short analysis time, and the charge variants separation efficiency. However, mAbs identification based on the pI profiling of one given mAbs might not be accurate for its unambiguous identification. Firstly, high microheterogeneity can generate multiple peaks with different intensities and several close variants that can't necessarily be resolved. Secondly, several mAbs can exhibit similar cIEF profiles that could be modified according to the presence of specific excipients or the mAbs concentration in the formulated product. To make this approach more powerful and allow unambiguous and unbiased identification of compounded mAbs, we explored the idea of combining it with data processing methods and statistical analysis.

Multivariate analysis (MVA) and Partial Least Squares-Discriminant analysis (PLS-DA) have indeed the ability to extract relevant and specific information provided by electrophoretic profiles [24]. This approach has been successfully employed for discriminant analysis (i.e., between mAbs or for mAbs submitted to different stresses) from data obtained by Raman, near-infrared, and UV spectroscopy [18,19,20]. To the best of our knowledge, profiles provided by separation techniques such as icIEF have never been combined with PCA or PLS-DA for mAbs identification purposes. In addition, these data processing methods have the potential to significantly reduce or suppress the impact of mAbs concentration and formulation. This parameter is rarely considered when designing analytical tools for QC.

This work aims at exploring the potential of icIEF combined with Principal Component Analysis (PCA), and PLS-DA built from electropherograms to identify and discriminate different reconstituted therapeutic mAbs. For this study, we used commercially available mAbs (Nivolumab, Infliximab, Pertuzumab, and Adalimumab), with pI ranging from 7.6 to 9. These mAbs were selected based on their physicochemical properties, their generation (zumab, ximab...), and the typical range of pI seen for this type of biotherapeutics. For this purpose, a generic icIEF method adapted to all mAbs, whatever their generation and physicochemical properties, was first developed. Then, a combination of preprocessing approaches was thoroughly investigated using the data sets provided by icIEF analysis. Variabilities in the experimental method as well as different analytical conditions (days, cartridges, sample preparations) used for the icIEF profiling were also introduced to mimic hospital practices (mAbs concentrations and compounding) and build a robust chemometric model.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Pharmalytes (PL) 5–8 and 8–10.5 were obtained from GE Healthcare Bio-Sciences (Gothenburg, Sweden), and urea (99 %) from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Markers for *pI* calculation and Methylcellulose stock solution (3%) were obtained from ProteinSimple, a Bio-Techne brand (San Jose, USA). Acidic and basic blocking agents, respectively Serine (98%) and TEMED (99 %), were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Monoclonal antibodies, Infliximab, Pertuzumab, Nivolumab, Adalimumab, Natalizumab, and Rituximab, were provided from Divbio (Ulvenhout, Netherland). All mAbs were compounded using pure water obtained from a Milli-Q unit (Millipore, Milford, MA) or physiological saline solutions (NaCl 0.9 %), following therapeutic concentrations ranging from 0.5 to 1.5 mg/mL.

2.2. Apparatus and Material

The experiments were performed on the Maurice instrument from ProteinSimple, a Bio-Techne brand (San Jose, USA). Data was acquired using the Compass for iCE software (v 2.2.0, San Jose, USA). The icIEF cartridges contain a fluorocarbon (FC) coated capillary with an effective capillary length of 5 cm and 100 μm internal diameter. Imaged detection with native fluorescence was used with 10 seconds of exposure ($\lambda_{\text{excitation}}$: 280 nm, $\lambda_{\text{emission}}$: 320–450 nm).

2.3. Methods

2.3.1. icIEF analysis : sample preparation and icIEF conditions

The mAbs samples solution contained 0.15 mg/mL mAbs, 0.30% methylcellulose, 2% of each pharmalytes (5-8, 8–10.5), *pI* markers (7.05 and 9.99), 1% TEMED 2% Serine and 2M urea.

The cooling block was set at 4°C. Method development was conducted according to the ProteinSimple cIEF Method Development Guide (046–296, Rev A 2016). Samples were loaded for 55 s and focused at 1.5 kV for 1 min and 30 kV for 12 min. The mAbs chosen were representative of mAbs variety in terms of *pI* as well as generation, biological targets, and formulations were selected (**Table 1**). The electropherograms obtained by imaged cIEF plot intensities against pixels (due to the "imaged" technology involving a camera for detection), and specific *pI* markers are required to convert pixels into *pI*.

Table 1: Monoclonal antibodies employed to build and validate the predictive model

Monoclonal antibodies	mAbs origins	Type	pI	Molecular weight (kDa)
<i>Infliximab (influx)</i>	<i>Chimeric</i>	<i>IgG1</i>	<i>7.6</i>	<i>144</i>
<i>Nivolumab (Nivo)</i>	<i>Fully humanized</i>	<i>IgG4</i>	<i>8.0</i>	<i>144</i>
<i>Adalimumab (Ada)</i>	<i>Fully humanized</i>	<i>IgG1</i>	<i>8.9</i>	<i>144</i>
<i>Pertuzumab (Pertu)</i>	<i>Humanized</i>	<i>IgG1</i>	<i>9.0</i>	<i>148</i>
<i>Natalizumab (Nata)</i>	<i>Humanized</i>	<i>IgG4</i>	<i>8.9</i>	<i>149</i>
<i>Rituximab (Ritux)</i>	<i>Chimeric</i>	<i>IgG1</i>	<i>9.9</i>	<i>144</i>

2.3.2. Data handling and multivariate analysis

Data handling and multivariate analyses were processed with XLStat Software (V.2021.4, Addinsoft™, France).

2.3.2.1. Data collection and pre-processing method (alignment, scaling, and centering)

A total of 234 samples were analyzed by icIEF generating 234 electropherograms. Variabilities (i.e. 6 cartridges, 25 days, 58 sample preparations, 2 batches), were introduced in the sample preparation to mimic hospital conditions as much as possible. Samples were randomly divided into two sets, namely the training set (n = 138) and the test set (n = 95), as shown in **Table 2**. Data pre-processing is essential in data modelling to eliminate undesired variations (such as instrument artifacts) and highlight variations of interest. Changing data attributes via data pre-treatment may improve the results of the clustering algorithm. In this study, groups are characterized by different mAbs (i.e., one given mAb constitutes its own class), individuals are defined by icIEF injections, and peak heights are used as variables. First, signal intensities versus *pI* from electropherograms were extracted and aligned on the major peak. This step is necessary to perform appropriate comparisons between profiles and to reduce errors from icIEF focalization (due to pipetting or experimental errors). Following alignment, only a subset of electropherograms was considered for the studies to reduce the number of variables and focus only on important ones (variables belonging to the antibody profiles excluding spikes and markers). These precise electropherogram windows were arbitrarily chosen to keep the same number of variables for every observation. Finally, scaling processes were used to correct systematic variation in peak

height between samples and emphasize antibody features. Centering and scaling are the two most important processes in building smaller clusters. VAST (VARIABLE STABILITY) scaling was selected to scale individuals. This normalization allows us to work at different concentrations and reduce variations between individuals that belong to the same class (intra-mAb variation). This approach uses standard deviation and coefficient of variation (cv) as scaling factors, focusing on stable variables with minimal fluctuations. As described by Robert A Van Den Berg and colleagues, the cv application increases the value of the smallest peak height while decreasing the importance of the highest peak height [26]. Thus, VAST scaling operates in two sequential steps where mean centering is first applied, and then scaling by cv (i.e., 1/cv) is performed with x_{ij} related to the peak area ratio for one injection at a given pI ; \bar{x}_i the mean (1) and s_i the standard deviation (2) of calculated values for one injection. The coefficient of variation is obtained from the following relation $cv = \frac{s_i}{\bar{x}_i}$, and $\overline{x_{ij}}$ the calculated centered and normalized value of x_{ij} (3) by VAST strategy:

$$(1) \bar{x}_i = \frac{1}{j} \sum_{j=1}^l x_{ij}$$

$$(2) s_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^l (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{j-1}}$$

$$(3) \overline{x_{ij}} = \frac{(x_{ij} - \bar{x}_i)}{s_i} \cdot \frac{\bar{x}_i}{s_i}$$

After these three steps of alignment, subset selections, and scaling, signals are used as a normalized fingerprint to describe antibodies (**Figure 1**).

Table 2: Dataset descriptions used for PLS-DA optimization and validation.

Data set	Purpose	Number of samples	Antibodies (number of individuals)
<i>Training</i>	<i>Model feature, Cross-validation</i>	138	Nivolumab (34), Adalimumab (43), Pertuzumab (37), Infliximab (24)
<i>Testing</i>	<i>Model testing (blind test)</i>	95	Nivolumab (3), Adalimumab (10), Pertuzumab (6), Infliximab (4), Natalizumab (41), Rituximab (31)

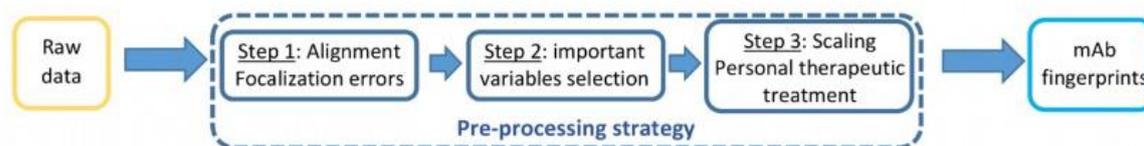


Figure 1: Schematic flow of the computational steps for data pre-processing

2.3.2.2. Principal component analysis

Principal component analysis (PCA) was first conducted on the icIEF database after the pre-processing step. We put our effort to explain variation between individuals while using the smallest number of components. Data from the training set were used for statistical study only after the pre-treatment procedure described in 2.3.2.a. PCA was used on the data obtained to evaluate its potential ability to discriminate mAbs [27]. Loading vectors and scores characterizing the principal components (PCs) provide qualitative and quantitative information about the mAbs, respectively.

2.3.2.3. PLS-DA modeling

As a second statistical approach, PLS-DA was employed as a robust supervised method in addition to PCA to provide predictive and descriptive modelling results. The two data sets, namely the training set and the testing set (**Table 2**), were used to build and validate the PLS-DA model respectively [28]. The procedure was as follows: The training electropherograms were classified into subgroups of mAbs-dependent quantitative variables (response variables-Y). Then, independent qualitative and quantitative explanatory variables were introduced (predictor variable-X). Quantitative descriptors relate to treated signal and *pl*, qualitative descriptors to cartridges, dates of analysis, and mAbs origins (**Table 1**). The optimal model was validated using k-fold cross-validation ($k = 7$) on the training set. The training set was separated into seven subgroups of 22 individuals to undertake such validation. The testing set serves as the final validation of the model, offering an unbiased evaluation of a final model fit on the training dataset. Individuals from the four previous mAbs (Infliximab, Pertuzumab, Nivolumab, and Adalimumab) not used in training sets were included in the testing set, as well as the two new mAbs (Natalizumab, Rituximab). These last two were used as true negatives to validate the model.

2.3.2.4. Evaluation of model performances and classification modeling

The initial part of the validations consists of k-fold Cross Validation (CV) done directly on the data training set, as described in section 2.3.2.b. To accomplish a quantitative validation, typical parameters such as the Root Mean Square Error (RMSE), R^2 , and the Q^2 index, which describes the predictive power of the models, were employed to assess the best PLS-DA model. For prediction purposes, decision rules must first be defined to include or exclude individuals in clusters. A binary prediction is the most straightforward technique when creating an actual classification model. However, a simple prediction from the fitted model doesn't yield integers numbers but values

between 0 and 1. Indeed each new sample is reduced to the predicted value according to the PLS model; its position is described by a score between 0 and 1[11]. Ideally, the score is equal to 1 for samples belonging to a correct class or 0 if not. Consequently, a threshold between 0 and 1 is a straightforward technique to provide binary answers from the model. A cut-off value was arbitrarily selected to include or exclude samples from a cluster. This criterion was set to exclude actual negative or positive samples with more certainty (**Figure 2**).

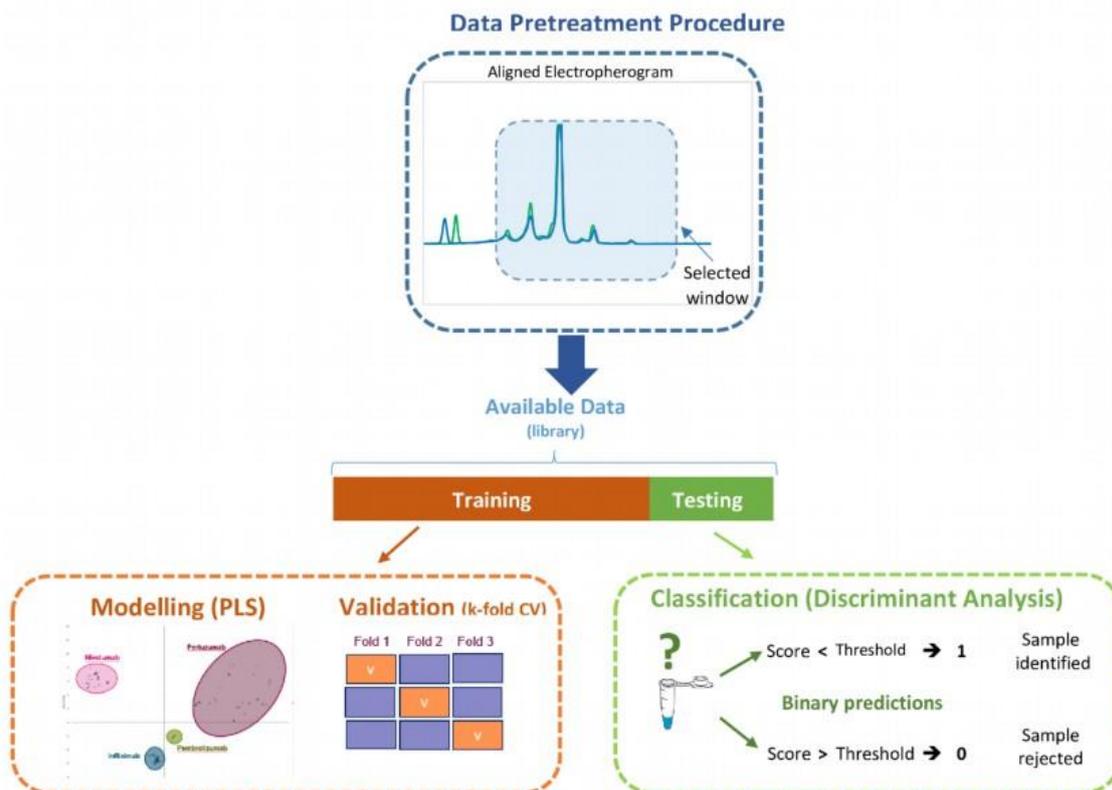


Figure 2: General workflow: from mAbs icIEF analysis to modelling and statistical evaluation

The second step of the validation model is to determine qualitative performance parameters. The testing data set was used to calculate false positives (FPR) and false negatives (FNR) rates after predicting which cluster individuals were assigned.

$$FPR = \frac{FP}{FP + TN}$$

$$FNR = \frac{FN}{FN + TP}$$

This allows us to calculate the specificity (SP) and sensitivity (ST). Then, SP and ST were computed using the following equations:

$$SP = \frac{TN}{TN + FP}$$

$$ST = \frac{TP}{TP + FN}$$

Where TP and TN represent the number of true positives and true negatives, and FP and FN are, respectively, False Positive and False Negatives. These criteria describe the accuracy of the sample assignment to a given class for mAb identification. A suitable class attribution should result in $SP = 1.0$ and $ST = 1.0$.

3. Results and Discussion

3.1. Development of the icIEF: method

The first part of this study aimed at developing a reliable and generic icIEF method to analyze a wide range of therapeutic mAbs, considering that for one mAb, the pI of charge variants may range from 5 to 10.5. Monoclonal antibodies representative of mAbs variety in terms of pI, biological targets, and formulations, were selected (**Table 1**). Infliximab (pI 7.6, chimeric, IgG1) and Adalimumab (pI 8.9, complete human, IgG4), exhibit similar biological activities (both directed against TNF- α). Nivolumab (pI 8.0) and Pertuzumab (pI 9.0) are complete human (IgG4) and humanized (IgG1) mAbs respectively. We focused mainly on the ampholyte ranges, concentrations, and the use of blocking agents to fine-tune the pH gradient and avoid variants loss during the focalization.

3.1.1. Pharmalytes composition and concentration

pI of monoclonal antibodies typically ranges from 6.0 to 9.5 [14]. Therefore, to allow the separation of most charge variants, a broad range of Pharmalytes (e.g., pH 3-10) is commonly used, and a narrow range is added to increase the resolution between charge variants [29]. A combination of Pharmalytes 5-8 and 8-10.5 was chosen, and their relative proportion (from 1:5 to 5:1) was investigated. The results showed that for the most acidic mAbs, such as Infliximab, and the most basic ones, like Pertuzumab, a 1:1 ratio and a total concentration of ampholytes of 4% gives the highest resolution and allow the identification of more charge variants. The pI values of the mAbs could be estimated thanks to the addition of two pI makers (1% total mix). These values were consistent with those measured in the previous study and with theoretical calculations [14]. Despite the combination of these two Pharmalyte ranges, which generate discontinuous repartition of amphoteric species around pI 8, electropherograms were shown to be reproducible between different days (20 days in total) and cartridges (4). The reproducibility was evaluated by measuring the entire area, including the main peak, basic and acidic species of each isoform. The RSDs obtained (< 5% for Infliximab, <6% Nivolumab, <10% Pertuzumab, <7% Adalimumab) were acceptable considering mAbs' complexity.

3.1.2. Selection of blocking agents

In icIEF, the whole capillary is imaged, and the variants must be focused in the desired region. In addition, a loss of basic and acidic carrier ampholytes (cathodic or anodic drift) could occur during the focalisation process leading to a lack of repeatability/reproducibility. This is why the addition of a sacrificial zone at both ends of the capillary (anode and cathode) was considered to prevent charge variants from drifting outside the focusing window. For this purpose TEMED, a strong base, and Serine-D, an acidic modifier (pI of 5.5), were used as cathodic and anodic blockers respectively (Deepa Moran 2002). Their concentration varied between 0 and 5%. **Figure 3** shows that when the amount of TEMED or D-serine increased, the migration time was reduced (the electropherogram shifted to the right for D-Serine and to the left for TEMED), demonstrating their efficiency as blocking agents.[30] Finally, D-serine and TEMED were added to the separation mix at 2.4 % and 1.2%, respectively, to prevent peak loss, and maintain the variants in the detection zone while maintaining a good resolution.

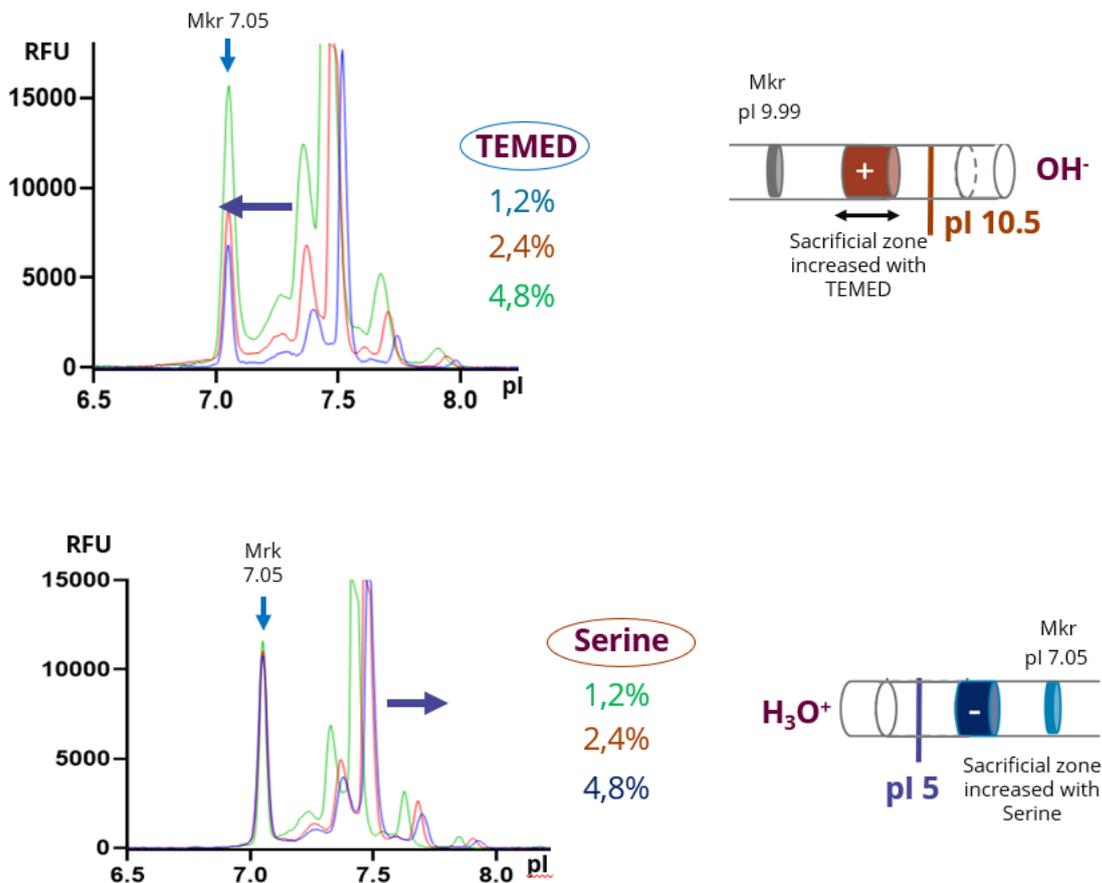


Figure 3: separation profiles of Infliximab (1.0 mg/mL), **(A)** Serine (1.2%), TEMED (1,2; 2,4; 4,8 %), **(B)** TEMED (1.2%), Serine (1,2; 2,4; 4,8 %). icIEF conditions: 12 min at 30kV, pharmalytes 2% (5-8, 8-10.5), detection $\lambda_{\text{excitation}}$: 280 nm, $\lambda_{\text{emission}}$: 320-450 nm).

3.2. Preprocessing of mAbs icIEF analysis

The specific electrophoretic profile obtained for each monoclonal antibody could serve as a fingerprint for their unambiguous identification through an additional data treatment and PLS-DA analysis. For this purpose, the data was extracted from the electropherograms and submitted to a pre-processing procedure. PCA was then used to analyze the pre-processed data as an exploratory method; (i) to evaluate the impact of concentration and excipients variations on PCA projections, (ii) to assess the performances of the pre-processing method. This pre-processed data evaluation by PCA analysis is of paramount importance for the development of the PLS-DA model for mAbs discrimination.

3.2.1. Pre-processing method

The data processing was designed to extract relevant data from the electropherograms (mAb icIEF profiles), independently of pI scaling (x-scaling/abscissa from the electropherogram). As a result, an arbitrary scaling for the x-axis was created, where each point is separated by one unit (intensity values of electropherograms). A manual alignment of the profiles was performed by using the main peak as the reference point. The purpose is to develop a processing approach uncorrelated to mAbs pI, thus reducing the impact of the formulation or the concentration. And as opposed to conventional calculation where a pI re-calibration is required, no pI markers are needed for this approach (see Figure 1, first step).

3.2.2. Impact of excipients

To evaluate the impact of excipients on PCA analysis, Infliximab (1mg/mL) samples were reconstituted in ultrapure water or Polysorbate 80 (PS 80) (1% and 5%). Polysorbate 80 (PS80) was chosen since it is widely used in protein formulation to avoid self-aggregation and is found in all formulated mAbs. Higher concentrations of PS 80 were selected compared to those traditionally used in hospital (0.1 to 2%) to verify its lack of impact in mAbs discrimination. icIEF profiles of infliximab (ultrapure water, PS 80 1%, PS 80 5%) and Nivolumab (1 mg/mL in Milli-Q water) were then pre-processed and submitted to PCA analysis. Nivolumab (1mg/mL) was used as a reference to highlight the discrimination between Infliximab and Nivolumab and decrease variations between the different types of reconstituted Infliximab. We can observe from **Figure 4** that when Infliximab is formulated in PS80, a shift of the icIEF profile is observed compared to Infliximab reconstituted in ultrapure water. However, when the electropherograms obtained from Infliximab (ultrapure and PS 80) and Nivolumab were pre-processed, and the data was submitted to PCA analysis [31], the results obtained showed that all the infliximab samples (PS80 and pure water) were randomly located in the same cluster, whereas Nivolumab samples form another cluster (Figure 5). This demonstrates that the developed pre-processing method performed before PCA analysis avoids interferences generated by the addition of PS 80 such as pI variation. We can also state that PS80 at the concentration currently employed will have no impact on mAbs discrimination following this icIEF-PCA analysis. The same

approach was followed with Infliximab samples reconstituted with NaCl 0.9% (physiological concentration and pH). **Figure 5** clearly shows that Infliximab samples formulated with NaCl are also located in the same Infliximab cluster, demonstrating that the impact of NaCl 0.9% on PCA projections can be suppressed. The same experiment has been performed with phosphate buffers and we demonstrated its lack of impact in mAbs discrimination (data not shown). Consequently, mAbs identification via cluster attribution is possible despite possible variations in the composition of the formulated product.

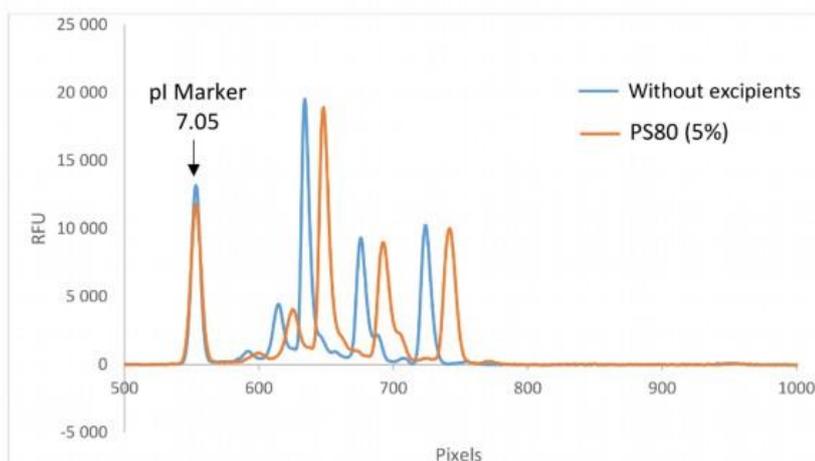


Figure 4: separation profiles of Infliximab (1.0 mg/mL), without excipients and formulated with PS80 5%. Peaks were aligned on peptide marker pI 7.05. Experimental conditions as mentioned in **Fig.3**.

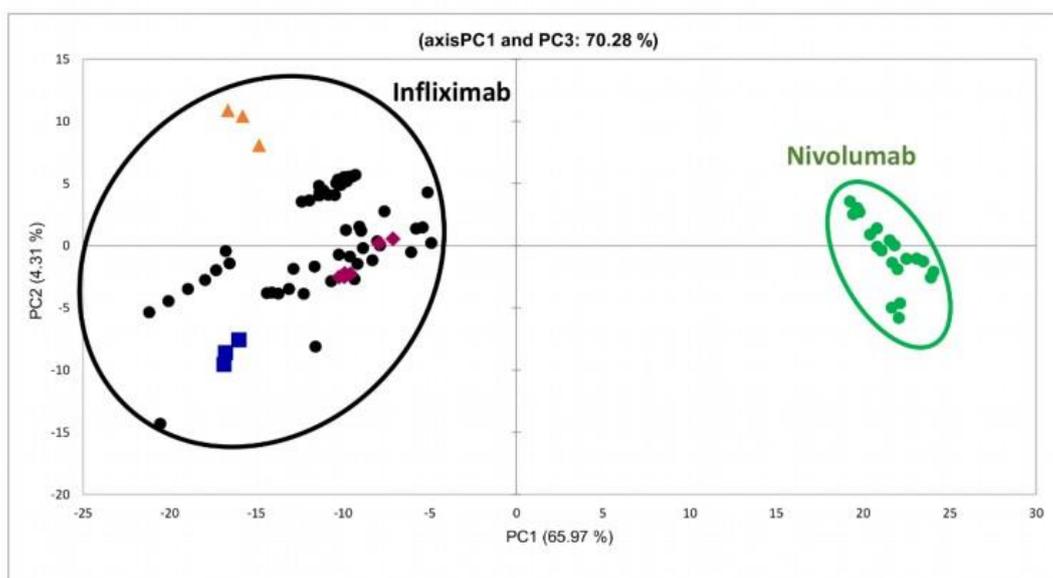


Figure 5: Impact of excipients: PCA score plot: Infliximab reconstituted in ultra-pure water (●), Infliximab formulated with PS80 5% (▲), Infliximab formulated with PS80 1% (■) or NaCl 0.9% (◆), Nivolumab (●) as reference. The symbol (%) expresses the contribution of each PC, and the (PC1, PC2) score is 70.28 %.

3.2.3. Impact of mAbs concentration

The data processing method built also needs to consider the specificities of each patient's treatment, such as doses [32]. Therefore, the procedure described in the

previous chapter (pre-processing and PCA projections) was applied to evaluate the impact of mAbs concentration. Three concentrations (0.5, 1.0, 1.5 mg/mL) of Infliximab were compared to one concentration of Nivolumab (1mg/mL) to highlight discrimination between Infliximab and Nivolumab rather than variations between Infliximab at different concentrations. Considering that these two mAbs (Infliximab and Nivolumab) could be administered intravenously, concentrations at mg/mL level were chosen. The data pre-processing was associated with a normalization step by VAST scaling to prevent the impact of the concentration on peak intensities. PCA score plots revealed two distinct clusters of individuals: one for three concentrations of Infliximab and one for the Nivolumab (**Figure 6**). Individuals corresponding to the three concentrations of infliximab are randomly distributed in the same cluster without any relation to the concentrations. This result highlights the ability of PCA to discriminate individuals from Infliximab or Nivolumab, whatever the concentration of infliximab, with a score of 71% for the first two principal components (PC1, PC2).

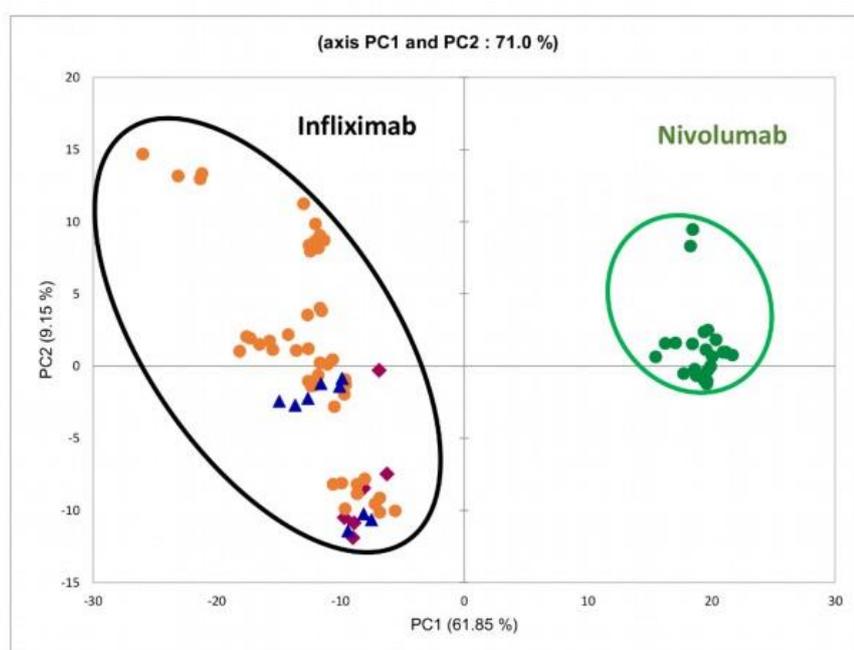


Figure 6 : Impact of mAbs concentration: PCA score plot of Infliximab at different concentrations (0.5 mg/mL as (▲), 1.0 mg/mL (●), 1.5 mg/mL (◆) and Nivolumab (●) as a reference at 1.0mg/mL. PC1- PC2 score plot is 71.0%.

3.3. mAbs identification modeling

This work aimed at building a PLS-DA model suitable for quality control that could easily identify mAbs-based treatments. Four mAbs (Infliximab, Nivolumab, Pertuzumab, and Adalimumab) were first investigated to evaluate the ability of this model to discriminate them. In the first step, PCA was used as an exploratory method to evaluate the performance of processing methods for mAb discriminations. Then, the relevance of the PLS-DA model for mAbs discrimination was evaluated using cross-validation and prediction tests.

3.3.1. PCA overview for mAbs identification

A principal component analysis (PCA) was performed on 234 icIEF electropherograms of four commercialized mAbs to provide an overview of the possible separation of individuals. The 234 electropherograms are provided by analyzing four mAbs prepared at different days, from various batches, and analyzed with different icIEF cartridges. The four mAbs chosen were Infliximab, Nivolumab, Pertuzumab, and Adalimumab at 1 mg/mL, compounded in Milli-Q water. As described in the previous chapter, mAbs icIEF profiles were submitted to data processing and compared using PCA. A satisfactory score plot of 76.9% for the first two components was obtained as depicted Figure 7. Four clusters were formed, corresponding to each mAb, allowing their identification irrespective of the experimental conditions (days, cartridges, hospital environment, batches, formulation, and concentration). PC1 accounts for 68.13% of the variance explained, indicating that data are mainly divided along this axis. The axis maintained the same score by increasing the number of individuals, and the cluster remained highly differentiated, demonstrating that the measurements were reproducible. This multivariate approach provides an unsupervised and early assessment of the potential of the icIEF-chemometrics association.

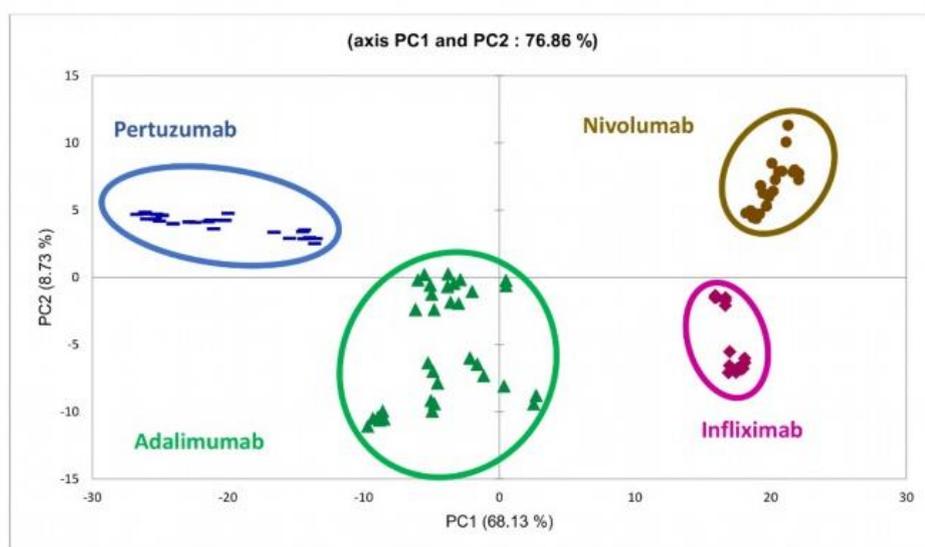


Figure 7: PCA score plot of icIEF profiles after preprocessing (133 mAbs sample) of the four antibodies used for modeling at 1mg/mL: Infliximab (◆), Nivolumab (●), Adalimumab (▲) and Pertuzumab (-). The symbol (%) expresses the contribution of each PC, and the (PC1, PC2) score is 76.88 %.

3.3.2. PLS-DA model performances/ Qualitative validation

PLS-DA was then used as a strong supervised method to provide descriptive and predictive modelling results based on training and testing sets (**Table 2**). Firstly, the training set, including the four therapeutic mAbs (Infliximab, Nivolumab, Pertuzumab, and Adalimumab), was subjected to supervised PLS-DA analysis. Results showed that four clusters related to the four mAbs were formed with a score of 97.6% using only 5

Latent Variables (LV), defined as reduced and unobservable variables that describe the model. To validate this model based on the four clusters, k-fold cross-validation was performed by dividing the training set into 7 sub-groups of 22 individuals sampled randomly. As described in [18], a 7-fold CV appeared to be a favorable k-fold, which could be considered as a good compromise between 5- and 10-fold, limiting bias and reducing variance between individuals. As a result, the confusion matrix (**Table 3**) was thoroughly investigated, and no incorrect attribution of individuals to the cluster was found. Cross-validation (CV) performance was evaluated; the CV-RMSE was 0.136, and the CV-R² was 0.988 (**Table 4**). Secondly, prediction tests were performed as blind tests to confirm correct class attribution for samples from a database that was not used for modelling (testing set). The testing set was performed with the four mAbs previously evaluated (Infliximab, Nivolumab, Pertuzumab, and Adalimumab) and two additional mAbs (Rituximab and Natalizumab). We have chosen Natalizumab, to ensure that our model is able to discriminate two humanized mAbs (i.e. Pertuzumab and natalizumab) and rituximab to evaluate the discrimination between two chimeric mAbs (i.e. Infliximab, and Rituximab). The model's ability to accept or reject mAbs as "known" (Infliximab, Nivolumab, Pertuzumab, and Adalimumab) or "unknown" (Rituximab and Natalizumab) (**Figure 2**) was also evaluated. To identify individuals, samples were assigned to a class (each mAb representing one class) with the highest function of classification score in a prediction test. The score values were around 1 if the prediction corresponded to the class of interest and 0 if not. The best scores are usually higher than 1, and the lowest is less than 0. A threshold T was determined only for the highest score to avoid misclassification of an "unknown" sample and to ensure that an analyzed sample belongs to the correct class. As a result, an interval centered on 1 was computed, and a range of $1 \pm T$ was determined. If the individual's highest score is in the range for a specific class, the prediction is correct, and the sample will be identified as the correct class of mAb. When the highest score for a specific class is outside this range, the individual will not be recognized as belonging to that class. If an individual does not correspond to any class (they are outside the range for each specific class), the individual is listed as "unknown." No incorrect predictions were obtained on our testing set. Each individual from "known" mAbs (Infliximab, Nivolumab, Pertuzumab, and Adalimumab) was successfully identified, whereas "unknown" mAbs (Rituximab and Natalizumab) were all rejected. The t₁-t₂ plot of the X-scores of the PLS-DA prediction with the testing set in **Figure 8** showed the expected correct attribution of individuals from "known" mAbs. Two additional clusters were formed corresponding to Rituximab, Natalizumab, "unknown" mAbs without overlap. This demonstrates that the model can accurately assign individuals to the appropriate cluster and create new clusters for individuals that have not been classified. This significant result shows that the model can be extended to other treatments not included in the initial data set (training set). This threshold has been estimated by using PLS regression.[10][11] Finally, a threshold of 0.23 produced the best results, resulting in 100% sensitivity and 100% specificity.

To conclude on the model's performance, qualitative parameters were examined. R²Y was found to be 0.988, and Q² validated the model's quality with a satisfying result of

0.976 (**Table 4**). These results confirm the reliability of the PLS-DA models rendering possible mAbs identification at any concentration, whatever their formulation.

Table 3: Matrix of confusion of the testing set after preprocessing steps on the four mAbs.

From \ To	Ada	Inflix	Nivo	Pertu	Total	% correct
Ada	10	0	0	0	10	100,00%
Inflix	0	4	0	0	4	100,00%
Nivo	0	0	3	0	3	100,00%
Pertu	0	0	0	6	6	100,00%
Total	10	4	3	6	23	100,00%

Table 4: Precision parameters of cross-validation and Prediction in PLS-DA for mAb's identification.

N	LV	k-CV	CV-R ²	CV-RMSE	R ² Y	Q ²
234	5	7	0.988	0.136	0.988	0.976

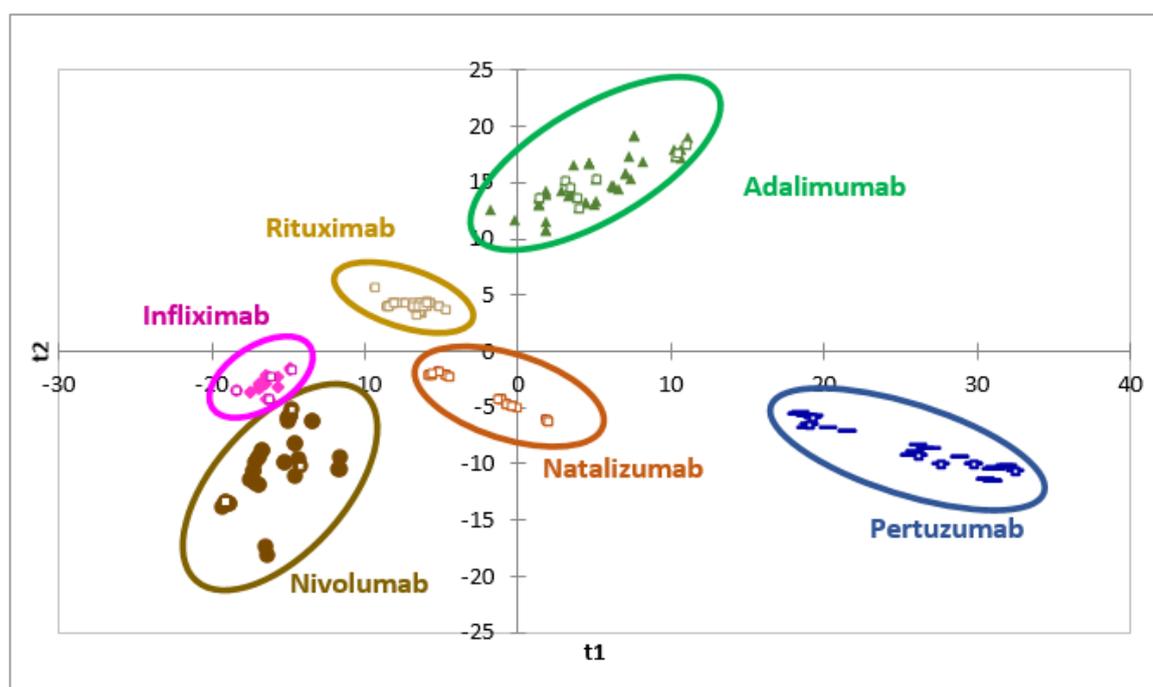


Figure 8: PLS-DA scores t1 and t2 of icIEF profiles after pretreatment procedure (234 mAbs). From the training set, Infliximab (◆), Nivolumab (●), Adalimumab (▲) and Pertuzumab (-). From the prediction set; Infliximab (◊), Nivolumab (○), Adalimumab (◉) and Pertuzumab (◌). The two “unknown” mAbs, Rituximab (◐) and Natalizumab (◑).

4. Concluding remarks

In this work, we first created a general icIEF approach for mAbs with pIs ranging from 7 to 9 and concentrations varying from 0.5 mg/mL to 1.5 mg/mL. We established for the first time the ability of an icIEF-chemometrics method to discriminate four therapeutical mAbs unbiased by their intrinsic properties (generation, pI, and targets...) or any interferences generated by their formulation. PLS-DA model based on pre-processed electropherograms is able to effectively attribute samples to the correct mAb cluster without any concentration or excipient effects. This allows accurate identification of different mAbs. The model also rejected "unknown" mAbs and created a new cluster, allowing the database to expand and include additional treatments (mAbs). The models' prediction performance is appropriate for routine QC at the hospital. Such analytical approach, supplemented by icIEF-PCA analysis, is particularly promising in a clinical environment where the establishment of rapid quality controls before patient administration is of paramount importance.

Acknowledgment

We thank the Ecole doctorale "Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes," Paris-Saclay University which provided the financial support of Cecile Tardif as a fellowship. Bio-Techne supported this project as a partner. Bio-Techne kindly donated instruments and consumables.

References

- [1] H. Kaplon *et al.*, "Antibodies to watch in 2023 ABSTRACT," *MABs*, vol. 15, no. 1, 2023, doi: 10.1080/19420862.2022.2153410.
- [2] S. Berdot, F. Gillaizeau, T. Caruba, P. Prognon, P. Durieux, and B. Sabatier, "Drug Administration Errors in Hospital Inpatients: A Systematic Review," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068856.
- [3] M. Floutier, "Contrôle vidéo des préparations de chimiothérapie par le dispositif Drugcam ® : analyse rétrospective sur trois ans à l' Institut Paoli-Calmettes , centre régional de lutte contre le cancer de Marseille," 2020.
- [4] J. Kahle, H. Zagst, R. Wiesner, and H. Wätzig, "Comparative charge-based separation study with various capillary electrophoresis (CE) modes and cation exchange chromatography (CEX) for the analysis of monoclonal antibodies," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 174, pp. 460–470, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.058.
- [5] D. Ruiz-Perez, H. Guan, P. Madhivanan, K. Mathee, and G. Narasimhan, "So you think you can PLS-DA?," *BMC Bioinformatics*, vol. 21, 2020, doi: 10.1186/s12859-019-3310-7.
- [6] D. Ballabio and V. Consonni, "Classification tools in chemistry. Part 1: linear

- models. PLS-DA," *Anal. Methods*, vol. 5, pp. 3790–3798, 2013, doi: 10.1039/c3ay40582f.
- [7] M. Saikat, Y. Jun, S. Maitra, and J. Yan, "Principle Component Analysis and Partial Least Squares: Two Dimension Reduction Techniques for Regression," *Casualty Actuar. Soc.*, pp. 79–90, 2008.
- [8] J. W. McIlroy, R. W. Smith, and V. L. McGuffin, "Assessing the effect of data pretreatment procedures for principal components analysis of chromatographic data," *Forensic Sci. Int.*, vol. 257, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1016/j.forsciint.2015.07.038.
- [9] E. Szymańska, E. Saccenti, A. K. Smilde, and J. A. Westerhuis, "Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies," *Metabolomics*, vol. 8, pp. 3–16, 2012, doi: 10.1007/s11306-011-0330-3.
- [10] E. Trullols, I. Ruisánchez, F. X. Rius, and J. Huguet, "Validation of qualitative methods of analysis that use control samples," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 24, no. 6, pp. 516–524, 2005, doi: 10.1016/j.trac.2005.04.001.
- [11] L. C. Preda Christian, Saporta Gilbert, "PLS classification function," *Computational Statistics*, vol. 22, no. 2, pp. 223–235, 2007, doi: 10.1007/s00180-007-0041-4.
- [12] and H. L. L. Dawn M Ecker, Susan Dana Jones, "The therapeutic monoclonal antibody market," *MAbs*, vol. 1, pp. 9–14, 2015, doi: 10.1172/JCI1103931.
- [13] H.-J. L. & H.-C. W. Ruei-Min Lu, Yu-Chyi Hwang, I-Ju Liu, Chi-Chiu Lee, Han-Zen Tsai, "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases," *J. Biomed. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–30, 2020, doi: 10.1186/s43556-022-00098-9.
- [14] H. Kaplon and J. M. Reichert, "Antibodies to watch in 2021," *MAbs*, vol. 13, no. 1, 2021, doi: 10.1080/19420862.2020.1860476.
- [15] N. Alt *et al.*, "Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles," *Biologicals*, vol. 44, no. 5, pp. 291–305, 2016, doi: 10.1016/j.biologicals.2016.06.005.
- [16] S. K. Singh, G. Narula, and A. S. Rathore, "Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes?," *Electrophoresis*, vol. 37, no. 17–18, pp. 2338–2346, 2016, doi: 10.1002/elps.201600078.
- [17] M. Yüce *et al.*, "Fractionated charge variants of biosimilars: A review of separation methods, structural and functional analysis," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1152, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.12.064.
- [18] S. Fekete, D. Guillarme, P. Sandra, and K. Sandra, "Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 1, pp.

480–507, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b04561.

- [19] D. R. Stoll *et al.*, "Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 16, pp. 8307–8315, 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b01578.
- [20] L. Verscheure, A. Cerdobbel, P. Sandra, F. Lynen, and K. Sandra, "Monoclonal antibody charge variant characterization by fully automated four-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1653, p. 462409, 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462409.
- [21] E. Jaccoulet, C. Smadja, and M. Taverna, "Quality control of therapeutic monoclonal antibodies at the hospital after their compounding and before their administration to patients," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1466, pp. 179–184, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-4014-1_14.
- [22] A. Goyon *et al.*, "Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1065–1066, no. September, pp. 119–128, 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.09.033.
- [23] O. Salas-Solano *et al.*, "Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: An interlaboratory study," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3124–3129, 2012, doi: 10.1002/jssc.201200633.
- [24] R. G. Brereton and G. R. Lloyd, "Partial least squares discriminant analysis: Taking the magic away," *J. Chemom.*, vol. 28, no. 4, pp. 213–225, 2014, doi: 10.1002/cem.2609.
- [25] E. Jaccoulet, J. Boccard, M. Taverna, A. S. Azevedos, S. Rudaz, and C. Smadja, "High-throughput identification of monoclonal antibodies after compounding by UV spectroscopy coupled to chemometrics analysis," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 21, pp. 5915–5924, 2016, doi: 10.1007/s00216-016-9708-4.
- [26] R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, and M. J. van der Werf, "Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data," *BMC Genomics*, vol. 7, pp. 1–15, 2006, doi: 10.1186/1471-2164-7-142.
- [27] E. Adams, R. De Maesschalck, B. De Spiegeleer, Y. Vander Heyden, J. Smeyers-Verbeke, and D. L. Massart, "Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis," *Int. J. Pharm.*, vol. 212, no. 1, pp. 41–53, 2001, doi: 10.1016/S0378-5173(00)00581-0.
- [28] L. C. Lee, C. Y. Liong, and A. A. Jemain, "Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: A review of

- contemporary practice strategies and knowledge gaps," *Analyst*, vol. 143, no. 15, pp. 3526–3539, 2018, doi: 10.1039/c8an00599k.
- [29] I. D. Cruzado-Park, "Optimization of an IgG1 CIEF separation by using narrow-range ampholytes and DMSO as protein solubilizer," *Electrophoresis*, vol. 41, no. 15, pp. 1308–1315, 2020, doi: 10.1002/elps.201900449.
- [30] D. Mohan and C. S. Lee, "Extension of separation range in capillary isoelectric focusing for resolving highly basic biomolecules," *J. Chromatogr. A*, vol. 979, no. 1–2, pp. 271–276, 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(02)01442-5.
- [31] S. M. Singh, S. Bandi, D. N. M. Jones, and K. M. G. Mallela, *Effect of Polysorbate 20 and Polysorbate 80 on the Higher-Order Structure of a Monoclonal Antibody and Its Fab and Fc Fragments Probed Using 2D Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 106, no. 12. American Pharmacists Association, 2017.
- [32] A. Di Paolo and G. Luci, "Personalized Medicine of Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: Pharmacogenetics, Therapeutic Drug Monitoring, and Beyond," *Front. Pharmacol.*, vol. 11, no. February, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fphar.2020.610806.
- [33] H. I. Okur *et al.*, "Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions," *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, no. 9, pp. 1997–2014, 2017, doi: 10.1021/acs.jpccb.6b10797.

3. AUTRES APPLICATIONS : ÉTUDE DE L'IMPACT DES DIFFERENCES DE LOTS ET DE L'INFLUENCE DE LA FORMULATION

4.3.1 Étude de lots

Nous avons utilisé la méthode développée précédemment pour étudier l'impact des différences de lots et de formulations. Différents échantillons ont donc été analysés par icIEF, puis les électrophéogrammes résultants ont été utilisés pour alimenter les bases de données.

En effet, lors de nos analyses, nous avons identifié, pour le Pembrolizumab, une différence importante entre deux lots. Ces deux lots proviennent du même fournisseur, mais sont destinés uniquement à l'usage de la recherche et n'ont donc pas passé toutes les étapes de contrôle qualité. De plus, ils sont tous les deux formulés dans du tampon phosphate salin (*phosphate buffered saline*, PBS) sans excipient pouvant stabiliser l'anticorps. Après avoir effectué le traitement de données décrit précédemment, les signaux ont été analysés par PCA. La **Figure 56** illustre ci-dessous la discrimination sur (PC1, PC3) de ces deux lots, avec un score pour les deux axes de 71.7%. (PC1, PC2) non représenté ici, une discrimination était présente, mais un recouvrement des deux zones ne permettait pas d'apprécier les différences entre les deux populations sur ces deux axes. Les échantillons présentent donc des hétérogénéités dans leurs variants de charges significatives du lot dont provient l'échantillon. Néanmoins, notre étude se limite à deux lots uniquement, cela est dû à la disponibilité parmi les anticorps à disposition.

Par ailleurs, ces différences étaient majeures pour ces deux lots de Pembrolizumab, d'autres AcM également formulés dans le PBS n'ont pas montré de différences de lots. On en déduit donc que la méthode permet de discriminer les écarts de certains lots (peut-être ayant subi des stress extérieurs) pour des anticorps donnés.

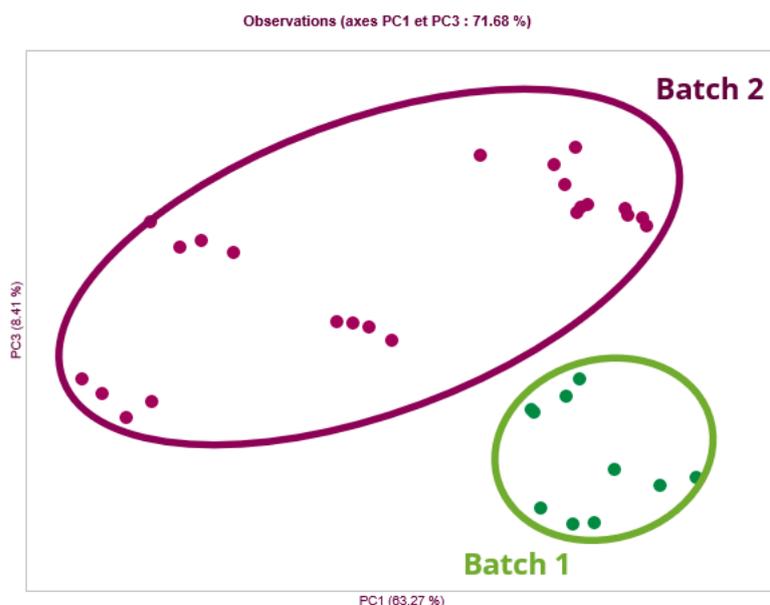


Figure 56 : Projection sur PC1 et PC3 des échantillons de Pembrolizumab de lots différents (notés *batch 1* et *batch 2*), les lots proviennent du même fournisseur, les anticorps sont formulés dans le PBS, l'utilisation est destinée exclusivement à la recherche. Les analyses ont été réalisées sur des jours différents aléatoirement, sur la même cartouche, concentrations identiques à 1.0 mg.mL⁻¹. Représentation comportant 40 individus.

4.3.2 Étude de l'influence de la formulation

Nous avons ensuite choisi d'étudier l'impact des formulations. Deux lots de Trastuzumab formulés (Chlorhydrate de L-histidine monohydraté, L-histidine, α -tréhalose dihydraté, Polysorbate 20 dans le cas de l'herceptin), destinés à l'administration à des patients, ont été comparés à deux lots destinés à la recherche (formulés dans le PBS) [166]. En appliquant la méthode développée précédemment, la projection sur les axes PC1 et PC2 est présentée **Figure 57**, un score de 94,8% a été obtenu. Deux nuages de points distincts ont été formés, un correspondant aux échantillons destinés aux hôpitaux et l'autre aux échantillons destinés à la recherche. De plus, cette projection a mis en évidence les hétérogénéités des échantillons destinés à la recherche en comparaison avec ceux destinés à un usage hospitalier. En effet, le nuage de points défini par les échantillons destinés à une administration hospitalière est beaucoup moins étendu et plus dense. Cette différence est très certainement liée à la formulation qui permet de stabiliser l'anticorps, et ainsi de garantir l'intégrité de ses variants de charges. À l'inverse, les échantillons destinés à la recherche sont uniquement formulés dans le PBS qui permet, par effet, de « salting-out » d'éviter les agrégats, mais ne prévient pas les modifications de variants de charges qui sont détectées en icIEF et mises en valeur par la PCA.

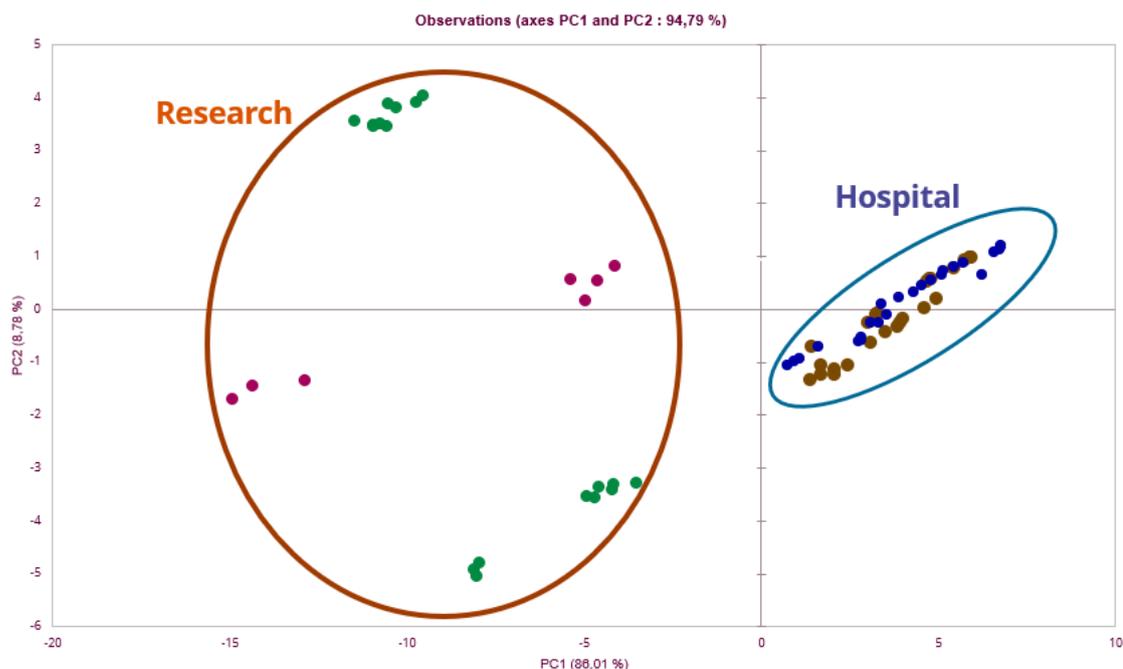


Figure 57 : Projection sur PC1 et PC2 des échantillons de Trastuzumab de formulations différentes, les lots utilisés à l'hôpital (formulation complète) sont nettement séparés des lots destinés à la recherche (formulés dans le PBS et beaucoup plus hétérogènes). Analyses réalisées le même jour, sur la même cartouche, avec les mêmes concentrations ajustées à l'eau milliQ (1.0 mg.mL^{-1}). 101 Individus.

Cette étude permet de constater des changements de répartitions des charges pour un même anticorps lorsque la formulation change. Cette étude a été réalisée sur différents lots.

Ainsi, nous avons montré que la méthode développée permet donc de mettre en évidence les écarts de formulation. Or, certains excipients contenus dans les formulations font l'objet de discussions concernant leurs capacités à stabiliser les protéines. C'est notamment le cas du Polysorbate 80 (PS80, Tween 80), il a notamment été montré que le PS80 provoque des changements significatifs des structures tertiaires sans nécessairement affecter les structures secondaires [319]. Néanmoins, un changement de structure tertiaire peut induire une répartition des charges différente, et donc des modifications des variants de charge pouvant être détectées en icIEF.

Pour étudier la capacité de la méthode icIEF-PCA à détecter les changements liés à l'utilisation de différents excipients, il a été choisi d'ajouter en excès du polysorbate (PS80) dans des échantillons d'Infliximab. Les concentrations choisies en PS80 sont largement au-dessus des concentrations utilisées dans les formulations, le but étant d'évaluer la capacité du modèle à discriminer des échantillons dont la composition a été modifiée lors d'une étude de stabilité. Dans le contexte de cette étude de stabilité, l'Infliximab a été stressé par différents moyens (UV, température et agitation) détaillés dans le **Chapitre VI**. Des échantillons d'Infliximab natifs (non stressés) sont comparés aux échantillons avec du PS80 et aux échantillons stressés. La **Figure 58** est la projection sur PC1 et PC2 de ces 143 échantillons. Un score acceptable de 72.2% est

obtenu pour cette projection. Les échantillons natifs forment un nuage de point bien défini tandis que les échantillons stressés sont répartis de manière hétérogène. Cette répartition sera discutée dans le chapitre suivant (**Chapitre VI**). Cependant, concernant l'ajout de PS80, bien que le nombre d'individus soit faible, il est important de constater que tout d'abord la PCA discrimine les échantillons contenant du PS80 des échantillons natifs, mais également que cette discrimination est d'autant plus importante que le pourcentage de PS80 est élevé. Plus ce pourcentage est élevé, plus les individus s'éloignent du nuage de points des échantillons natifs et se rapproche des échantillons stressés. Cela signifie que les variants de charges des échantillons contenant une forte concentration en PS80 présentent davantage de similitudes avec ceux des échantillons stressés que ceux des échantillons natifs. En tenant compte du nombre d'échantillons contenant du PS80, et du fait que le PS80 est en large excès par rapport aux utilisations standard, on ne peut pas affirmer que le PS80 nuit à la stabilité des anticorps. Néanmoins, il est possible de conclure sur le fait que le PS80 exerce une influence non négligeable sur les variants de charges et que la méthode icIEF-PCA permet de mettre en évidence les dérives de formulation.

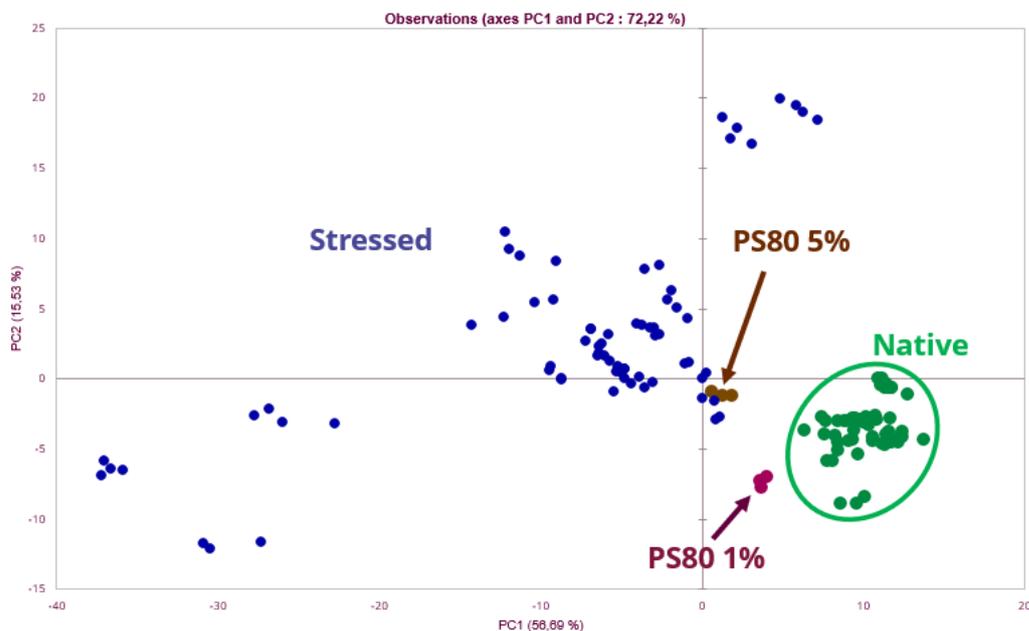


Figure 58 : Projection sur PC1 et PC2 des échantillons d'Infliximab, les échantillons de contrôle à l'état natif (vert), les échantillons natifs avec ajout de 1% PS80 (violet) et 5% de PS80 (marron), les échantillons stressés par différentes conditions (bleu). Analyses réalisées sur des jours différents aléatoirement, sur des cartouches différentes aléatoirement, avec une concentration de 1.0 mg.mL⁻¹. Représentation comportant 143 individus.

4. CONCLUSIONS CHAPITRE IV

La focalisation isoélectrique capillaire est une technique de choix en contrôle qualité pour sa facilité d'utilisation, sa rapidité en termes de préparation d'échantillon et de temps d'analyse, ainsi que sa robustesse. L'association de l'icIEF aux outils chimiométriques a permis de valoriser les résultats obtenus en icIEF, et de mettre en évidence les différences entre les échantillons d'Acms. En effet, cette combinaison inédite a permis de développer des modèles capables d'identifier ou de discriminer des Acms sans ambiguïté (en comparaison aux simples superpositions d'électrophérogrammes couramment utilisées). Dans ce chapitre, nous avons détaillé la méthode de prétraitement des électrophérogrammes permettant ensuite d'effectuer de l'analyse en composante principale pour évaluer des tendances ou de la régression des moindres carrés pour créer un modèle de prédiction. La méthode développée a ici été appliquée dans le contexte de contrôle qualité pour permettre la reconnaissance des médicaments à base d'anticorps et limiter les erreurs d'administration à l'hôpital. Cette méthode a également prouvé qu'elle pouvait être appliquée dans d'autres contextes tels que le contrôle des lots ou les déviations de formulation. Ces applications ont été réalisées sur des anticorps différents, de provenances différentes ou de formulations différentes. Dans le chapitre suivant, une autre application de l'icIEF associée à la PCA sera étudiée sur un même médicament afin d'évaluer les dégradations potentielles dues à l'environnement hospitalier.

Par ailleurs, dans l'état actuel, cette méthode est une preuve de concept pouvant être améliorée, tout d'abord, en augmentant la taille du jeu de données et en affinant les étapes de prétraitement des signaux. Cela permettrait en même temps d'alimenter le modèle et d'augmenter encore sa fiabilité. Par ailleurs, l'utilisation du machine learning pourrait permettre d'améliorer ce modèle, d'amplifier ses capacités et de le démocratiser. De plus, ce projet pourrait également être poursuivi pour être applicable dans les hôpitaux, en développant une interface ou d'un logiciel facilement utilisable par le personnel hospitalier.

Enfin, au regard de l'évolution du marché des anticorps, de nouvelles problématiques de contrôle qualité apparaissent avec l'approbation des biosimilaires ou des co-formulations (traitements comportant plusieurs anticorps) ce qui pourraient être des applications potentielles pour cette nouvelle méthode.

5 CHAPITRE V : ICIEF COUPLEE A L'ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE POUR LA DETECTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DEGRADEES AVANT ADMINISTRATION AU PATIENT : IMPACTS DE DIFFERENTS STRESS

1. INTRODUCTION

5.1.1 Études de stabilité en contexte hospitalier

Dans le cycle de vie d'un médicament, la stabilité physique et chimique des biothérapeutiques est de la plus haute importance, car celle-ci garanti la sécurité des patients et l'efficacité du produit. La stabilité peut être affectée à chaque étape du cycle de vie, de la production jusqu'à l'hôpital. En effet, les anticorps sont exposés à plusieurs facteurs environnementaux pouvant entraîner des changements biochimiques, structurels et conformationnels susceptibles d'affecter leur stabilité et leur efficacité [320]. Ainsi, il est important ; (i) de développer des méthodes pour permettre, tout d'abord, une compréhension approfondie des mécanismes physiques et chimiques subis par les anticorps monoclonaux, aboutissant à l'agrégation, la dénaturation ou d'autres dégradations, (ii) de vérifier que les Acms sont conformes et que la sécurité des patients soit garantie ainsi que l'efficacité du traitement.

Pour répondre à ces problématiques de stabilité rencontrées lors la vie du médicament biologique, il est nécessaire de développer des solutions analytiques adaptées à l'environnement et ses contraintes. Cela permet d'assurer le contrôle qualité du traitement à chacune de ces étapes. Par exemple, dans le contexte hospitalier, seules des méthodes d'analyses rapides, avec peu de préparations d'échantillons et facilement interprétables sont envisageables pour être réalisées par les pharmaciens avant administration.

Actuellement, en France, très peu de PUI des hôpitaux réalisent des tests de stabilité des médicaments biologiques préparés avant administration aux patients. Ces tests sont propres à chaque hôpital selon leurs moyens analytiques, et les méthodes d'analyses ou protocoles développés en interne. Le contrôle qualité minimal est uniquement visuel et correspond à la détection de particules visibles, conformément aux prérequis de la Pharmacopée Européenne relative aux solutions injectables. Le développement de méthodes analytiques permettant d'effectuer une étude de stabilité simple et rapide avant administration aux patients répond à un réel besoin au sein des hôpitaux.

Par ailleurs, selon la directive ICH Q5C, l'objectif des tests de stabilité est de fournir des preuves sur la manière dont la qualité d'une substance médicamenteuse ou d'un produit médicamenteux varie sur une période dans différentes conditions environnementales telles que : la température, la lumière, l'humidité et une large gamme de pH [321], [322], [323]. Afin de suivre les recommandations effectuées par

l'ICHQ5, nous avons choisi de mettre en place trois stress (UV, agitation, et thermique) et d'étudier leurs effets sur trois Acms commercialisés (Infliximab, Pertuzumab, Pembrolizumab) pour mimer autant que possible des stress subis par les Acms après formulation dans la poche de perfusion. Des stress plus modérés que ceux classiquement utilisés dans les études de stabilités ont été mis en place. Pour le stress thermique, à titre d'exemple, les conditions, les températures étudiées sont de 40°C pendant 6 mois et peuvent aller jusqu'à 70-80°C pendant plus de 24h. Ainsi, pour conserver un stress modéré dans cette étude, un stress thermique avec une température de 30°C a été choisi pour une durée maximale de 24h. En effet, dans certaines régions du monde, bien que les hôpitaux soient sous températures contrôlées, cette température peut facilement être atteinte. De même, un stress par agitation à 300 rpm a été effectué. Cette agitation reste élevée, mais bien moindre que celles de certains de test de stabilité (e.g. Agitation 750 rpm pendant 4h (Jaccoulet et al., 2021) [324]), [104].

Enfin, afin d'avoir une référence comparable aux stress les plus étudiés, connue pour exercer une influence sur les variants de charge, un stress UV a également été utilisé [82], [224]. La longueur d'onde (365 nm, 8W) choisie correspond à celle des néons communément utilisés dans les hôpitaux.

Ces trois stress étudiés ont donc été considérés comme proche des stress subis par les poches de perfusions dans les hôpitaux. Néanmoins, les durées d'exposition restent relativement longues en comparaison avec celles subies par les poches de perfusion. Un compromis a été choisi entre réalité à l'hôpital, durées nécessaires pour la dégradation (permettant de travailler sur des modèles), et durées appliquées pour des tests de stabilité (de durée intermédiaire de 24h à plusieurs mois).

Ce chapitre regroupe donc deux problématiques majeures : (i) le développement d'une méthode analytique applicable en CQ dans les hôpitaux pour des médicaments préparés dans des poches de perfusion avant administration aux patients, (ii) l'évaluation de l'impact des stress sur trois anticorps via différentes techniques d'analyse.

Afin de répondre aux exigences de rapidité et de simplicité du contexte hospitalier, nous avons choisi de développer une méthode par icIEF associée à des analyses en composantes principales. En effet, l'icIEF demande très peu de préparations d'échantillons (hormis celles du mélange des pharmalytes et de l'échantillon) et l'analyse peut être optimisée pour des temps très courts (jusqu'à 5 min). De plus, l'utilisation de la chimiométrie permet d'automatiser le traitement des données, de le simplifier, et de le rendre fiable. Cette combinaison icIEF et PCA est donc une solution adaptée aux contraintes du contexte hospitalier.

De plus, comme présenté dans le **Chapitre I**, les variants de charges renseignent sur de nombreuses dégradations et font partie des attributs de qualité critiques (*Critical Quality Attribute*, CQA). L'étude de ces variants est de ce fait justifiée comme première

approche. Néanmoins, il est important de combiner plusieurs approches analytiques pour confronter les résultats et avoir une vision la plus holistique possible des différents CQA. À ce titre, d'autres techniques analytiques ont été utilisées pour déterminer les différentes hétérogénéités des échantillons stressés et natifs. La SEC-FLD a été employée pour l'analyse des variants de taille tandis que la HIC-FLD a permis l'étude des variants d'hydrophobicité. Enfin, deux techniques différentes ont été utilisées pour l'étude des conformères, le dichroïsme circulaire (UV lointain) pour la structure secondaire et la mobilité ionique pour la structure tertiaire. L'ensemble de ces techniques a permis d'interpréter au mieux les résultats obtenus par icIEF-PCA.

5.1.2 Méthode de prétraitement des électrophérogrammes pour les études de stabilité

La méthode de prétraitement du signal électrophorétique, décrite précédemment dans le **Chapitre IV**, initialement destinée à l'identification du médicament, a été adaptée à cette nouvelle problématique sur la stabilité des Acms. Pour chaque anticorps, ce sont les variations liées aux conditions de stress des études de stabilité qui sont étudiées. Cela signifie que les variations d'un profil à l'autre, ou l'intra-variabilité, sont moins importantes pour l'étude d'un même anticorps, que dans le cas de l'identification d'un anticorps parmi plusieurs médicaments (chaque anticorps a un profil unique pouvant être très différent des autres) qui repose sur l'inter-variabilité, comme rencontrées dans le chapitre précédent.

Afin d'amplifier les différences entre les profils d'un même Acm et permettre une meilleure discrimination par PCA, une réduction du nombre de variables est effectuée. Cette réduction permet à l'algorithme de focaliser uniquement sur les variables apportant le plus d'informations (variabilité élevée d'un échantillon à l'autre). Le choix de ces variables a été réalisé à l'aide de la sélection des variables importantes définies à partir du calcul d'un score (*Variable Important Plot*, VIP) [325]. Ce score est calculé pour définir les variables d'influence lors de la construction d'un modèle de prédiction (par exemple, par PLS) [326]. Cette étape de détermination des VIP nécessite donc d'effectuer une PLS, qui a seulement pour but de déterminer les VIP (et non une fonction de prédiction) et de ne retenir que les variables dont le score est supérieur à un seuil pour effectuer la PCA souhaitée. Arbitrairement, seules les variables avec un score $VIP > 1,2$ sont sélectionnées. La sélection des variables supérieures à cette valeur de VIP a permis d'augmenter le score des PCA. Cependant, après observation des électrophérogrammes, il a été remarqué que la majorité des modifications sur les profils, sous l'effet des différents stress, affectait les variants acides. En effet, la séparation des clusters, ainsi que les scores des PCA, sont améliorés lorsque les variables utilisées étaient uniquement celles correspondant aux variants acides. Ainsi, les scores des PCA pour chacun des stress étudiés séparément peuvent augmenter jusqu'à 10% lorsque les variables sont réduites uniquement à celles des variants acides.

La réduction des variables est donc effectuée en deux étapes, seules celles ayant un $VIP > 1,2$ et provenant des variants acides sont utilisées. Dans le cas de l'Infliximab le

nombre variables est donc limité à 50, pour le Pembrolizumab à 74, et le Pertuzumab à 60.

Enfin une dernière étape de standardisation est réalisée selon la méthode décrite dans le chapitre précédent (**Chapitre IV**). L'ensemble des étapes est synthétisé par le schéma **Figure 1** de l'article 2 ci-dessous.

2. ARTICLE 2 : FOCALISATION ISOELECTRIQUE CAPILLAIRE EN IMAGE POUR SUIVRE LES DEGRADATIONS DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES AVANT ADMINISTRATION AUX PATIENTS

ARTICLE: IMAGED CAPILLARY ELECTROFOCUSING TO MONITOR DEGRADATION OF THERAPEUTIC MABS BEFORE PATIENT ADMINISTRATION

Cecile Tardif², Jaccoulet E¹, F. Halgand, G. Mekloufi, M. Taverna^{2,3} C. Smadja²

Keywords: Charge variants, Stability study, Critical Quality Attribute, imaged capillary isoelectric focusing, Principal Component Analysis

1. Introduction

Therapeutical monoclonal antibodies (mAbs) are increasingly developed to treat critical diseases. However, mAbs are highly complex molecules, heterogeneous (in terms of charge, size and glycoforms) and extremely sensitive to their environment [1]. Detecting mAbs modifications or degradation, related to the stress induced by their environment, is critical because they influence immunogenicity and the formation of anti-drug antibodies (ADA) affecting therapeutic efficacy and patient safety [2], [3]. Indeed, at hospital formulated mAbs could be submitted to various stresses during the compounding, storage, and handling stages (i.e. cold chain breakdown, pharmaceutical preparations issues before administration or handling) [4], [5], [6]. Thus, a careful characterization of critical quality attributes (CQAs) and evaluation of the bioactivity of products is required to limit immunogenicity due to mAbs modifications/degradation such as modification of the conformational state, self-association or small oligomers' formation [7], [8], [9].

Because of their potential impact on mAbs behavior, charge variations are considered as CQA to evaluate product quality and stability [10], [11]. Charge heterogeneities of mAbs is typically caused by post-translational modifications (PTMs) occurring during cell culture production, purification, and storage. Acidic variants often arise from deamidation of asparagine (Asp), sialylation and glycation of lysine (Lys). On the other hand, formation of basic variants could be related to C-terminal Lys, amidation of C-terminal proline (Pro), and uncyclized N-terminal glutamine (Gln) [11], [12]. Charge variation could compromise the monoclonal antibody affinity toward its biological

target. For instance, asparagine deamidation on the CDR region, source of acidic species, has been reported to reduce binding affinity [13], [14], [15]. In addition, as the electrostatic surface charge has a high influence on intramolecular interactions on proteins such as mAbs, a modification of their charge distribution could lead to the modification of their conformational state. This could render them prone to aggregate, leading thereby to the induction of immunogenicity and reduction of mAbs biological activity [8]. To ensure patient safety and treatment efficacy, the monitoring of protein's conformation is also recommended as a CQA. In this line, a rapid monitoring of a potential charge's variant modification is of paramount importance.

Electrophoretic methods allowing charge variants profiling (i.e. capillary zone electrophoresis [16], imaged capillary isoelectric focusing) have proven to be reliable tools for routine analysis and are nowadays employed in the field of quality control of mAbs. Recently successful cIEF-MS approach was developed to provide mAbs charge heterogeneity characterization [17], [18], [19]. However, this method requiring complex strategy did not meet the fast, simple, and high throughput analysis required for QC routinely performed. Novel approaches are needed for a fast and straightforward characterization of charge-related changes. Capillary isoelectric focusing (cIEF) is a non-denaturing technique that has been developed to separate mAbs charge variants according to pI [20], or intrinsic net charge of the molecule considering surface-exposed as well as internal amino acids. "imaged"-cIEF (icIEF) has been proposed with UV or native fluorescence detection conducted in the whole capillary. icIEF allows charge variants profiling as a fingerprint of mAbs within 10 minutes [21]. Nowadays, this technique is routinely applied in the biopharmaceutical industry [22], [23]. Applications include, model mAbs [24], NISTmAb and therapeutic mAbs such as Infliximab [25]. To the best of our knowledge, no study has yet investigated the reliability of icIEF to monitor degraded therapeutic mAbs. To render this approach more powerful, we combine icIEF with data processing methods and statistical analysis.

At hospital, only a few QC approaches, such as flow injection analysis (FIA) with an algorithm matching method [26] or other spectroscopic methods followed by chemometrics [27], [28], have been applied for mAbs. Still, these approaches are lacking information able to satisfy CQAs related to charge variants or protein's structure. As Lonardo and al. explained that data treatment has now moved to multivariate analysis (MVA), and CQA measures can no longer be assumed to be independent of one another [29]. As a perspective, real-time and on-line quality processes might be envisaged as future quality control tools based on current advances in MVA approaches. Multivariate analysis (MVA) has indeed the ability to extract relevant and specific information provided by electrophoretic profiles [12]. This approach has been successfully employed to discriminate mAbs from data obtained by icIEF [21].

The aim of this study was to evaluate the potential of icIEF combined with MVA to discriminate mAbs submitted or not to mild stress. The detection of degraded therapeutic antibody using a simple and fast method will combine

icIEF for charge variant analysis as a key CQAs assessment, and MVA to ensure data processing. To induce mild degradation, mAbs will be submitted to mild stress mimicking hospital conditions as much as possible [30]. Three antibodies with distinct chemical and physical properties were selected, one chimeric (Infliximab) and two humanized (Pertuzumab and Pembrolizumab). Chromatographic techniques such as Size Exclusion Chromatography (SEC) and Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) have been employed as orthogonal approaches to analyze the size and hydrophobic variations of stressed samples.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Pharmalytes (PL) 5–8 and 8–10.5 were obtained from GE Healthcare Bio-Sciences (Gothenburg, Sweden), and urea (99 %) from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Markers for *pI* calculation and Methylcellulose stock solution (3%) were obtained from ProteinSimple (San Jose, USA). Acidic and basic blocking agents, respectively, Serine (98%) and TEMED (99 %), were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Monoclonal antibodies, Infliximab, Pertuzumab, Pembrolizumab, were provided from Divbio (Ulvenhout, Netherland). All mAbs were compounded using pure water obtained from a Milli-Q unit (Millipore, Milford, MA) at a concentration of 1.0 mg/mL.

2.2. Apparatus and Material for icIEF procedure

The experiments were performed on Maurice C. from ProteinSimple (San Jose, USA). Data were acquired with the Compass for iCE software (v 2.2.0, San Jose, USA). The icIEF cartridges contain a fluorocarbon (FC) coated capillary with an effective capillary length of 5 cm and 100 μm internal diameter. Imaged detection with native fluorescence was employed with 10 seconds of exposure ($\lambda_{\text{excitation}}$: 280 nm, $\lambda_{\text{emission}}$: 320–450 nm).

2.3. Methods

2.3.1. Forced degradation

Forced degradation studies on the three antibodies, namely, Infliximab, Pertuzumab, and Pembrolizumab, all prepared at 1 mg/mL (reconstituted in ultrapure water), were performed by subjecting the samples to each stress condition for 5, 10, or 20 hours. The stress used was designated "mild" stress, since it is less harsh than the conventional stress used in stability studies mandated by authorities. Nine forced degradation conditions were tested: (i) exposure to temperature at 30°C for 5 h, 10 h, and 20 h in

a ThermoMixer® (Eppendorf, Hamburg, Germany); (ii) exposure to agitation stress (300 rpm at 20°C) for 5h, 10h, and 20h in a ThermoMixer® (Eppendorf, Hamburg, Germany); (iii) UV light exposure (365 nm, 5 UV lamps at 8 W, 20°C) in a crosslinker Vilbert Lourmat™ BLX-365 BIO-LINK (Fisher, Illkirch, France).

Throughout the investigation, control samples were utilized, which corresponded to samples of the three antibodies (1mg/mL) that were not submitted to stress and were stored at 4°C in the dark.

2.3.2. Charge variants analysis by icIEF

2.3.2.1. Sample preparation and conditions for icIEF

The mAbs samples solution contained 0.15 mg/mL mAbs, 0.30% methylcellulose, 2% of each pharmalytes (5-8, 8–10.5), pI markers (7.05 and 9.99), 1% TEMED 2% Serine and 2M urea.

The sampler temperature setting was 4°C. Method development was conducted according to the ProteinSimple cIEF Method Development Guide (046–296, Rev A 2016). Samples were loaded for 55 s and focused at 1.5 kV for 1 min and 30 kV for 12 min.

The electropherograms obtained on imaged cIEF plot intensities against pixels (due to the "imaged" technology involving a camera for detection), and specific pI markers are required to convert pixels into pI mathematically.

2.3.2.2. Data handling and Principal Component Analysis

Data handling and multivariate analyses were processed with XLStat Software (V.2021.4, Addinsoft™, France).

a) Data collection and pre-processing method (alignment, scaling, and centering)

Since each antibody lead to different electropherogram patterns using icIEF, data for the three mAbs were handled and analyzed independently. **Table 1** depicts the number of electropherograms utilized for chemometric analysis. Variabilities (i.e. 5 cartridges, 22 days, 3 batches), have been introduced to sample preparations, to mimic hospital conditions as much as possible. Clustering requires data pre-processing to remove unwanted variations (such as instrument artifacts) and highlight variations of interest. Changing data attributes through data pre-treatment may enhance the outcomes of the clustering algorithm.

In this study, data processing was designed to extract relevant information from

electropherograms (mAb's icIEF profiles considered as individuals) handled independently of pI scaling (x-scaling/abscissa of electropherograms). As a result, an arbitrary scaling for the x-axis was created, where each point (intensity values of electropherograms) is separated by one unit used as variables [21]. Consequently, for PCA, each icIEF run is considered as an individual and intensity values are observations reported for each variable.

First, signal intensities of electropherograms were extracted and by matching all the electropherograms on the main peak. This step is necessary to perform appropriate comparisons between profiles and to reduce errors from icIEF focalization. Following alignment, only a subset of electropherograms was evaluated for the chemometric analysis to reduce the number of variables. Consequently, a focus on variables corresponding to acidic variants have been performed (**Figure 1**). These variables are all located on the left side of the electropherogram, bordered by the very end of the acidic marker (pI 7.05) and the variable corresponding to the main peak. These exact delimitations provide electropherogram windows where variances are the most important. This step allows to readily reduce the number of variables for each observation. To decrease more the number of "acidic variables," only variables that have a significant influence in distinguishing individuals from one stress condition to another were chosen. To perform this selection, VIP (Variables Important for Projection) scores have been analyzed to guarantee the most relevant selection of variables. Only variables with a VIP score greater than 1.2 were considered in the subsequent chemometric analysis.

Finally, individuals were exposed to the previously established scaling method based on VAST (VARIABLE STability). This normalization allows reducing variations between individuals belonging to the same class (intra-stress condition variations are reduced) [21]. VAST scales variables using standard deviation and coefficient of variation (cv), concentrating on stable variables with low fluctuations.

Table 1: Monoclonal antibodies employed for PCA to discriminate stressed and unstressed samples.

Monoclonal antibodies	mAbs origins	Type	pI	Molecular weight (kDa)	Target	Number of observations
<i>Infliximab (influx)</i>	<i>Chimeric</i>	<i>IgG1</i>	7.6	144	<i>TNF alpha</i>	143
<i>Pertuzumab (Pertu)</i>	<i>Humanized</i>	<i>IgG1</i>	9.0	148	<i>HER2</i>	116
<i>Pembrolizumab (Pembro)</i>	<i>Humanized</i>	<i>IgG4</i>	7.5	146	<i>Anti-PD1</i>	55

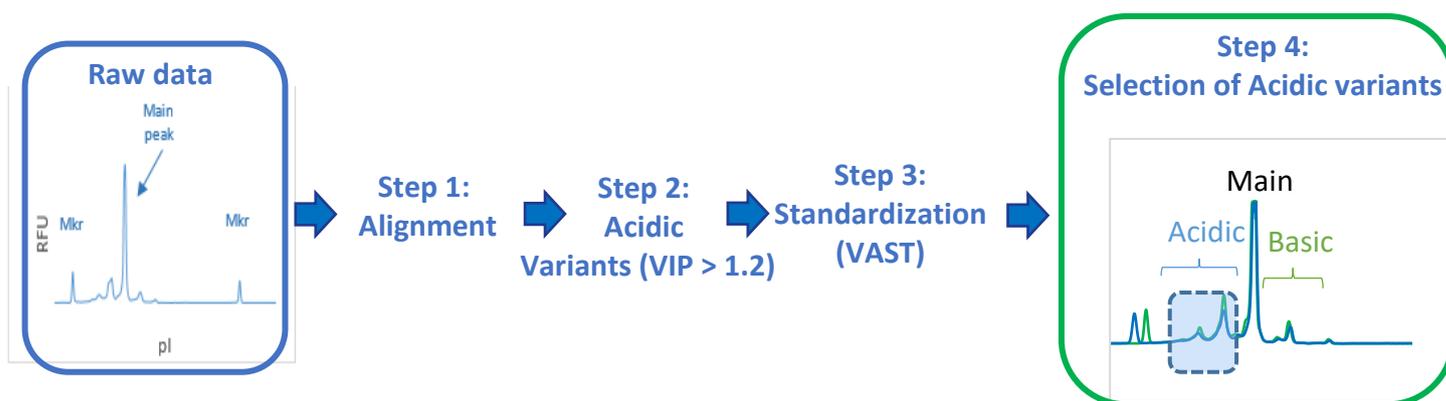


Figure 1: Schematic workflow of the computational steps for data pre-processing from raw icIEF electropherograms to treated electropherograms.

b) Principal component analysis

Following the pre-processing procedure, principal component analysis (PCA) was performed on the icIEF database. PCA attempts to explain variance between individuals using the fewest number of components possible. Only after the pre-treatment technique outlined in 2.3.2.2, PCA was used on the acquired data to assess its potential capacity to differentiate mAbs. Loading vectors and principal component (PC) scores give qualitative and quantitative information about the mAbs, respectively.

2.3.3. Aggregation study by Size-Exclusion Chromatography (SEC) with Fluorescent Induced Detection (SEC-FLD)

The aggregation study was conducted by liquid chromatography using the chromatograph (1290 Infinity II, Agilent) and SEC column (450 A, 2.7 μ m, 4.6 \times 300mm, Acquity BEH SEC, Waters). The mobile phase was composed of: 150mM of potassium phosphate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 50mM potassium chloride (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 5% Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and the pH was adjusted to 7.0 with potassium hydroxide (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The analysis was performed under isocratic conditions for 20 min. The column temperature was set at 30°C and 2 μ g of sample was injected into the column at 0.3 mL/min. The FLD chromatograms were registered at an excitation wavelength of 280 nm and an Emission at 340 nm.

2.3.4. Hydrophobic variants studied by Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) with Fluorescent Induced Detection (HIC-FLD)

The evolution of hydrophobic variants according to stress was monitored by liquid chromatography using the chromatograph (1290 Infinity II, Agilent) and HIC column (1000A, 4.6 \times 100mm, MabPack HIC-10, Thermo Fisher). The analysis was performed under salt-gradient conditions for 40 min, %B from 20% to 100%. The mobile phase A

was composed of: 1M of ammonium sulfate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 20mM sodium acetate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 5% isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and pH was adjusted to 7.4 with sodium hydroxide (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Mobile phase B was made of 20mM sodium acetate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 5% Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and the pH was adjusted to 7.4. The column temperature was set at 30 °C and 2µg of sample was injected into the column at 0.3 mL/min. The FLD chromatograms were registered at an excitation wavelength of 280 nm and an emission at 340 nm.

3. Results and Discussions

To set up the stability test, we have chosen three stresses according to authorities: exposition to UV light (ICH Q1B), high temperature (ICH Q1A), and agitation [1], [31]. However, the purpose is to mimic as much as possible hospital conditions. Stress factors must be milder compared to standard stability tests. Consequently, the thermal stress was set at 30°C, the UV light wavelength at 365 nm (neon light), agitation at 300 rpm, and different time of exposure have been tested. The goal of the study was to have a holistic characterization of forced degraded samples analyzed by conventional analytical techniques and a new method, icIEF-PCA. SEC- FLD and HIC- FLD were used to correlate results from icIEF and assess the relevance of icIEF-PCA in stability study of mAbs.

3.1. Evaluation of the ability of the icIEF-PCA approach to discriminate stressed and non-stressed mAbs

This part of the study aims to evaluate the relevance of the icIEF-PCA method to detect mAbs degraded form. The data were extracted from electropherograms, considered as mAbs fingerprint, and submitted to the pre-processing method outlined in 2.3.2.2. PCA potential to discriminate the pre-processed data into stressed and non-stressed was then evaluated.

3.1.1. Infliximab stressed versus non-stressed samples by icIEF-PCA

Infliximab, the first approved TNF-alpha inhibitor, was chosen as a case study because it has been a mainstay biotherapeutics and a valuable target for biosimilar development, [32]. In addition, Infliximab tends to self-associate and can be therefore considered as a good model to evaluate the potential of icIEF-MVA to discriminate stress from non-stress mAbs. 154 electropherograms were collected and pre-processed before PCA analysis, 83 stressed and 71 native mAbs. **Figure 2** showed that PC 1 accounts for 98% of the total explained variance (TEV), indicating that the data are mostly separated along the x-axis. We can observe from **Figure 2** that two clusters corresponding to stressed (300rpm, UV light, and 30°C) and native Infliximab respectively were formed. The high (PC1, PC2) score plot of 99% indicates unambiguous discrimination between stressed and non-stressed samples. UV-stressed samples exhibit significant difference from the native cluster. All other conditions,

clustered along PC1, indicate that UV had the greatest influence on charge variants when compared to other stresses. When the pre-processed data are analyzed stress by stress, we can observe from **Figure 3**, distinct behavior depending on the stress applied. UV stressed samples were divided along the PC1 (97%) axis in **Figure 3A**, according to time exposure, suggesting that this axis represents the level of mAb-degradation. A similar trend has been found for agitation (**Figure 3B**) and heat stress (**Figure 3C**), but no clear cluster related to the time of exposure was formed. This is probably due to a lower impact of these stresses. However, whatever the stress applied, PCA demonstrated a strong discrimination between stressed and non-stressed samples, with a high PCA score plot of 99%. It is also important to note a strong correlation between the exposure time to UV light and the corresponding clusters of native and stressed mAb samples in **Figure 3A**. Indeed, the 2D plot suggests that the horizontal x-axis is linked with the time of exposure, for example, native and 20h UV-stressed mAbs are anti correlated. These results from icIEF-PCA clearly demonstrate the UV effects on mAbs stability. This agrees with previous study showing that UV-stress leads to protein degradation [31].

For agitation stress (**Figure 3B**), the 2D score plot showed that the order of clusters exhibits an inverse trend (along the x-axis the order is native samples, 20h, 10h and 5h) compared to UV-stress. Similar results are observed for the thermal stress. These observations may suggest that mild agitation or thermal stress led to an unfolding or denaturation step (for 5h and 10h exposure time), followed by a folding step (for 20h exposure time), but still different from the native folding. Further investigations are required to better understand this phenomenon (i.e. structural study).

Furthermore, comparing **Figure 3A-C**, we also observed that the different stresses led to different behavior for kinetic of the degradation.

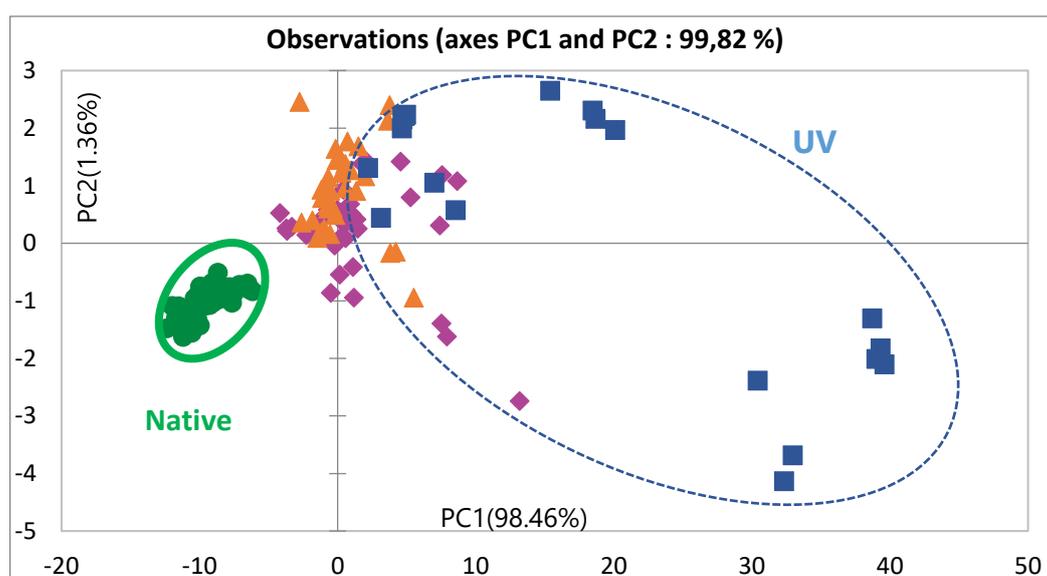


Figure 2: PCA score plot of icIEF profiles after pretreatment procedure (154 mAb samples) of Infliximab stressed and non-stressed samples at 1mg/mL: Native (n=71) (●), agitation-stressed (n=33) (◆), thermal-stressed (n=32) (▲) and UV-stressed (n=18) (■) samples. The symbol (%) expresses the contribution of each PC, and the (PC1, PC2) score is 99.82%.

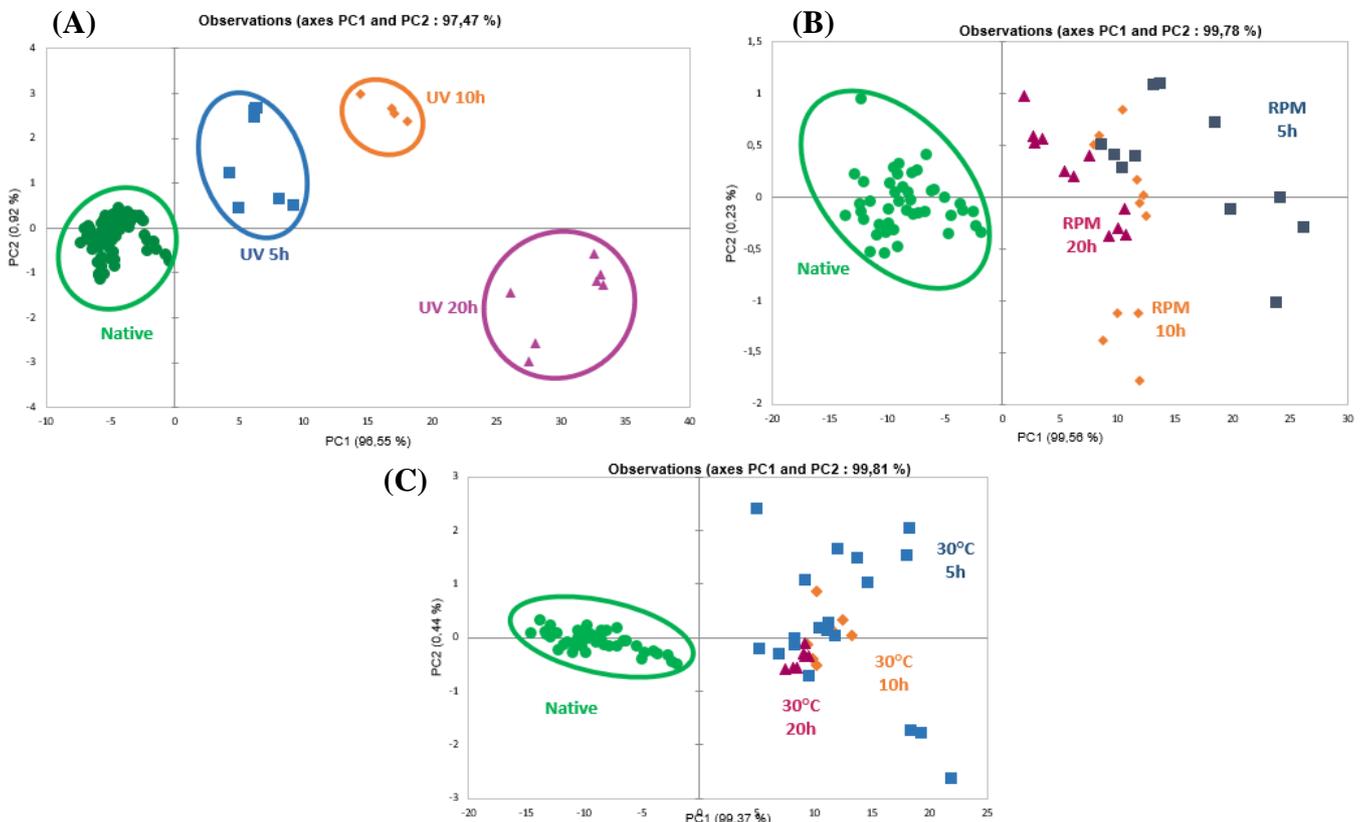


Figure 3: PCA score plot of icIEF profiles after pretreatment procedure of Infliximab non-stressed samples (●) (71 native samples), and stressed samples at 1mg/mL with different time of exposure: 5h (■), 10h (◆), and 20h (▲) for the different stress. **(A)** UV stressed samples (n=89), **(B)** agitation stressed samples (n=104), **(C)** thermal stressed samples (n=103).

3.1.2. Analysis of stressed and non-stressed Pertuzumab and Pembrolizumab by icIEF-PCA

The potential of icIEF-PCA described in the previous chapter has been applied to two humanized mAbs. Humanized or fully human mAbs have been developed to limit immunogenicity effect of the variable regions [33], [34], [35]. It has been proved that chimeric are as well less stable than humanized antibodies [35]. However, Takahiko and al. demonstrated that subclass have also an impact on mAb stability as IgG1 exhibits a better structural stability compared to IgG4 [36]. In this line, Pembrolizumab (Humanized, IgG4) and Pertuzumab (Humanized, IgG1) have been analyzed. (**Table 1**).

Following a data-processing step, principal component analysis (PCA) was conducted on 116 electropherograms for Pertuzumab and 55 for Pembrolizumab. First, for the two mAbs, all the electropherograms provided from mAbs exposed to UV, agitation and temperature have been pre-processed and submitted to PCA analysis. (PC1, PC2)

in **Figures 4A** and **4B**, showed a satisfactory score plot of 99% for Pertuzumab and 85% for Pembrolizumab. In contrast to samples exposed to UV stress, native sample clusters could not be distinguished from samples exposed to thermal (30°C) or agitation (300 rpm). This is most likely due to the mild degradation occurring when mAbs are submitted to temperature and agitation. These results assessed that mAbs exhibit different sensitivity to stress. Infliximab submitted to temperature (30 °C) and agitation are well discriminated from the native one, whereas no discrimination was shown for the two humanized mAbs. This approach based on charge variant analysis showed that behaviors against stress are strongly mAb-dependant.

Secondly, PCA was performed stress by stress for both mAbs to ensure that the impact of agitation or temperature are not hidden by UV stress when all the data obtained from the three stress are analyzed together. When only UV stressed samples are plotted, a general trend corresponding to UV time exposure could be observed for Pertuzumab (**Figure 5A**). Similar results have been obtained for Pembrolizumab (data not shown). When agitation is applied for 20h, both antibodies have shown overlapping clusters for native and stressed mAbs. While after 10h of agitation, stressed and non-stressed mAbs have formed two distinct clusters (**Figure 5B**). This could be explained by charge variants or structural similarities between 20 h-degraded and native mAbs.

Furthermore, no discrimination has been evidenced between stress and non-stressed mAbs for heat stress at 30°C (**Figure 5C**). Therefore, we can hypothesize that Pembrolizumab and Pertuzumab are less prone to degradation when submitted to 30°C or 300rpm compared to Infliximab. This could be explained by Pembrolizumab and Pertuzumab are humanized mAbs, and consequently, they are supposed to have a better stability compared to chimeric ones, as shown in previous studies [35].

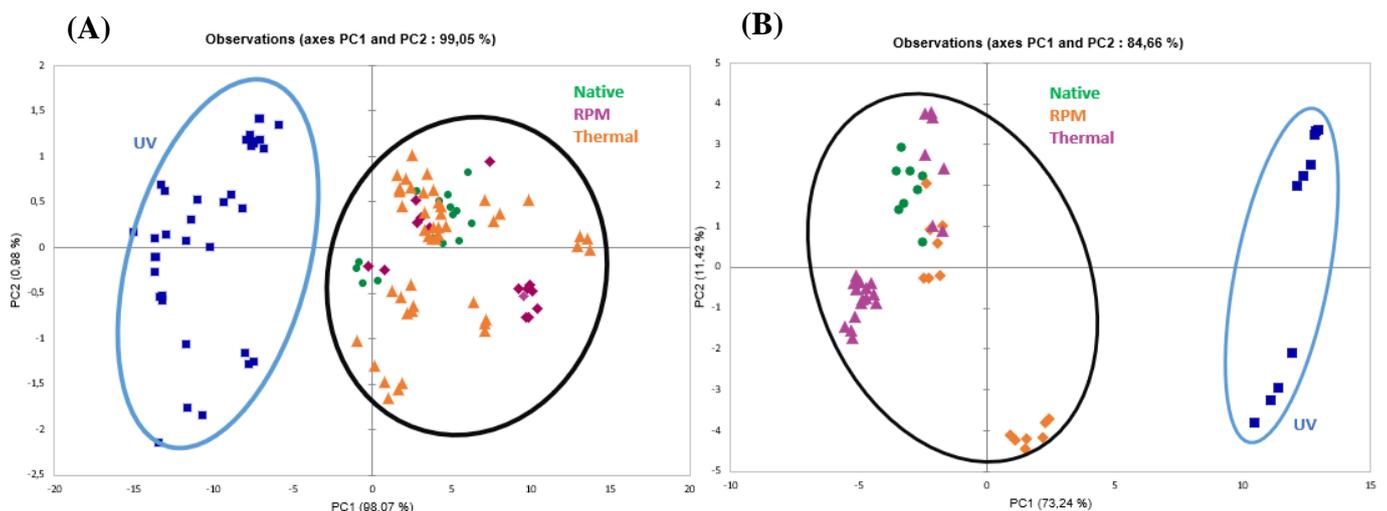


Figure 4: PCA score plot of icIEF profiles after pretreatment procedure of **(A)** Pertuzumab (107 mAbs samples), **(B)** Pembrolizumab (47 mAb samples) stressed and non-stressed samples at 1mg/mL: Native (15) (●), agitation-stressed (15) (◆), thermal-stressed (44) (▲) and UV-stressed (33) (■) samples.

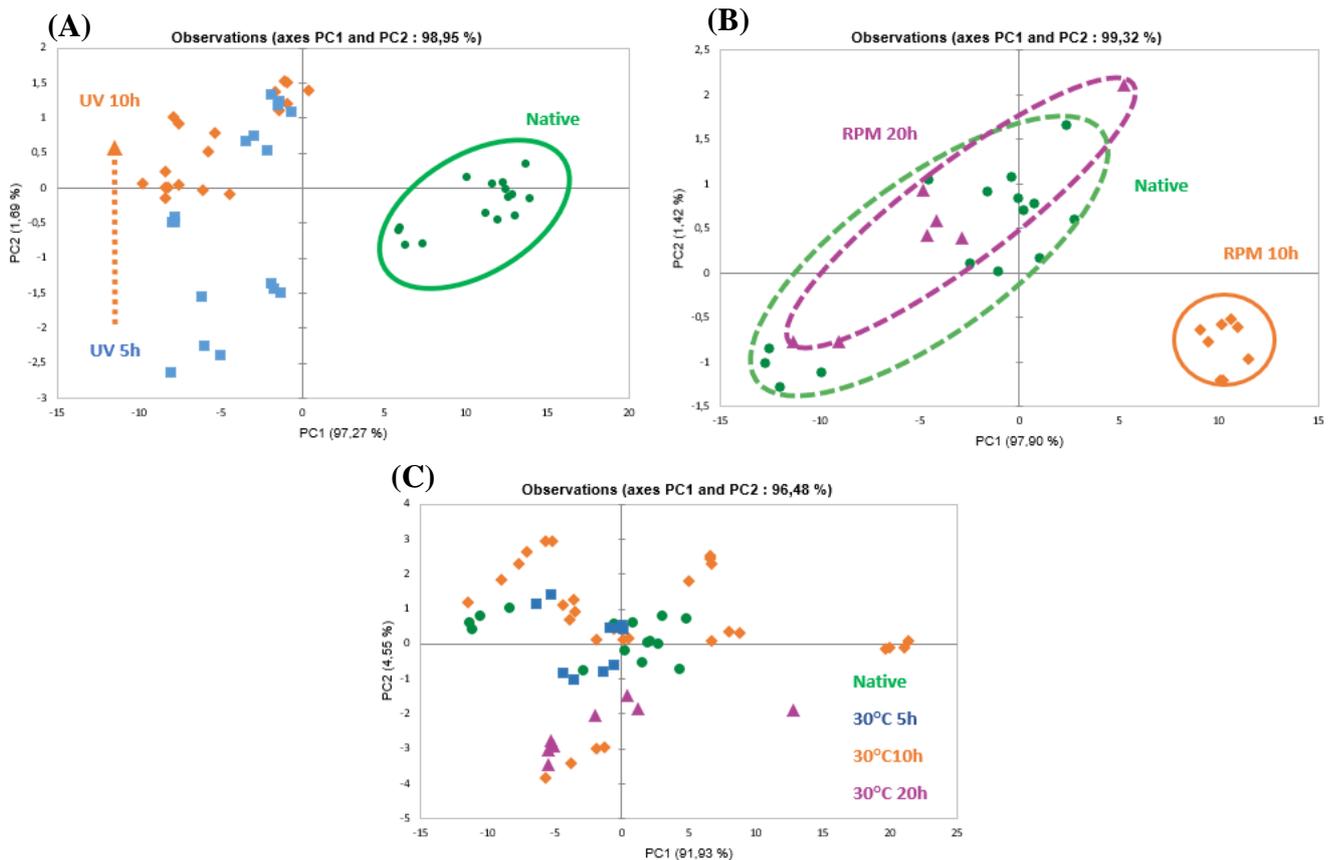


Figure 5: PCA score plot of icIEF profiles after pretreatment procedure of Pertuzumab non-stressed samples (●) (71 native samples), and stressed samples at 1 mg/mL with different time of exposure: 5h (■), 10h (◆), and 20h (▲) for the different stress. **(A)** UV stressed samples (49 samples), **(B)** agitation stressed samples (30 samples), **(C)** thermal stressed samples (61 samples).

To conclude, this multivariate method based on the combination icIEF-PCA allows detection of degraded mAb-based at different stages (due to time of exposure) before patient administration within few minutes. However, to assess the finding obtained by icIEF-PCA, stress and non-stress samples have been analyzed by orthogonal methods such as SEC-FLD and HIC-FLD.

3.2. Detection of small aggregates by Size Exclusion Chromatography

The amount of mAbs' small aggregates was evaluated by SEC-FLD. In agreement with the previous chapter, Infliximab exhibits higher percentages of aggregates were submitted to UV-stressed samples (**Figure 6**). The percentage of Infliximab aggregates increases with time exposure, after 10 hours (12 %), 20 hours (21 %). Furthermore, this agrees with the cluster's evolution according to Infliximab's degradation states, as determined by icIEF-PCA results in the previous section of this work. However, under thermal and agitation stress, no significant difference was observed between stressed

and control samples.

Pertuzumab and Pembrolizumab submitted to UV stress showed a similar trend, with an increase in aggregate percentage, but at a lower level compared to Infliximab (Supplementary S1). 6% for Pembrolizumab and Pertuzumab after 10 hours exposure (Supplementary S1). After 20 hours of UV exposure, higher molecular weight aggregates of Pembrolizumab were excluded from the SEC column, without any possibility to determine the aggregate percentage. This demonstrates Pembrolizumab's sensitivity to long-term UV exposure. For Pertuzumab, 14% of aggregates have been detected (<pentamer). These results are in agreement with Takahiko and al., which showed that IgG 4 (Pembrolizumab) was less stable than IgG1 (Pertuzumab). [37], mAbs submitted to agitation or thermal stress did not show any difference with control mAbs.

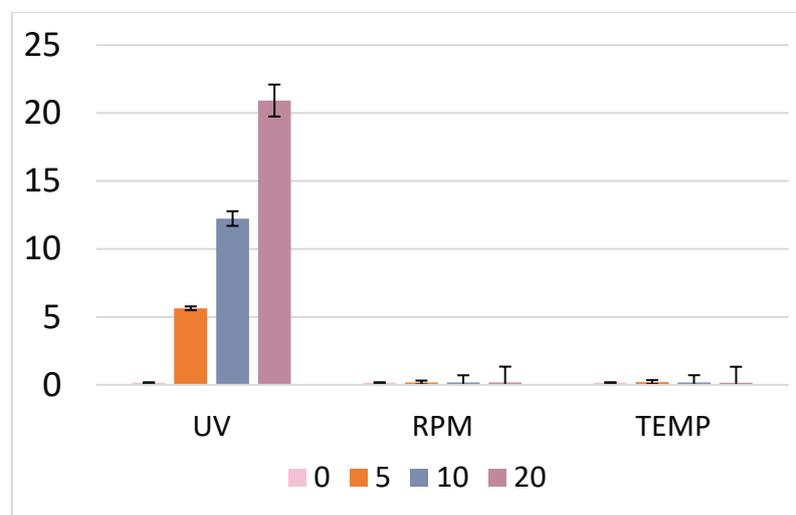


Figure 6: Relative percentages of aggregates (relative percentage based on total area) obtained by SEC-FLD for Infliximab after various stress conditions: UV, agitation (RPM), Thermal (TEMP) at 0h, 5h, 10h, and 20h of exposure.

SEC-FLD confirms degradation occurring when Infliximab, Pembrolizumab and Pertuzumab are submitted to stress UV but not with the other stress. It is important to note that for Pertuzumab and Pembrolizumab an effect is observed for agitation when mAbs are analysed by icIEF-PCA suggesting a conformational modification without small oligomers' formation.

3.3. Detection of hydrophobic variants by Hydrophobic Interaction Chromatography

The Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) analysis was performed on both stressed and non-stressed samples. To distinguish the hydrophobic and hydrophilic variants from the primary peak, generic HIC conditions were employed.

Chromatographic profiles were provided from repeated runs (n=5) and used for relative quantification of the protein variations. The Infliximab variants were eluted from 4 to 12 minutes as described in the materials and methods chapter. The HIC profiles of samples stressed by agitation showed that the peak area of the variants varied with the time of exposure (**Figure 7**). For Infliximab, **Figure 7** indicated that peaks 2 (+5%) and peak 3 (+5%) areas increased after an exposure of 20h to agitation, indicating changes related to hydrophilic variants (eluted peaks before the main peak) whereas the main peak (peak 4) tended to decrease (-15 %). For UV-stressed sample, the peak area of Infliximab variants was increased (5% changes for 20h), following an expected time trend. No change was seen on samples submitted to thermal stress [38].

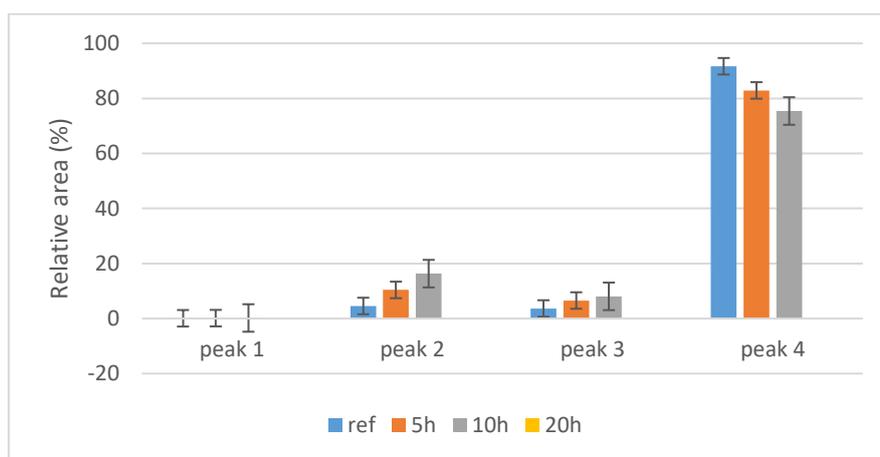


Figure 7: Evolution of relative area (%) of Infliximab HIC-FLD profiles after agitation stress for 0h, 5h, 10h, and 20h of exposure. Relative percentages are based on total area. Peak 1 value is <0.2%. Reference (ref) corresponds to native Infliximab (n=4).

For Pertuzumab and Pembrolizumab only samples stressed by UV-stressed samples of (Supplementary S3 and S4) showed hydrophobic variants (eluted peaks after the main peak). A maximum of 5% change in total relative area can be seen for variants on both mAbs.

To conclude, the results from these two chromatographic methods (SEC, HIC) confirmed that stress-related behaviors are mAbs and stress-dependent, with the highest impact on Infliximab. Moreover, UV stress is known to impact mAbs hydrophobic variants, suggesting that stress may cause conformational changes and thereby the number of aggregates [39]. For the three antibodies, UV-stressed samples have been degraded according both technics, however, for other stress no clear conclusion can be seen from analysis on degradation state of mAbs.

Results observed in icIEF-PCA demonstrate a strong correlation for UV-stressed samples and time exposure probably related to small oligomers formation detected by SEC-FLD and variants described by HIC. Especially for agitation and thermal stress, icIEF-PCA approach showed its ability to highlight modifications that are not seen by other techniques (SEC-FLD and HIC-FLD). For icIEF-PCA, Pertuzumab and

Pembrolizumab showed overlapping clusters for non-stressed mAbs and mAbs submitted to stress during 20h. These results suggest conformational changes which should be evaluated in further study.

4. Conclusions

For the first time, we demonstrated the ability of icIEF combined with PCA to distinguish between force degraded samples and native antibodies. Investigations were performed to distinguish between samples submitted to moderate stresses under different times exposure. When evaluating standard icIEF electropherograms, charge variation changes between forced damaged samples are minor and difficult to detect. However, by integrating icIEF analysis with chemometrics PCA, we detect changes that were not detected by classical approaches. This confirms that icIEF-PCA is an effective tool for detecting degradation at early stage when mAbs are submitted to mild stress. It is important to note that stress at hospital might cause subtle alterations that may influence treatment efficiency. This work shows the relevance this fast and straightforward approach of icIEF associated with PCA to detect charges variations in different force degraded mAbs. The PCA's clusters generated may be attributed to changes in stress and exposure time and can be used as method for hospital quality control prior to patient administration.

References

- [1] Y. Le Basle, P. Chennell, N. Tokhadze, A. Astier, and V. Sautou, "Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review," *J. Pharm. Sci.*, vol. 109, no. 1, pp. 169–190, 2020, doi: 10.1016/j.xphs.2019.08.009.
- [2] M. M. C. Van Beers and M. Bardor, "Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins," *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 12, pp. 1473–1484, 2012, doi: 10.1002/biot.201200065.
- [3] K. S. Satich, "Impact of Product-Related Factors on Immunogenicity of Biotherapeutics," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 2, pp. 354–387, 2011, doi: 10.1002/jps.
- [4] A. Torrente-López, J. Hermosilla, A. Salmerón-García, J. Cabeza, and N. Navas, "Comprehensive Analysis of Nivolumab, A Therapeutic Anti-Pd-1 Monoclonal Antibody: Impact of Handling and Stress," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 4, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14040692.
- [5] 1 OZAN S. KUMRU, 1 JUN LIU, 2 JUNYAN A. JI, 2 WILSON CHENG, 2 Y. JOHN WANG, 2 TINGTING WANG, 1 SANGEETA B. JOSHI and 1 DAVID B. VOLKIN1 C. RUSSELL MIDDUAGH, "Compatibility, Physical Stability, and Characterization of

- an IgG4 Monoclonal Antibody After Dilution into Different Intravenous Administration Bags," *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 10, pp. 3636–3651, 2012, doi: 10.1002/jps.
- [6] H. Ma, C. Ó'Fágáin, and R. O'Kennedy, "Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement," *Biochimie*, vol. 177, pp. 213–225, 2020, doi: 10.1016/j.biochi.2020.08.019.
- [7] M. Habberger *et al.*, "Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies: Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes," *MAbs*, vol. 6, no. 2, pp. 327–339, 2014, doi: 10.4161/mabs.27876.
- [8] A. Beck *et al.*, "Risk-Based Control Strategies of Recombinant Monoclonal Antibody Charge Variants," *Antibodies*, vol. 11, no. 4, pp. 1–25, 2022, doi: 10.3390/antib11040073.
- [9] F. Torkashvand and B. Vaziri, "Main quality attributes of monoclonal antibodies and effect of cell culture components," *Iran. Biomed. J.*, vol. 21, no. 3, pp. 131–141, 2017, doi: 10.18869/acadpub.ibj.21.3.131.
- [10] S. K. Singh, G. Narula, and A. S. Rathore, "Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes?," *Electrophoresis*, vol. 37, no. 17–18, pp. 2338–2346, 2016, doi: 10.1002/elps.201600078.
- [11] Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, K. May, and H. Liu, "Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies Yi Du, A," *MAbs*, vol. 4, no. 5, pp. 578–585, 2012.
- [12] M. Yüce *et al.*, "Fractionated charge variants of biosimilars: A review of separation methods, structural and functional analysis," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1152, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.12.064.
- [13] H. Pan, K. Chen, L. Chu, F. Kinderman, I. Apostol, and G. Huang, "Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn," *Protein Sci.*, vol. 18, no. 2, pp. 424–433, 2009, doi: 10.1002/pro.45.
- [14] J. Vlasak *et al.*, "Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody," *Anal. Biochem.*, vol. 392, no. 2, pp. 145–154, 2009, doi: 10.1016/j.ab.2009.05.043.
- [15] I. Schmid *et al.*, "Assessment of susceptible chemical modification sites of trastuzumab and endogenous human immunoglobulins at physiological conditions," *Commun. Biol.*, vol. 1, no. 28, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1038/s42003-018-0032-8.
- [16] R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, and Y. N. François, "Cutting-edge capillary

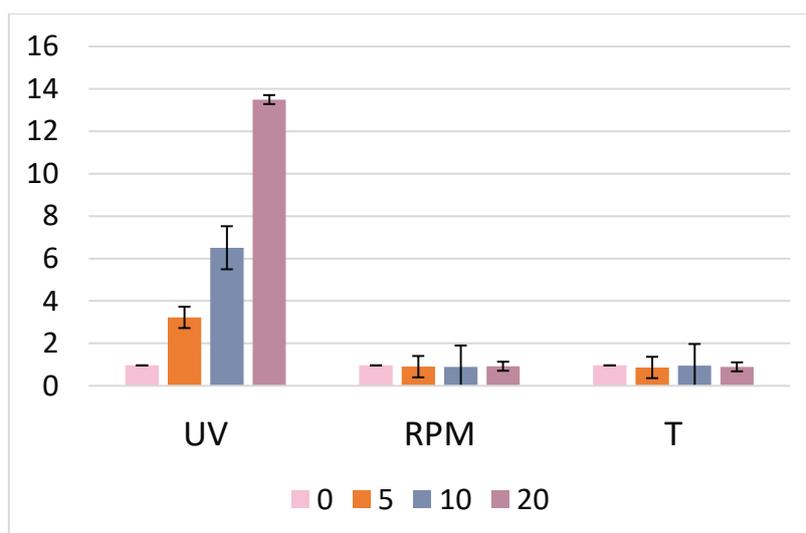
- electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1032, pp. 61–78, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.05.028.
- [17] X. He, M. ElNaggar, M. A. Ostrowski, A. Guttman, E. Gentalen, and J. Sperry, "Evaluation of an icIEF-MS system for comparable charge variant analysis of biotherapeutics with rapid peak identification by mass spectrometry," *Electrophoresis*, vol. 43, no. 11, pp. 1215–1222, 2022, doi: 10.1002/elps.202100295.
- [18] G. Wu *et al.*, "Mass Spectrometry-Based Charge Heterogeneity Characterization of Therapeutic mAbs with Imaged Capillary Isoelectric Focusing and Ion-Exchange Chromatography as Separation Techniques," *Anal. Chem.*, vol. 95, pp. 2548–2560, 2023, doi: 10.1021/acs.analchem.2c05071.
- [19] J. Schlecht, B. Moritz, S. Kiessig, and C. Neusüß, "Characterization of therapeutic mAb charge heterogeneity by iCIEF coupled to mass spectrometry (iCIEF-MS)," *Electrophoresis*, vol. 44, no. 5–6, pp. 540–548, 2023, doi: 10.1002/elps.202200170.
- [20] A. Goyon *et al.*, "Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1065–1066, no. September, pp. 119–128, 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.09.033.
- [21] C. Tardif *et al.*, "Imaged capillary isoelectric focusing associated with multivariate analysis: A powerful tool for quality control of therapeutic monoclonal antibodies," *Talanta*, vol. 260, 2023.
- [22] J. Wu, W. McElroy, J. Pawliszyn, and C. D. Heger, "Imaged capillary isoelectric focusing: Applications in the pharmaceutical industry and recent innovations of the technology," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 150, p. 116567, 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116567.
- [23] F. Krebs *et al.*, "Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications—Updated and completely revised edition," *Electrophoresis*, no. July, pp. 1–63, 2023, doi: 10.1002/elps.202300158.
- [24] X. Z. He, A. H. Que, and J. J. Mo, "Analysis of charge heterogeneity in mAbs using imaged CE," *Electrophoresis*, vol. 30, pp. 714–722, 2009.
- [25] J. Kahle, H. Zagst, R. Wiesner, and H. Wätzig, "Comparative charge-based separation study with various capillary electrophoresis (CE) modes and cation exchange chromatography (CEX) for the analysis of monoclonal antibodies," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 174, pp. 460–470, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.058.

- [26] E. Jaccoulet, T. Daniel, P. Prognon, and E. Caudron, "Forced Degradation of Monoclonal Antibodies After Compounding: Impact on Routine Hospital Quality Control," *J. Pharm. Sci.*, vol. 108, no. 10, pp. 3252–3261, 2019, doi: 10.1016/j.xphs.2019.06.004.
- [27] S. Pieters, J. M. Roger, T. De Beer, M. D'Hondt, B. De Spiegeleer, and Y. Vander Heyden, "Raman model development for the protein conformational state classification in different freeze-dried formulations," *Anal. Chim. Acta*, vol. 825, pp. 42–50, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.03.027.
- [28] B. S. McAvan *et al.*, "Raman Spectroscopy to Monitor Post-Translational Modifications and Degradation in Monoclonal Antibody Therapeutics," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 15, pp. 10381–10389, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00627.
- [29] A. Lonardo, B. Saxena Parekh, and A. Srivastava, "Bio-CoDa: A new analysis class to ensure accurate and precise monoclonal antibody CQA estimation and control," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 114, no. 9, pp. 2001–2010, 2017, doi: 10.1002/bit.26318.
- [30] E. Tamizi and A. Jouyban, "Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 98, no. November, pp. 26–46, 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.10.016.
- [31] A. Sreedhara *et al.*, "Effect of ambient light on IgG1 monoclonal antibodies during drug product processing and development," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 100, pp. 38–46, 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.12.003.
- [32] M. Buda, "Development of Ph . Eur . standards for therapeutic monoclonal antibodies: infliximab case study," *Generics Biosimilars Initiat. J.*, vol. 11, no. 3, pp. 104–113, 2022, [Online]. Available: 10.5639/gabij.2022.1103.017.
- [33] T. Ito and K. Tsumoto, "Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress," *Protein Sci.*, vol. 22, no. 11, pp. 1542–1551, 2013, doi: 10.1002/pro.2340.
- [34] M. K. Joubert, Q. Luo, Y. Nashed-Samuel, J. Wypych, and L. O. Narhi, "Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 28, pp. 25118–25133, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.160457.
- [35] S. S. Park, J. Kim, J. F. Brandts, and H. J. Hong, "Stability of murine, chimeric and humanized antibodies against pre-S2 surface antigen of hepatitis B virus," *Biologicals*, vol. 31, no. 4, pp. 295–302, 2003, doi: 10.1016/j.biologicals.2003.08.003.
- [36] X. Wang, S. K. Singh, and S. Kumar, "Potential aggregation-prone regions in

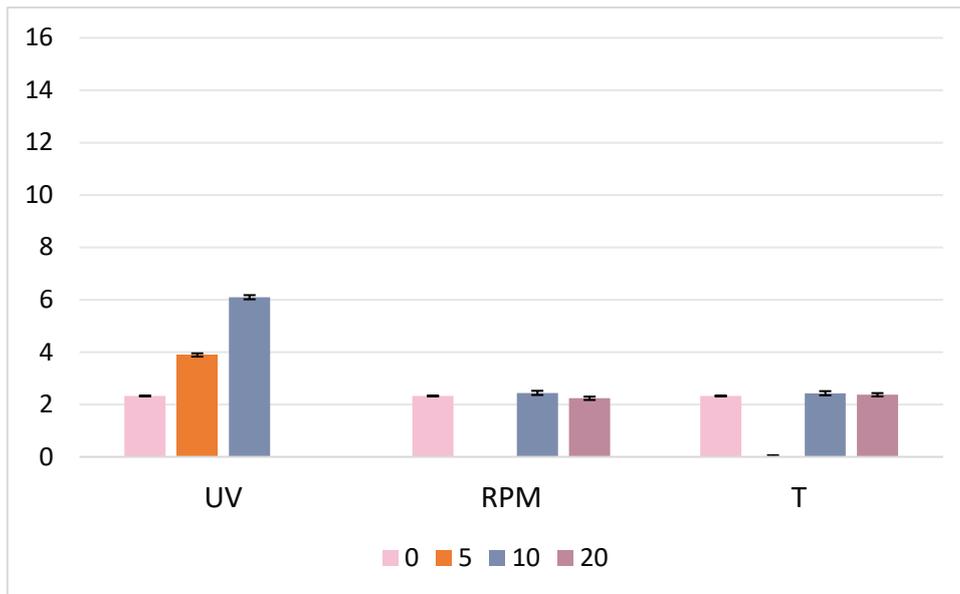
complementarity-determining regions of antibodies and their contribution towards antigen recognition: A computational analysis," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 8, pp. 1512–1529, 2010, doi: 10.1007/s11095-010-0143-5.

- [37] H. Liu and K. May, "Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function," *MABs*, vol. 4, no. 1, pp. 17–23, 2012, doi: 10.4161/mabs.4.1.18347.
- [38] J. Dobson *et al.*, "Inducing protein aggregation by extensional flow," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 18, pp. 4673–4678, 2017, doi: 10.1073/pnas.1702724114.
- [39] R. M. Meyer, L. Berger, J. Nerkamp, S. Scheler, S. Nehring, and W. Friess, "Identification of monoclonal antibody variants involved in aggregate formation – Part 2: Hydrophobicity variants," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 160, no. January, pp. 134–142, 2021, doi: 10.1016/j.ejpb.2021.01.006.

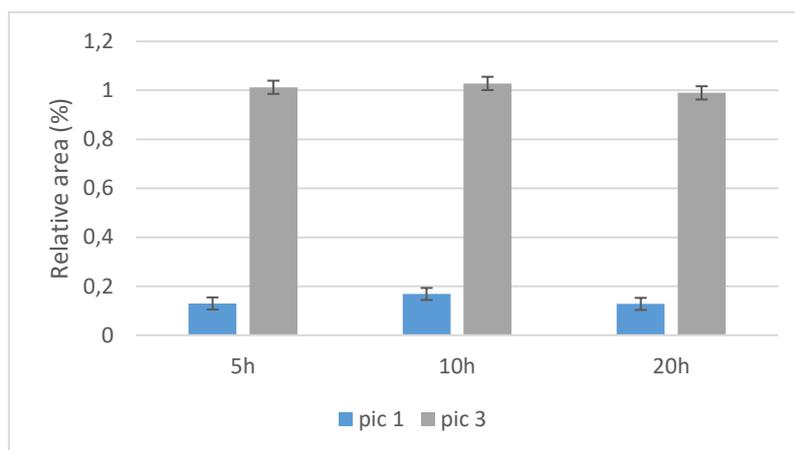
Supplementary Information



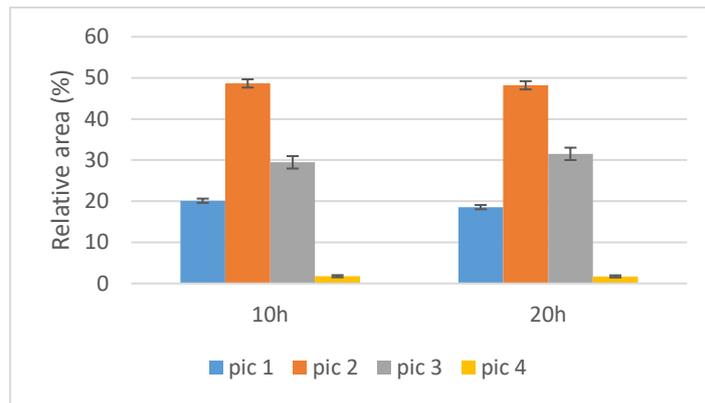
S1: Relative percentages of aggregates obtained by SEC-FLD for Pertuzumab after various stress conditions: UV, agitation (RPM), Thermal (TEMP) at 0h, 5h, 10h, and 20h of exposure. Relative percentages are based on total area. (n=5)



S2: Relative percentages of aggregates obtained by SEC-FLD for Pembrolizumab after various stress conditions: agitation (RPM), Thermal (T) at 0h, 10h, and 20h of exposure. Taking into account that for UV stress and 20h agitation stress, the SEC column has not handled aggregates, as they were too big. Relative percentages are based on total area. (n=5)



S3: Evolution of relative area (%) of Pertuzumab HIC-FLD profiles after agitation stress for 5h, 10h, and 20h of exposure. Relative percentages are based on total area.



S4: Evolution of relative area (%) of Pembrolizumab HIC-FLD profiles after agitation stress for 5h and 10h of exposure. Relative percentages are based on total area.

3. ÉTUDES DES STRUCTURES ET CONFORMATIONS

Afin de mieux comprendre les résultats obtenus par icIEF-PCA, des études complémentaires ont été réalisées. Les variants de taille ont été analysés par SEC-FLD et les variants d'hydrophobicité par HIC-FLD. Ces analyses ont permis de mettre en évidence, notamment, la présence d'agrégats ou de variants hydrophiles. Cependant, certaines modifications visibles en icIEF-PCA n'ont pas été mises en évidence par ces deux techniques. En effet, les différences entre les variants de charge observés par icIEF-PCA pourraient s'expliquer par des modifications liées à des changements dans la répartition des charges qui résulteraient de changements conformationnels. Dans ce contexte, une étude des conformations et des structures pouvant être adoptées par chacun des anticorps lorsqu'ils ont été soumis à un stress est nécessaire pour répondre à cette question. Ainsi, l'Infliximab et le Pembrolizumab soumis à différents stress ont été analysés à l'aide du dichroïsme circulaire et du couplage chromatographie d'exclusion stérique-mobilité ionique et spectrométrie de masse (SEC-IM-MS).

5.3.1 Étude de la structure secondaire des échantillons dégradés par dichroïsme circulaire (UV lointain)

5.3.1.1 Principe du dichroïsme circulaire

En plus des caractérisations classiques des variants de taille, de charge et d'hydrophobicité, la réglementation requiert des informations sur la structure d'ordre supérieur, notamment la structure secondaire (hélice- α , feuillets- β) et la structure tertiaire. Pour les protéines de masses molaires élevées telles que les anticorps monoclonaux, une des techniques les plus couramment utilisées est le dichroïsme circulaire (*Circular Dichroism*, CD) [327], [237], [239]. La structure secondaire d'une protéine est étudiée par CD en utilisant la gamme de longueurs d'onde, UV proches ou lointains. Les UV lointains (190–250 nm) correspondent aux régions où la liaison peptidique est active. En revanche, la région de longueur d'onde des UV proches (250–340 nm) peut détecter des changements dans l'orientation relative des résidus aromatiques internes tels que les tryptophanes (266, 295–305 nm), les tyrosines (265–290 nm) et les phénylalanines (265 nm), et peuvent donner un aperçu des changements dans la structure tertiaire globale d'une protéine. Néanmoins, la détection dans la gamme des UV proches nécessite des concentrations en échantillons plus élevées pour détecter les variations. Or, la taille de cuve à disposition contraignait à utiliser des volumes d'échantillons concentrés trop importants, ce qui ne nous a pas permis de poursuivre l'étude sur les UV proches. Notre étude s'est donc limitée aux spectres obtenus dans les UV lointains. Dans l'intervalle de longueur d'onde des UV lointains (250–190 nm), les différentes régions des spectres obtenus par dichroïsme peuvent être associées à l'adoption par la protéine de structures particulières. La **Figure 59** montre des spectres obtenus par CD, pour des longueurs d'ondes correspondantes aux UV lointains, caractéristiques pour une protéine entièrement hélice- α (rouge), une entièrement feuillet- β (vert) et une protéine de structure aléatoire (bleu). Dans un

spectre de CD typique, l'absence de signal signifie l'absence de dichroïsme circulaire, un signal négatif signifie l'absorption de la lumière polarisée circulairement gauche et un signal positif signifie l'absorption de la lumière polarisée circulairement droite.

Le spectre d'une protéine entièrement hélicoïdale (hélice- α) présente deux bandes négatives d'amplitude similaire, à 222 et 208 nm, et une bande positive à ~ 190 nm (**Figure 59**). La bande à 222 nm est liée à la présence de fortes liaisons hydrogène des hélices. Le spectre d'une protéine constituée uniquement de feuillet- β a une bande négative de 210 à 220 nm et une bande positive de 195 à 200 nm (**Figure 59**). Les spectres des protéines en feuillet sont plus diversifiés que ceux des protéines en hélice. En effet, les feuillets peuvent être présents dans des conformations parallèles, antiparallèles ou mixtes, et peuvent présenter plusieurs conformations différentes. Le spectre d'une protéine désordonnée (aléatoire) présente une bande négative de grande amplitude à environ 200 nm (**Figure 59**). Dans le cas des anticorps, les spectres résultants correspondent à la somme des spectres de chaque type de structure. Des logiciels spécifiques peuvent être utilisés pour décomposer le spectre et donner la proportion de chaque structure.

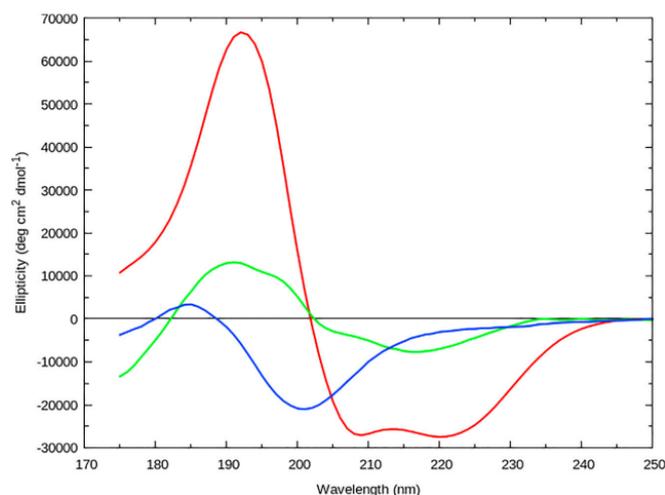


Figure 59 : Spectres CD dans les UV lointains de protéines comportant uniquement des hélices- α (rouge), des feuillets- β (vert) et une protéine de bobine aléatoire (bleu) [328].

De manière générale, les immunoglobulines sont des protéines riches en feuillets β et pauvres en hélices α [329], [18]. Des études réalisées à l'aide d'Acm IgG1 montrent que des changements dans la structure d'ordre supérieur sont parfois détectés par spectroscopie CD et/ou FT-IR. Ceci dans des échantillons de produits qui ont subi un stress extrême, ce qui est peu probable lors de la production en routine (e.g. incubation à haute température (90 °C [104])).

Dans notre étude, les stress appliqués sont relativement modérés, c'est pourquoi très peu de modifications sont attendues. Afin d'interpréter ces spectres obtenus après analyse d'échantillons soumis à différents stress, des analyses par PCA ont été effectuées. Le but est de déterminer s'il est possible de discriminer les populations

stressées et non stressées, et ainsi confirmer que les changements observés en icIEF peuvent être dus à des changements de structure. Cette méthode peut donc être une approche complémentaire à celles étudiées précédemment dans ce chapitre.

5.3.1.2 Méthode appliquée pour l'étude des structures secondaires

Le dichroïsme circulaire a été utilisé pour étudier les changements conformationnels dans la structure secondaire des Acms après le stress. Les spectres des Acms ont été collectés à l'aide d'un spectropolarimètre JASCO J-815 (JASCO, Tokyo, Japon) équipé d'un dispositif de contrôle de température Peltier. Pour toutes les mesures, la température a été fixée à 4°C. La concentration d'Acms dans les échantillons de solution à tester est ajustée à 0,15 mg/mL. L'acquisition des spectres est effectuée aux longueurs d'ondes comprises entre 190 à 250 nm avec un pas de 0,5 nm et une vitesse de balayage de 50 nm/min. Quatre accumulations ont été moyennées pour l'obtention du signal, avec une largeur de bande de 1 nm. Une cuvette en quartz avec un trajet optique de 1 mm a été utilisée. L'échantillon de blanc est soustrait à tous les autres signaux. Après soustraction du blanc (eau milliQ), les spectres sont lissés (Savitzky Golay, 18 points polynôme d'ordre 3). Enfin, une sélection des variables apportant la plus grande variabilité entre les signaux est effectuée en utilisant les VIP comme expliqué dans la partie 2 de ce chapitre. Seules les variables avec un score > 1.0 ont été sélectionnées. Cette dernière opération a permis de limiter le nombre de variables à 55 (au lieu de 121 initialement). Chaque condition a été répétée six fois. Une fois les spectres modifiés, des PCA sont effectuées à l'aide du logiciel XLstat.

5.3.1.3 Impact des stress sur la structure secondaire (dichroïsme circulaire)

a) Infiximab

Les analyses en dichroïsme circulaire ont été réalisées de 190 à 250 nm (UV lointain) donnant accès aux modifications de structures secondaires.

L'ensemble des modifications observées en dichroïsme circulaire pourrait expliquer le changement de répartition des charges constaté en icIEF-PCA. En effet, lorsque la répartition des charges est modifiée, la migration des différents variants de charges au sein du capillaire de l'icIEF est également impactée. Il en résulte des différences aux niveaux des profils obtenus. De plus, la PCA permet donc de valoriser les différences et d'effectuer les corrélations entre le stress et le profil obtenu. Par conséquent, les observations réalisées en CD peuvent, selon les dégradations engendrées sur les anticorps, être corrélées à celles obtenues en icIEF.

Lorsque les spectres sont superposés, quel que soit le stress, les spectres correspondant aux échantillons natifs sont facilement discriminés des échantillons soumis à un stress. La **Figure 60A** illustre l'effet du stress UV sur le spectre à différents temps d'exposition (5h, 10h, 20h). De même, la **Figure 60B** présente les effets du stress thermique (30°C) et la **Figure 60C** ceux du stress par agitation (300 rpm) à différents temps d'exposition également.

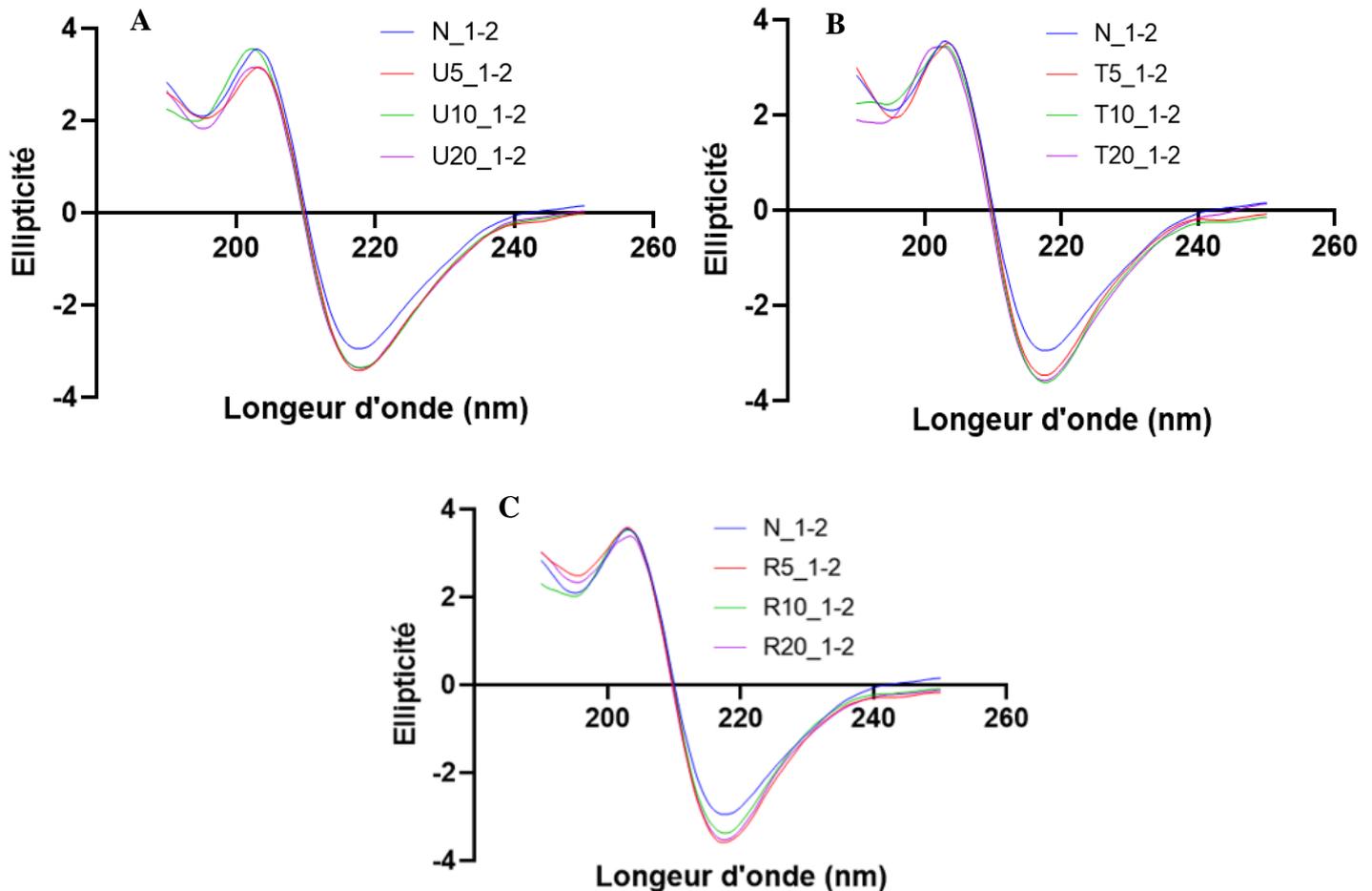


Figure 60 : Superposition de spectres obtenus par CD (UV lointains) d'échantillons d'Infliximab natifs et dégradés : **(A)** Effet du stress UV, **(B)** stress thermique 30°C, **(C)** stress par agitation 300 rpm à température ambiante. Chaque condition de stress a été testée pour des durées de 5h, 10h et 20h d'exposition. Les échantillons ont été dilués à 0,15 mg.mL⁻¹, l'ellipticité (mdeg).

Pour les stress UV et 30°C, les trois temps d'expositions montrent une modification quasi similaire des spectres. En effet, les spectres correspondant aux échantillons natifs sont largement discriminés des échantillons stressés. En revanche, les changements observés entre les spectres semblent être superposables quel que soit le temps d'exposition.

Dans le cas de l'agitation, les spectres correspondant aux échantillons natifs sont également discriminés des échantillons stressés. Cependant, l'échantillon correspondant à une exposition de 10h présente un spectre intermédiaire entre ceux correspondant aux échantillons natifs et les échantillons exposés pendant 5h et 20h.

Cela suppose que l'anticorps adopte une structure secondaire intermédiaire.

Afin de confirmer les tendances observées en superposant les spectres, ceux-ci (6 répétitions par conditions avec 10 conditions par anticorps) ont été utilisés pour réaliser des analyses en composantes principales à partir de ce jeu de données.

Des analyses en composantes principales (PCA) pour chacun des stress ont été réalisées (UV, thermal, agitation), 25 individus sont comptés pour chaque PCA. Les scores sur les trois représentations étaient satisfaisants (**Figure 61**). Cependant, une multiplication du nombre d'individus devrait être réalisée pour conforter les résultats. Pour le stress UV (**Figure 61A**) et le stress thermique (**Figure 61B**), comme supposé, après observation de la superposition des spectres du CD, les individus correspondants aux échantillons stressés sont bien discriminés des individus correspondants aux échantillons natifs. Dans le cas des stress UV, les individus sont répartis aléatoirement quel que soit le temps d'exposition au stress, avec un score pour (PC1, PC2) de 93%. Alors que les résultats obtenus après analyse icIEF-PCA ont montré une évolution en fonction du temps d'exposition le long de l'axe PC1 (**Figure 3A, article 2**). Par conséquent, l'icIEF apporte une discrimination supplémentaire entre les échantillons stressés par UV selon la durée de leur exposition.

En revanche, pour le stress thermique (**Figure 61B**), une tendance selon le temps d'exposition est observée. Plus le temps d'exposition est important, plus les individus sont éloignés du nuage de points correspondant aux échantillons natifs. Le score pour cette analyse en composante principale est de 92%. Cela suggère que la structure est de plus en plus affectée lorsque l'échantillon est soumis à une température de 30°C pendant plusieurs heures.

Enfin, pour le stress par agitation (**Figure 61C**), les nuages de points obtenus à partir des spectres CD, correspondants aux échantillons natifs et stressés durant 10 h, ne sont pas aussi distinctement séparés par comparaison aux autres conditions. Les individus des échantillons exposés pendant 5 h et 20 h sont, néanmoins, répartis aléatoirement et discriminés des échantillons natifs. Un score de 91% pour les deux premières composantes est obtenu.

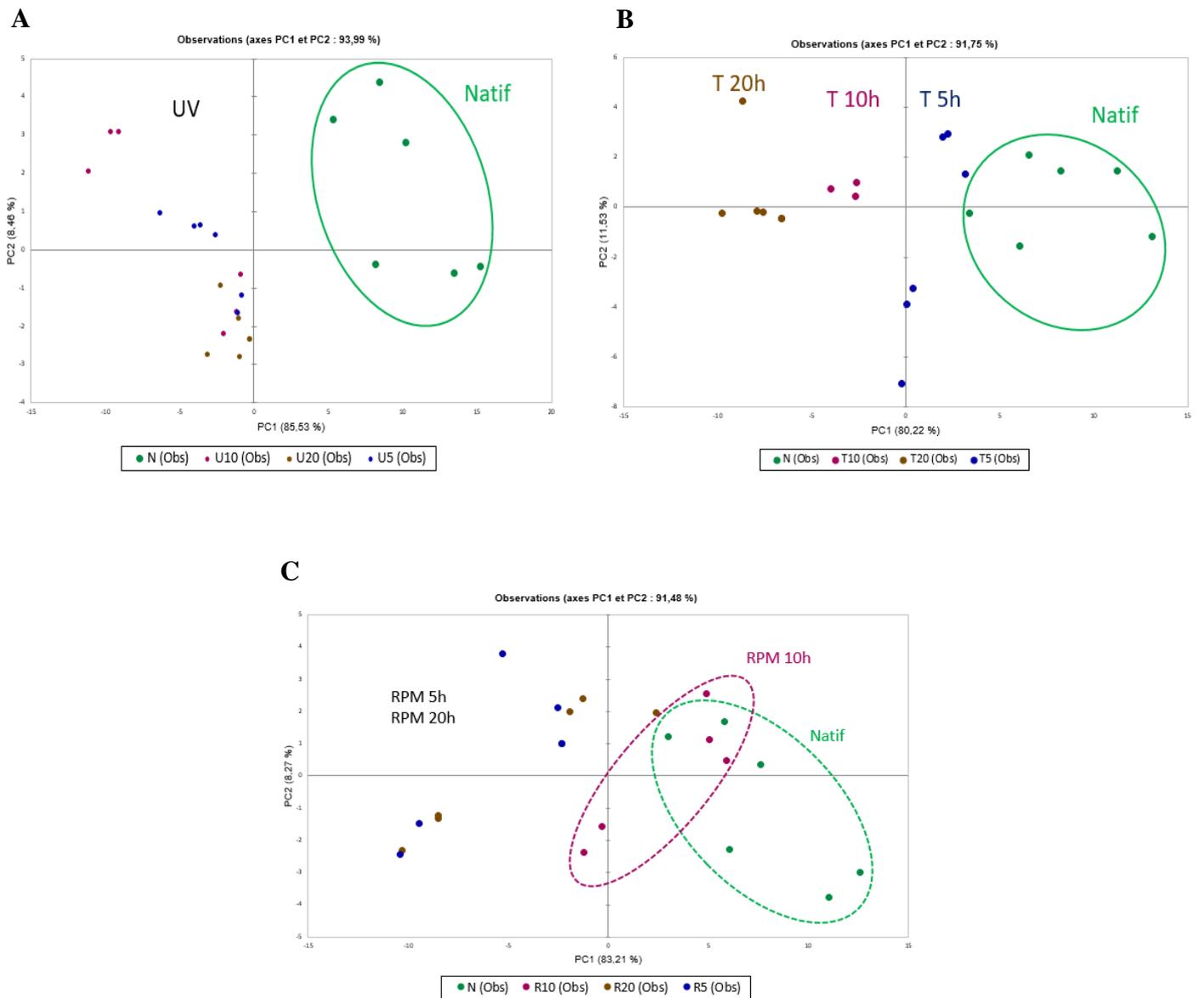


Figure 61 : PCA obtenues à partir des spectres CD (UV lointain) de l'Infliximab natif et stressé **(A)** PCA du stress par exposition aux UV, **(B)** par maintien de la température à 30°C, **(C)** par agitation 300 rpm. L'exposition aux stress est de 5h, 10h, 20h dans chaque condition. Les spectres ont été prétraités par soustraction du blanc et lissage.

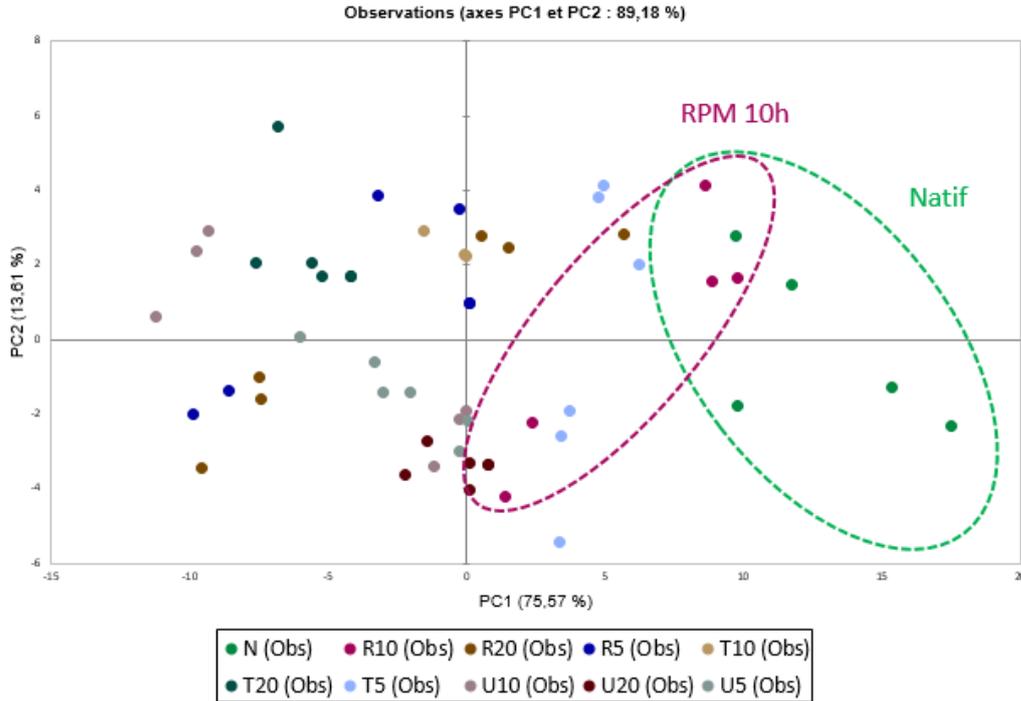


Figure 62 : PCA obtenus à partir des spectres CD (UV lointain) de l’Infliximab natif et stressé (UV, 30°C, agitation 300 rpm). L’exposition aux stress est de 5h, 10h, 20h dans chaque condition. Total de 65 individus.

La représentation de l’ensemble des individus quel que soit le stress est présentée en **Figure 62** avec un score de 89%. Dans le cas de l’Infliximab, les résultats obtenus par PCA issus des spectres CD sont en accord avec ceux issus de l’icIEF-PCA. En effet, échantillons natifs et stressés sont discriminés, à l’exception du stress par agitation, pour le CD. Cela peut s’expliquer par le fait qu’il s’agit de l’un des stress le moins impactant. Cependant, avec l’icIEF pour les échantillons stressés par UV, une tendance selon les heures d’exposition a été observée, ce qui n’est pas le cas avec le CD. À l’inverse, pour le stress thermique, le dichroïsme circulaire permet d’observer une évolution progressive en fonction de la durée d’exposition, contrairement à l’icIEF-PCA (**Figure 3C, article 2**).

Ces résultats en CD montrent donc que les trois stress étudiés ont pu affecter la structure secondaire de l’Infliximab. Cela peut, par conséquent, expliquer que la répartition des charges ait pu être modifiée lorsque l’Acm est stressé, et ainsi justifier les différences entre les électrophérogrammes obtenus par icIEF. Cependant, comme le montre les exemples des stress UV et thermiques, les impacts sur la structure secondaire dépendent des stress. Bien que la structure et répartition des charges soient liées et s’impactent mutuellement ; certains stress favorisent des modifications chimiques sans pour autant affecter la structure (UV), tandis que d’autres directement impactent la structure sans imposer de changements très significatifs dans la répartition des charges (30°C) [62].

b) Pembrolizumab

La même étude a été réalisée pour le Pembrolizumab, lorsque les spectres sont superposés, quel que soit le stress, les spectres correspondant aux échantillons natifs sont facilement discriminés. La **Figure 63A** illustre l'effet du stress UV sur le spectre à différents temps d'exposition (5h, 10h, 20h). De même, la **Figure 63B** présente les effets du stress thermique (30°C) et la **Figure 63C** ceux du stress par agitation (300 rpm) à 5h, 10h, et 20h d'exposition.

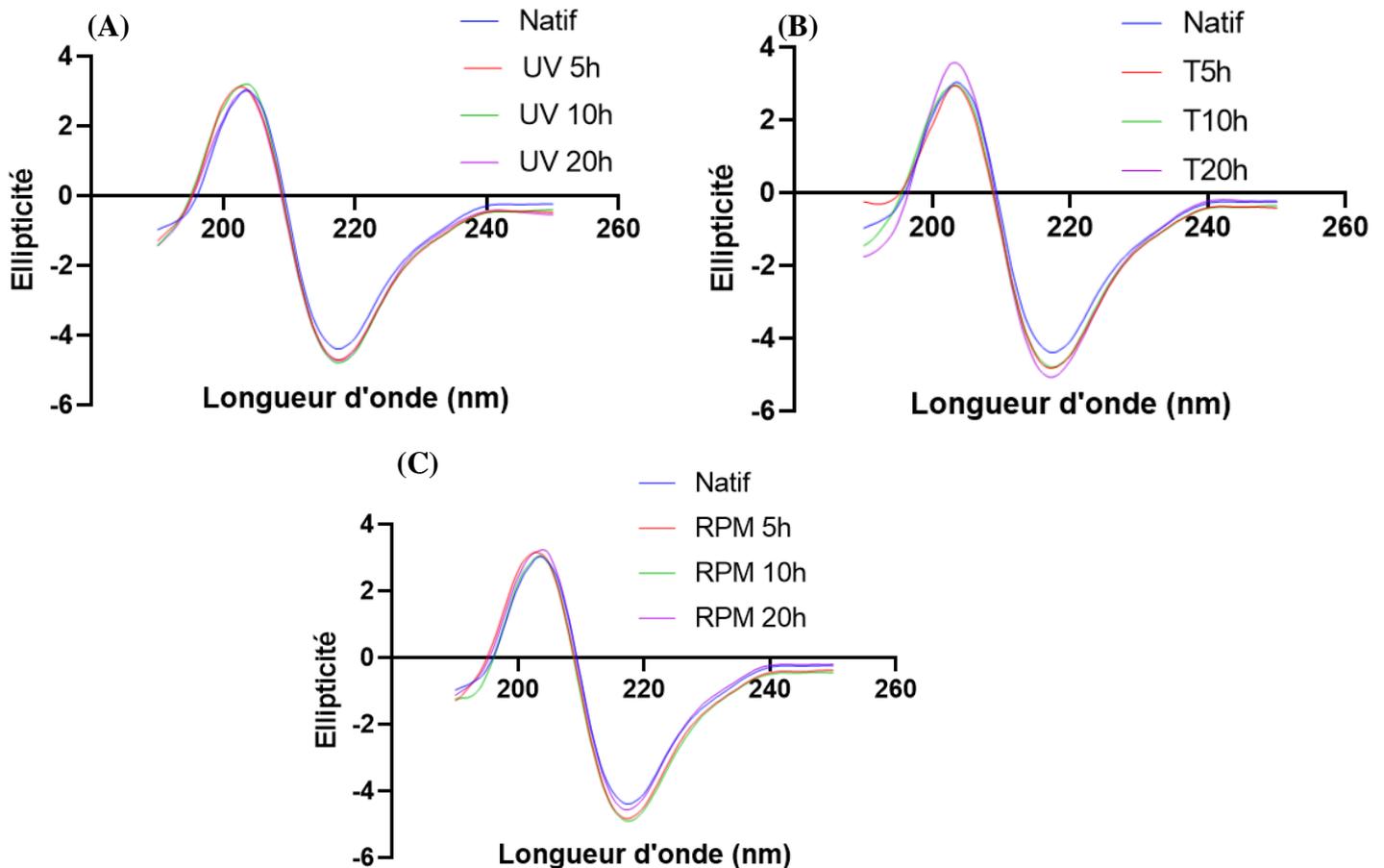


Figure 63 : Superposition de spectres obtenus par CD (UV lointains) d'échantillons de Pembrolizumab natifs et dégradés : **(A)** Effet du stress UV, **(B)** stress thermique 30°C, **(C)** stress par agitation 300rpm. Chaque condition de stress a été testée pour des durées de 5h, 10h et 20h d'exposition. Les échantillons ont été dilués à 0,15 mg mL⁻¹. Les spectres ont été prétraités par soustraction du blanc et lissage. Ellipticité (mdeg).

Pour le stress UV, on observe avec le Pembrolizumab, les mêmes effets que ceux observés pour l'Infliximab. Quel que soit le temps d'exposition, les trois spectres sont superposés et sont différents de l'échantillon natif (**Figure 63A**). Comme en icIEF, les échantillons sont bien discriminés entre les natifs et ceux exposés aux UV (Figure 5A, article 2), cependant le DC ne permet pas de constater l'évolution en fonction du temps d'exposition. Concernant le stress thermique, les spectres indiquent une structure significativement différente entre les échantillons natifs et les échantillons stressés à 30°C après 5h et 10h d'exposition. Cette différence est encore plus significative avec

les échantillons stressés à 30°C pendant 20h, ce qui montrerait une modification conformationnelle plus importante encore. A contrario en icIEF, les échantillons exposés à 30°C n'étaient pas discriminés (**Figure 5C, article 2**).

Pour le stress par agitation, les spectres obtenus après une exposition de 5h et 10h semblent montrer des échantillons de structures proches. En revanche après 20h sous agitation, la structure de l'anticorps stressé semble plus proche de celle de l'échantillon natif. Par ailleurs, en icIEF-PCA, un recouvrement des nuages de points correspondant aux échantillons natifs et stressés à 300 rpm pendant 20 h est obtenu (**Figure 5B, article 2**). Les différences de structures observées en DC est donc en accord avec les évolutions observées par icIEF-PCA. Les résultats sont en faveur d'une dégradation au cours du temps, avec une modification de structure entraînant un changement dans la répartition des charges. On peut supposer que cette modification entraîne des écarts très importants entre les Acms natif et les Acms soumis à 10h d'exposition à 30 °C. Après 20h d'exposition au stress par agitation, la structure secondaire et les répartitions des charges de l'Acm seraient plus proches de celles des échantillons natifs (**Figure 63C**). Un autre état de dégradation est atteint après 20h sous agitation mais dont les propriétés se rapprochent de celles de l'état natif.

Enfin, une analyse chimiométrique des spectres obtenus après analyse par dichroïsme circulaire a été effectuée afin d'observer les tendances pour le Pembrolizumab (**Figure 64**). Un score sur (PC1, PC2) de 65% est obtenu. Malgré le peu de points disponibles, on remarque que les échantillons natifs sont nettement séparés des échantillons stressés. Du fait du nombre d'individu limité, l'analyse stress par stress n'a pas été réalisée. Néanmoins, il est possible de confirmer que les stress ont pu impacter la structure secondaire des anticorps ce qui est en faveur des conclusions établies par icIEF-PCA (**Figure 4B, article 2**).

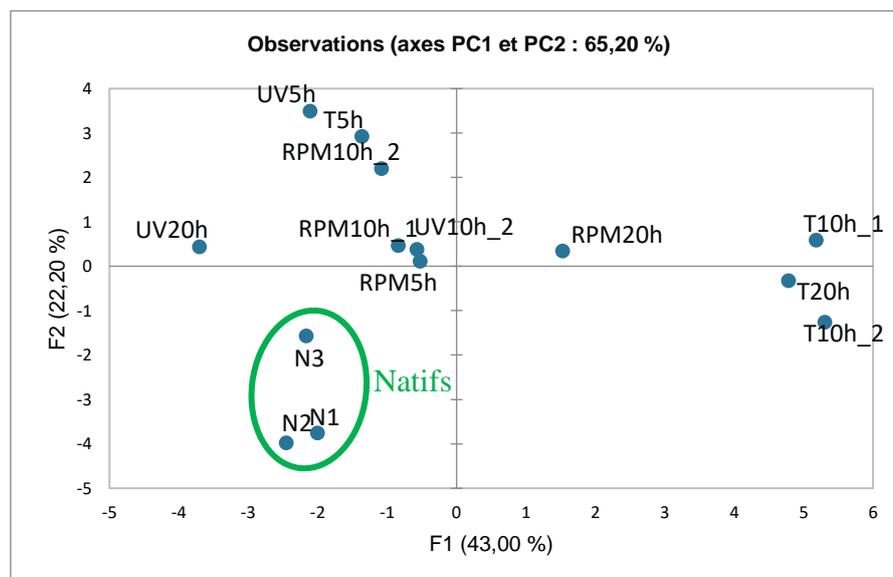


Figure 64 : PCA obtenus à partir des spectres CD (UV lointain) du Pembrolizumab natif et stressé (UV, 30°C, agitation 300 rpm). L'exposition aux stress est de 5h, 10h, 20h dans chacune des conditions. Total de 14 individus.

5.3.1.4 Conclusions du dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire a permis de montrer que bien que les stress soient modérés, les structures secondaires sont impactées. Les résultats sont en accord avec ceux obtenus après analyse par icIEF-PCA. En effet, pour le stress UV quel que soit l'anticorps, il a été montré en icIEF, que plus le temps d'exposition est important, plus la structure est dégradée. Sur les spectres de DC cela se traduit par des décalages d'intensité (ellipticité) et une analyse par PCA des spectres permet de discriminer les échantillons natifs de ceux ayant été soumis à un stress-UV. Les résultats sont donc cohérents avec ceux obtenus en icIEF-PCA. Cependant, les résultats de l'icIEF permettent d'accéder pour le stress UV à plus d'informations sur les temps d'exposition. Cela permet de supposer que les modifications de la répartition des charges en fonction de l'exposition aux UV est probablement davantage liée à des modifications chimiques.

Pour le stress thermique, à l'inverse, le dichroïsme circulaire met en évidence les durées d'exposition contrairement à l'icIEF. Cela suppose que ce stress affecte premièrement la structure mais peu la répartition des charges.

Le stress par agitation étant plus modéré, l'impact dépend de l'anticorps. Cependant, quel que soit l'anticorps les différences entre les échantillons stressés et non stressés sont significatives. De plus, les tendances remarquées en icIEF-PCA, sont confirmées par le dichroïsme circulaire, notamment pour le Pembrolizumab. Ces résultats confortent les discriminations obtenues entre les échantillons natifs et stressés dans les deux techniques.

En conclusion, le dichroïsme circulaire et l'icIEF apportent des résultats complémentaires selon les stress. Chaque stress ayant sur les anticorps des effets plus ou moins importants sur les charges ou les structures secondaires. Les résultats en dichroïsme circulaire (UV lointains) doivent donc être confrontés à une étude plus approfondie des conformations, pour vérifier si le changement de structure a été ou non accompagné d'un changement de conformation. Dans ce contexte, nous avons donc choisi d'étudier par mobilité ionique les différents échantillons dégradés afin de déterminer si l'impact des stress est corrélé à des changements conformationnels.

5.3.2 Étude de la structure tertiaire des échantillons dégradés par mobilité ionique

5.3.2.1 Introduction des études de conformation par mobilité ionique

Lorsque les Acms sont physiquement dégradés, plusieurs conformères coexistent. Ceux-ci peuvent être repliés, dépliés ou agrégés [181]. Comme les modifications des structures d'ordres supérieurs peuvent influencer l'immunogénicité et l'activité biologique des Acms, une caractérisation approfondie des structures tertiaires des Acms est cruciale pour garantir la stabilité, la sécurité et l'efficacité des produits biopharmaceutiques tout au long du développement de produits médicamenteux.

La mobilité ionique (*Ionic Mobility*, IM) est une technique qui permet de rendre compte de la présence de ces différents conformères et de comparer leurs états. Celle-ci effectue une séparation selon la taille, la forme et la charge des analytes (anticorps ionisés). Cette technique est souvent associée avec spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*, MS) et fournit une dimension supplémentaire de séparations. [330]

Le principe de la mobilité ionique est décrit dans le **Chapitre II**. Brièvement, la IM sépare les ions (anticorps ionisés) en fonction de leurs mobilités en phase gazeuse. La distribution des différentes populations est donnée par le temps de dérive, celui-ci renseigne sur les hétérogénéités et homogénéités conformationnelles [331]. Les temps de dérive peuvent ensuite être convertis en sections efficaces de collision moyennes en rotation (CCS, Ω), qui reflètent les conformations tridimensionnelles des ions dans la phase gazeuse [242], [332]. Cependant, cette conversion nécessite l'usage de standard et de logiciel que nous n'avons pas à disposition. Nos interprétations se basent donc sur les profils des mobilogrammes et les différences de temps de dérive.

L'une des difficultés liées à l'étude des conformations est le maintien de celles-ci malgré les étapes de préparation d'échantillons et les techniques d'analyses employées [333]. Il est essentiel de pouvoir caractériser ces différentes formes sans les perturber, c'est-à-dire sans altérer le repliement-dépliement de la protéine ou les interactions faibles entre les oligomères. Dans ce contexte, le couplage de la MS native à une méthode séparative telle que la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) permet le maintien des biomolécules dans leurs conformations natives. La composition des phases mobiles est donc cruciale pour permettre en même temps une analyse MS convenable et éviter la dénaturation des Acms [334].

L'objectif de notre travail était de compléter les études de dégradations forcées réalisées précédemment, et notamment, d'établir le lien entre les modifications de conformations et les résultats obtenus par icIEF-PCA.

5.3.2.2 *Méthode SEC-IM-MS en conditions natives*

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées à l'aide d'une UPLC Acquity class I (Waters, Manchester, UK) couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (QToF), (Synapt G2-Si, Waters Company, Manchester, UK) équipé d'un « TWIM », Travelling Wave Ion Mobility. Ce dernier permet la séparation des conformères en fonction de leur charge, leur forme et de leur section efficace de collision (Ω en Å^2). La section efficace de collision est la surface accessible au gaz tampon (azote) sous tous les angles.

L'acquisition des spectres de masses est réalisée pour une gamme allant de 500 à 8000 m/z et en mode d'ionisation positif. Les paramètres instrumentaux suivants ont été appliqués : tension de capillaire à 4,5 kV, cône d'échantillonnage à 150 V, « offset » est de 150 V, pression du gaz de nébulisation à 5 bars, température de la source à 40°C, température de désolvatation à 75 °C. Le gaz tampon utilisé dans la cellule de mobilité

ionique est l'azote. Les paramètres du TWIM étaient : débit de gaz du piège à $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; débit de gaz IMS à $45 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, vitesse des vagues à $300 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ et hauteur des vagues de 4 V pour la partie « Trap », débit de gaz de la cellule d'He à $120 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, vitesse de la vague de potentiels dans la cellule de mobilité ionique (« TWIM ») à $800 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, et hauteur de la vague à 40V, vitesse de la vague dans le module de transfert à $110 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ et pour une hauteur de vague de 4V.

À partir des mobilogrammes, grâce à MassLynx, un spectre de masse est reconstruit et pour chaque état de charge (m/z), le mobilogramme individuel peut être extrait. En particulier, les informations suivantes sont extraites : les temps de dérive (t_d) et les intensités des ions à l'aide du logiciel MassLynx. Toutes les données, m/z , temps de dérives, intensités, sont alors rassemblées dans un fichier Excel. À partir de ce fichier, il est possible de déterminer les abondances des conformères à l'aide d'une feuille Excel (profil conformationnel quantitatif). On peut aussi visualiser le profil conformationnel qualitatif des anticorps à l'aide du logiciel Driftscope qui permet une détection automatique des pics. L'ensemble des données sont regroupées dans un fichier (csv). Ensuite, un logiciel « maison » (Peak apex 3D) permet de tracer le profil conformationnel qualitatif des anticorps ($\Omega = f(z)$).

Les données de mobilité ionique, pour chaque état de charge, sont retraitées à l'aide du logiciel Origin™. Cela permet de visualiser les effets de différents stress pour chaque état de charge en comparant pour chacun d'eux les profils des mobilogrammes. Il faut noter ici, que l'on ne peut comparer les résultats de mobilité ionique que pour un même état de charge (effet des répulsions Coulombiennes). Les mobilogrammes sont présentés après standardisation.

En amont de la mobilité ionique, une séparation des « objets » est obtenue à l'aide d'une colonne de chromatographie d'exclusion stérique. Cette dernière est une colonne TSKgel SW3000 (1 I.D. x 300 mm), $4 \mu\text{m}$, 250\AA ; Tosoh Bioscience) qui permet de travailler avec de faibles quantités d'échantillons. La phase mobile a été adaptée pour permettre la détection des anticorps par MS en conditions natives (100 mM d'Acétate d'ammonium, pH 7) et le débit est de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. $10 \mu\text{L}$ d'échantillon sont injectés sur la colonne. Afin d'obtenir une intensité de signal suffisante, les échantillons ont été préconcentrés par un dispositif de filtration sur membrane (Nanosep 100K). Ce dispositif permet de concentrer l'ensemble des molécules dont la masse molaire est supérieure à 100kDa. L'étape de centrifugation est réalisée pendant 4 min à 4G.

5.3.2.3 Résultats obtenus par SEC-IM-MS

L'ensemble des mobilogrammes comparés ci-dessous correspondent à l'état de charge (+26), en effet, il s'agit de l'état de charge commun que l'on retrouve sur les trois répétitions d'expériences.

a) L'Infliximab

Au regard des analyses précédentes (effectuées par icIEF, SEC-FLD et HIC-FLD et CD), l'Infliximab est l'anticorps le plus sensible aux stress, la formation d'agrégats et des modifications de variants de charge et de structure secondaire ont pu être constatées. En mobilité ionique, lorsque les trois anticorps sont comparés, les mobilogrammes les plus modifiés sont ceux de l'Infliximab ce qui confirme les résultats obtenus par les autres techniques.

La **Figure 65** présente les mobilogrammes de l'Infliximab lorsque celui-ci est stressé, par la lumière UV (**Figure 65A**), par agitation à 300 rpm (**Figure 65B**) et par un stress thermique à 30°C (**Figure 65C**), pour chacun la superposition du mobilogramme de l'anticorps natif et de l'anticorps stressé pendant 20h est montrée. Pour chaque condition, une diminution des temps de dérive (l'ion sort de la cellule de mobilité ionique plus tôt) est observée, ce qui témoigne de la présence de conformères plus compacts. L'apparition d'une nouvelle population de conformères (pic plus large) peut également être supposée.

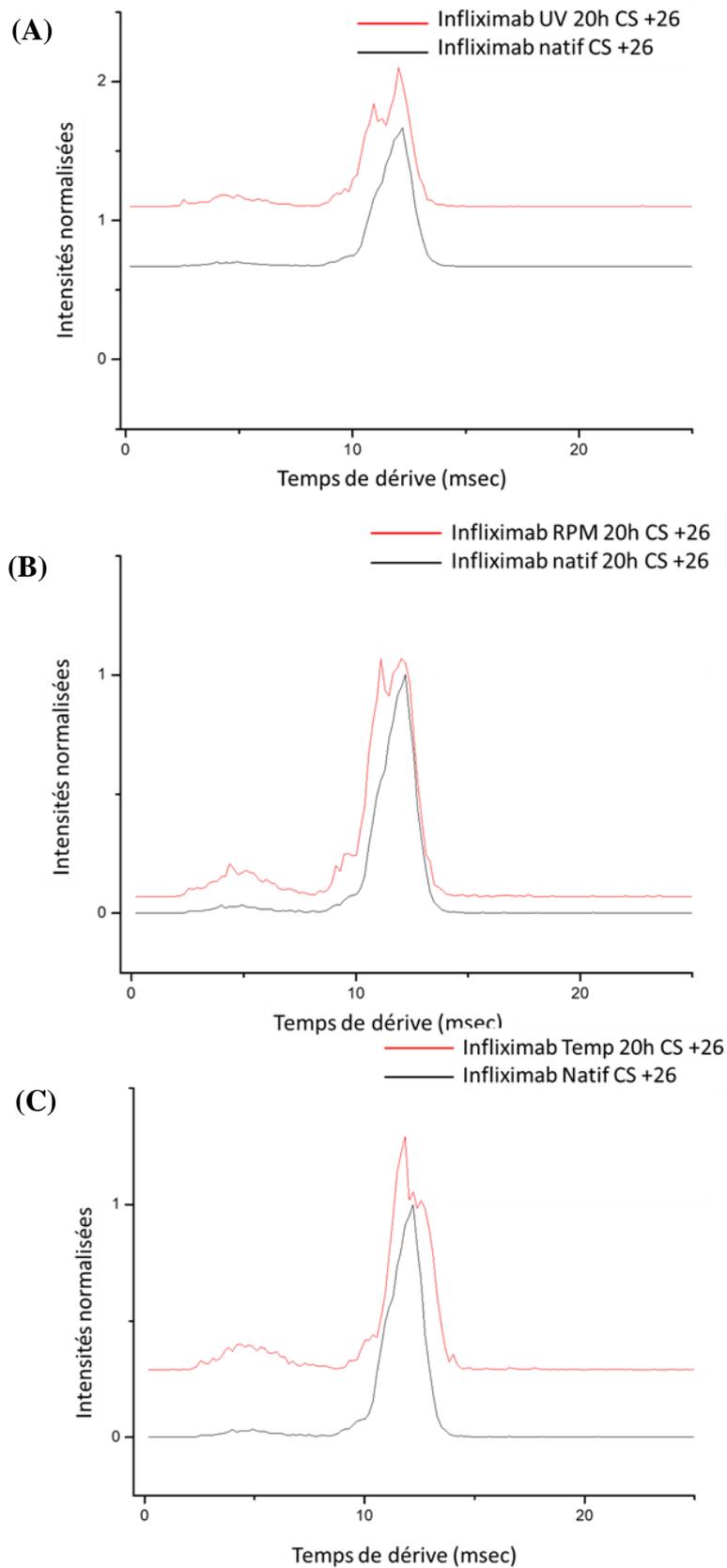


Figure 65 : Mobilogrammes de l’Infliximab natif et stressé pendant 20h, **(A)** aux UV, **(B)** par agitation, **(C)** et par chauffage à 30°C, pour l’état de charge +26.

Tout d'abord, pour le stress UV (**Figure 65A**), à 20h d'exposition, le pic principal se dédouble, ce qui signifie que deux populations de conformères sont présentes et en proportions de plus en plus importantes. Cela n'était pas le cas dans l'échantillon natif, où un seul pic large était observé. De plus, avec le stress, ces pics sont légèrement décalés vers la gauche, ce qui traduit l'apparition de conformères plus compacts. Le pic large et peu intense, à gauche du mobilogramme, correspond probablement à des dimères.

Pour les stress par agitation (**Figure 65B**) et par chauffage (**Figure 65C**), les mêmes phénomènes sont observés, un dédoublement du pic principal, avec la présence de conformères plus compacts (décalage vers les temps de dérive plus courts). De plus, l'épaulement remarqué initialement sur la gauche du pic principal devient à la suite des stress le pic en proportion majoritaire. Ce qui correspond à l'augmentation en nombre d'un conformère plus compact, en comparaison aux conformères présent initialement dans l'échantillon natif.

La **Figure 66** rend compte également de l'effet de l'UV à différents temps d'exposition par SEC-IM-MS. On observe ainsi l'augmentation progressive de l'épaulement à gauche du pic principal, qui témoigne de l'apparition de conformères plus compacts. Par ailleurs, la population émergente issue du dédoublement progressif du pic en fonction du temps d'exposition, pourrait expliquer les observations obtenues en icIEF-PCA (**Figure 3A, article 2**). En effet, une évolution progressive des variants de charge, en fonction du temps d'exposition au stress UV, est détectable en icIEF et pourrait être expliqué par les changements de conformations mis en évidence en IM.

De plus, les spectres de masse montrent aussi un déplacement de la distribution des états de charges lorsque l'échantillon est stressé. Par exemple, la **Figure 67** illustre ce décalage en comparant les spectres de masse de l'Infliximab natif et l'Infliximab stressé 10h aux UV. Ces résultats sont en faveur des observations détectées par icIEF.

Par ailleurs, en SEC-FLD des agrégats peuvent être observés, en particulier pour les échantillons stressés à l'UV pendant 20h. Cependant, ces agrégats de tailles supérieures ne sont pas observés en SEC-IM-MS. Seuls des dimères en faibles quantités sont présents lors de l'analyse par SEC-IM-MS. La préparation d'échantillon (préconcentration) ou certaines étapes de la méthode analytique utilisée (nébulisation en SEC-IM-MS) conduisent sûrement à une dissociation des oligomères initialement présents. Une autre possibilité serait que les agrégats soient présents en trop faible quantité pour être détectés. De plus, une courte étude par RPLC-MS a permis de montrer que les dimères présents étaient non covalents. En effet, la phase inverse ne permet pas de conserver les interactions faibles. Les agrégats sont entièrement dissociés lors des analyses par RPLC, il n'y a donc pas de liaisons covalentes entre les différents monomères.

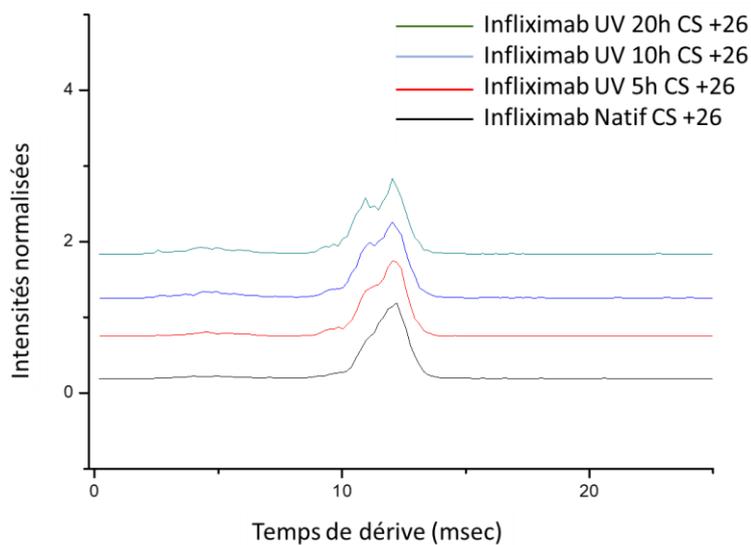


Figure 66 : Superposition des mobilogrammes de l'Infliximab natif (noir), stressé aux UV 5h (rouge), 10h (bleu) et 20h (vert).

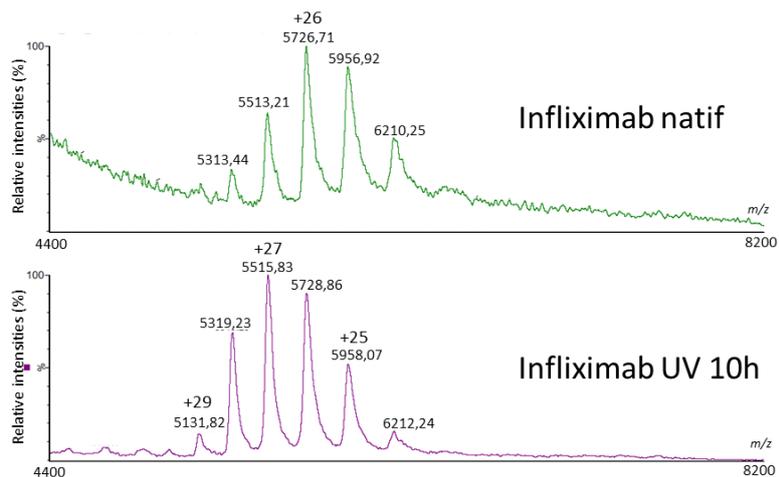


Figure 67 : Spectres de masse de l'Infliximab natif et soumis à un stress UV pendant 10h.

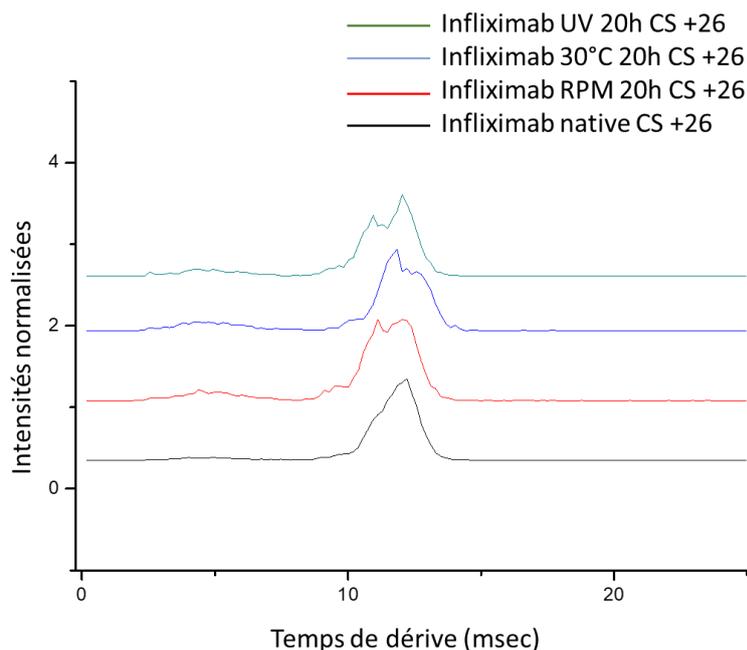


Figure 68 : Superposition des mobilogrammes de l'Infliximab natif (noir), stressé sous agitation (rouge), après chauffage (bleu) et sous UV (vert).

Dans les cas de l'agitation et de la température, il y a comme pour l'UV, une modification des abondances des populations en fonction des temps d'exposition. En effet, une augmentation de l'abondance du pic (épaulement à gauche du pic principal) s'effectue avec le temps d'exposition. Cet épaulement correspond à des conformères plus compacts (**Figure 68**). Dans toutes les conditions énoncées ci-dessus, pour l'Infliximab, il y a une redistribution de l'équilibre conformationnel, avec la « sélection » de conformères plus compacts préexistants ou l'apparition de nouveaux conformères. Ainsi, les conformères « stabilisés » sont plus ou moins compacts, et donc exposent plus ou moins de charges. Ces changements de conformations peuvent ainsi expliquer les modifications de répartitions des charges détectées par icIEF-PCA. Cela est notamment mis en valeur pour le stress par exposition de l'Infliximab aux UV, pour lequel l'icIEF-PCA permettait l'obtention d'une discrimination importante entre échantillons natifs et exposés à 5 h, 10 h, 20 h.

La **Figure 69** correspond aux mobilogrammes de l'Infliximab stressé par agitation pendant des durées différentes. Le déplacement des conformères vers des temps de dérives plus importants est observé pour un temps d'agitation de 10 h. À 10 h d'exposition, des formes plus « ouvertes » sont obtenues, puis, un retour vers des conformères plus compact est observé à 20h d'exposition. Cet exemple confirme les résultats apportés en dichroïsme circulaire, montrant que la structure secondaire de l'Infliximab stressés par agitation pendant 10h est différente de celles obtenues à 5h et 20h d'exposition. En dichroïsme, les échantillons à 10 h d'exposition sont également plus proches des échantillons d'Infliximab natifs.

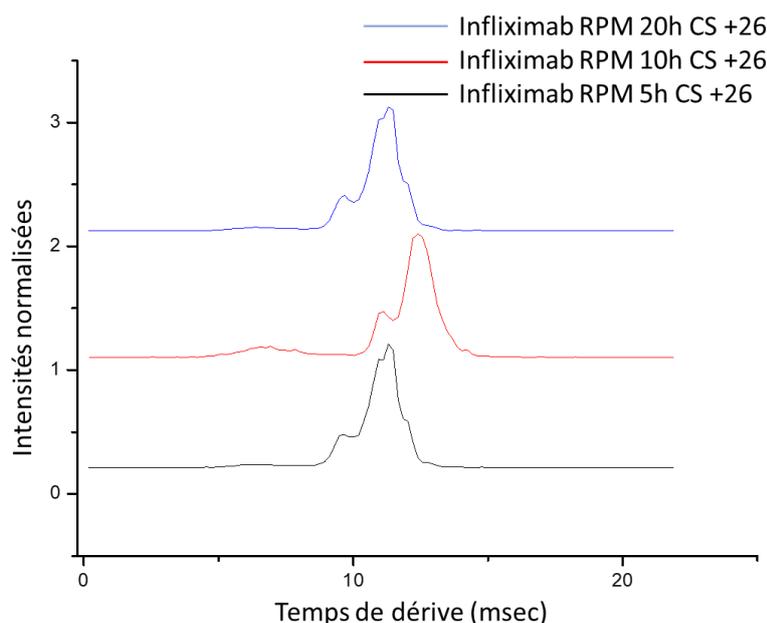


Figure 69 : Superposition de mobilogrammes de l'Infliximab pour le stress par agitation. Les différentes heures d'incubation sont représentées : 5h (noir), 10h (rouge), 20h (bleu).

L'ensemble de ces observations pour l'Infliximab est en accord avec les résultats obtenus en icIEF et dichroïsme circulaire. En effet, pour tous les stress, échantillons natifs et stressés sont discriminés par les trois techniques (icIEF, CD, et IM). De plus, pour le stress UV, la **Figure 66** a permis de mettre en évidence que le stress UV induit une seconde population de conformères plus importante que pour les deux autres stress. Cela peut expliquer les discriminations plus évidentes des échantillons stressés à l'UV obtenus en icIEF-PCA.

b) Le Pertuzumab

Dans cette étude, le Pertuzumab a été employé à défaut du Pembrolizumab, les deux anticorps ayant présentés des résultats similaires en icIEF-PCA (Figure 4 et 5, article 2). Le Pertuzumab est l'anticorps qui apparait comme le plus stable. En effet, pour le stress thermique, quelle que soit la durée d'exposition, aucune modification significative n'est observée par SEC-IM-MS (**Figure 70**). De plus, le pic est relativement fin, ce qui confirme la présence d'une unique conformation. Ainsi, pour ce stress (30°C), une répartition aléatoire des individus est obtenue par icIEF-PCA (**Figure 5C, article 2**), ce qui est justifiable. La similitude des pics (**Figure 70**), confirme qu'il n'y a pas de modifications significatives des échantillons sous l'effet de ce stress, et donc peut expliquer qu'il n'y ait pas de discrimination possible par icIEF-PCA (puisque pas de tendance).

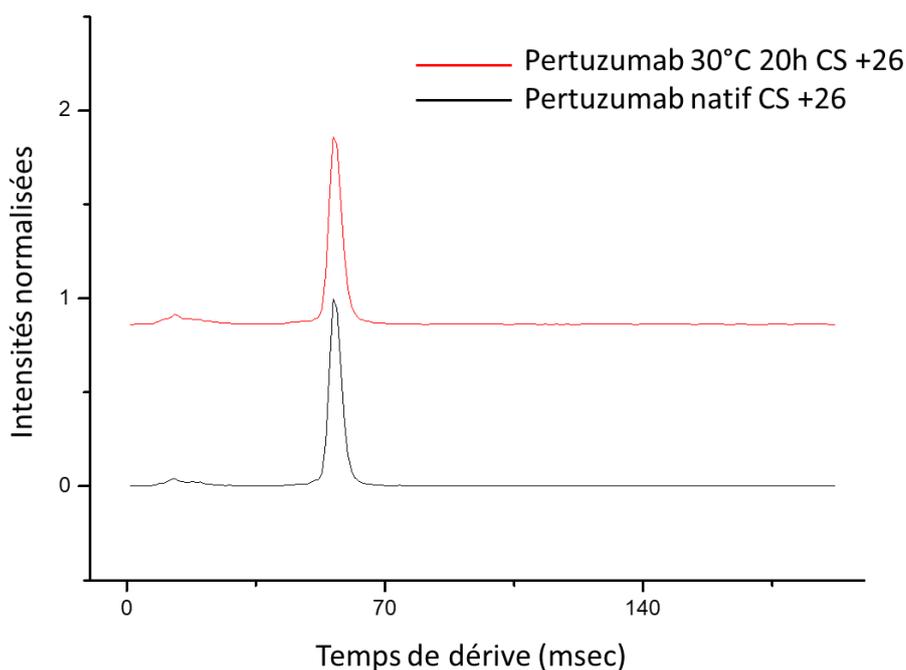


Figure 70 : représentation des mobilogrammes pour l'état de charge +26 de Pertuzumab stressé à 30°C pendant 20h (rouge), comparativement à l'anticorps non stressé (noir).

À l'inverse, pour le stress par agitation en icIEF-PCA, la superposition de certains nuages de points est observée. Les échantillons stressés durant 20h ont un profil de charges plus proche des échantillons natifs, en comparaison avec les profils des échantillons exposés au stress par agitation pendant 10h. La SEC-IM-MS permet de visualiser un faible changement du temps de dérive entre les échantillons stressés par agitation 300 rpm durant 10 h et 20 h. La **Figure 71** montre que les conformères des échantillons exposés à 5 h et 20 h adoptent un repliement similaire, tandis que l'échantillon exposé pendant 10 h est légèrement plus déplié. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus en icIEF-PCA. Cependant, les modifications des mobilogrammes étant très faibles, il est difficile de conclure que le repliement observé en IM explique la redistribution des charges observées en icIEF-PCA.

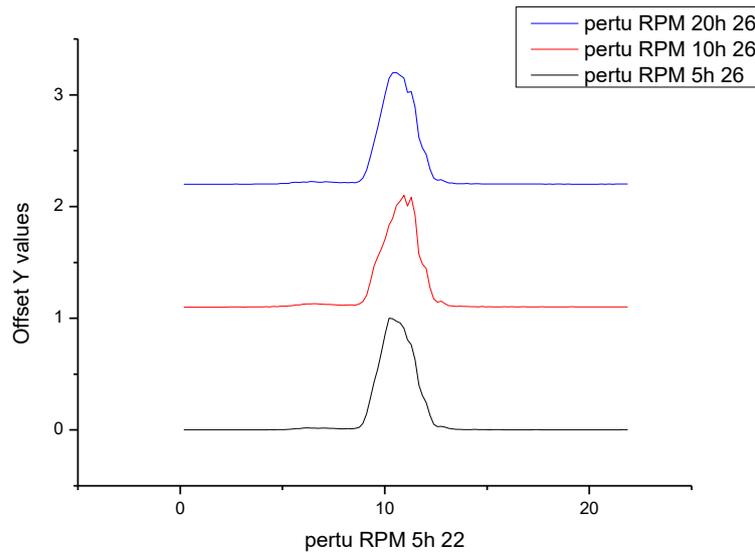


Figure 71 : Superposition des mobilogrammes du Pertuzumab stressé par agitation pour des temps d'exposition différents : 5h (noir), 10h (rouge), 20h (bleu).

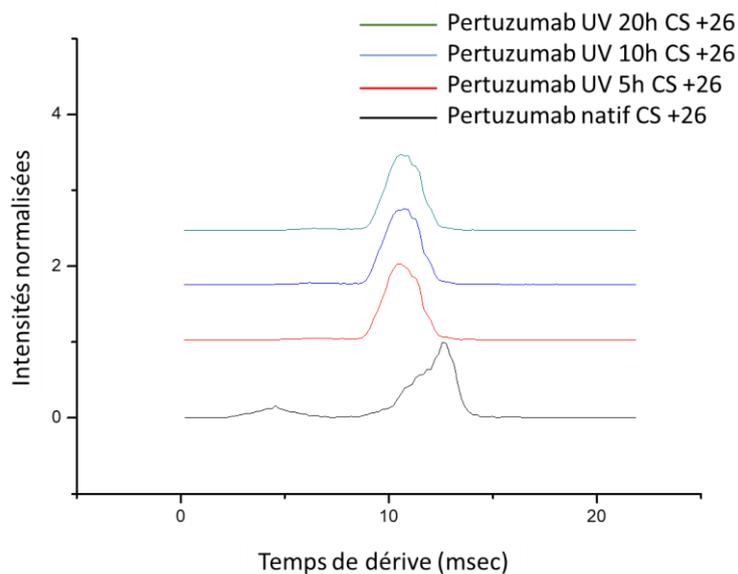


Figure 72 : Superposition des mobilogrammes du Pertuzumab natif (noir) et stressés par UV pour des temps d'exposition différents : 5h (rouge), 10h (bleu), 20h (vert).

Enfin, pour le stress UV, une population de conformères beaucoup plus compacte est détectée par la SEC-IM-MS (**Figure 72**). La modification de cette population de conformère (**Figure 72**) peut expliquer les discriminations faites en icIEF-PCA. En effet, une séparation sans équivoque des échantillons natifs et stressés est démontrée dans le cas du stress UV (**Figure 5A, article 2**) et peut être liée à des changements de conformation.

En comparaison des résultats obtenus avec le stress UV, les mobilogrammes pour le stress par agitation ou le stress thermique n'engendrent pas de telles modifications du

profil conformationnel. La **Figure 73** permet de mettre en évidence, que seul le stress UV semble avoir un impact significatif sur la conformation. Ces résultats sont en accord avec ceux apportés par l'icIEF-PCA dans le cas du Pertuzumab. En effet, seul l'UV permettait une discrimination totale des échantillons.

Par ailleurs, l'Infliximab étant plus sensible, les profils en mobilité ionique sont davantage modifiés par les stress. Cela signifie que les conformations sont plus affectées sous lors des différentes expositions aux stress, et par conséquent, la répartition des charges l'est également. Cela explique que les observations réalisées en icIEF-PCA pour l'Infliximab sont plus importantes que celles obtenues pour les deux autres anticorps, considérés plus stables.

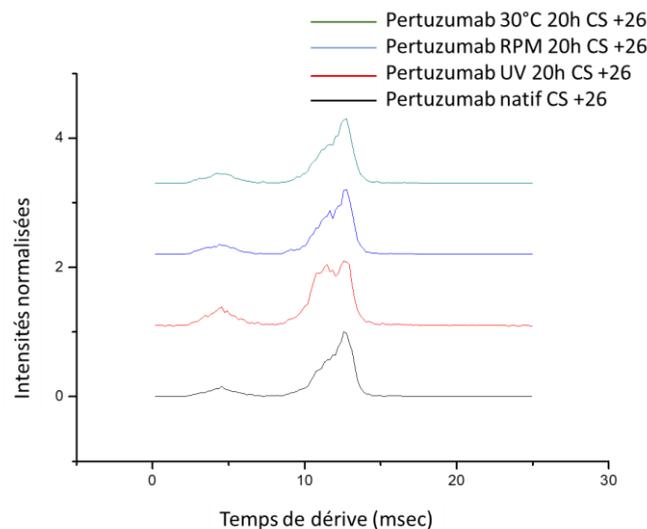


Figure 73 : Superposition des mobilogrammes du Pertuzumab natif (noir) et stressé par UV (rouge), agitation 300 rpm (bleu), température 30°C (en vert) pendant 20h.

5.3.2.4 Conclusion de l'étude conformationnelle par SEC-IM-MS

Les résultats apportés par SEC-IM-MS pour ces deux anticorps permettent d'expliquer en partie la répartition des individus dans les études de dégradations forcées réalisées par icIEF-PCA. En effet, lorsque différentes populations de conformères sont détectées par mobilité ionique, des discriminations importantes sont mises en évidence par les PCA effectuées à partir des électrophérogrammes. Dans le cas du stress UV pour l'Infliximab, en particulier, les modifications de populations sont détectées en IM, ce qui conduit à des discriminations sans ambiguïté en icIEF-PCA. De même, une simple modification des temps de dérive sur les mobilogrammes, comme dans le cas de l'UV pour le Pertuzumab, peut être corrélée aux projections en PCA. Ces corrélations entre l'icIEF-PCA et la SEC-IM-MS montrent le lien important entre les modifications de conformation des anticorps sous l'effet des stress et la répartition de leurs charges.

4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

Dans ce chapitre, trois anticorps commercialisés et administrés par perfusion ont été soumis à des stress modérés. L'impact de ces stress a été évalué par différentes techniques. Ceci a permis de montrer que bien qu'ils soient modérés en comparaison avec ceux traditionnellement utilisés dans le cadre des études de stabilité (ICH), ceux-ci ont un impact sur les anticorps. L'Infliximab est l'anticorps le plus sensible aux stress : des agrégats, des changements de conformations et des variations de ses charges ou de son hydrophobie ont été observés à l'aide des différentes techniques. Le Pertuzumab et le Pembrolizumab ont des réponses différentes sous l'effet de chacun des stress, mais restent les plus stables, notamment lors d'une exposition prolongée à une température de 30°C.

À travers ce chapitre, il a été possible de montrer que la chimométrie associée à l'icIEF permet d'observer de faibles variations qu'il serait difficile d'interpréter sans analyse statistique. En effet, des modifications non détectées par les techniques classiques de contrôle (SEC-FLD, HIC-FLD) ont été mises en évidence par l'icIEF-PCA. Une étude complémentaire de l'analyse des structures et des conformations a été réalisée afin d'expliquer les changements de répartitions de charges observés par l'association entre l'icIEF et la PCA. Le dichroïsme circulaire et la mobilité ionique ont permis de conclure à la présence de modifications de structure et de conformations pouvant expliquer les résultats obtenus par icIEF-PCA. Cependant, selon les stress, les changements de structures ne s'accompagnent pas systématiquement de changements des variants de charges et inversement. L'étude des conformations, par DC et SEC-IM-MS, semble confirmer l'hypothèse de modifications dans la répartition des charges.

Ainsi, la confrontation des résultats issus des différentes techniques a permis d'évaluer le potentiel de l'icIEF associée à la PCA comme méthode rapide de détection des dégradations pouvant survenir sur les anticorps monoclonaux. Cette méthode est donc prometteuse dans un contexte de contrôle qualité en milieu hospitalier.

Néanmoins, bien que ces variations révèlent la présence de modifications, celles-ci ne renseignent pas sur l'impact de ces modifications sur l'efficacité du traitement ou la sécurité du patient. Dans le cadre du contrôle qualité à l'hôpital, la détection de ces modifications est importante, mais ne permet pas la prise de décision quant à l'administration ou non du traitement, dans la mesure où les variations détectées sont faibles. Cela suppose qu'une évaluation plus approfondie des conséquences de ces modifications doit être réalisée afin de connaître l'impact clinique de celles-ci. Il est donc important d'associer, à la caractérisation des hétérogénéités, un contrôle de l'affinité de l'anticorps avec sa cible. Ainsi, dans le chapitre suivant, une étude de cas sur les affinités entre l'Infliximab et sa cible est présentée pour déterminer les impacts des stress étudiés sur les capacités de l'anticorps.

Par ailleurs, les travaux se sont limités à un travail d'observation par l'analyse en

composantes principales, cependant d'autres méthodes chimiométriques pourraient être mises en œuvre notamment pour tenter de retrouver la cause de la dégradation comme l'analyse en composantes indépendantes. Cette méthode permet de remonter aux différentes origines qui constituent un signal. Ainsi, à partir des électrophérogrammes, il est peut-être possible de retrouver l'origine des modifications de certaines régions par exemple et de les attribuer à un stress. D'autres applications basées sur la prédiction pourraient également être développées pour prédire l'état de dégradation de la protéine.

6 CHAPITRE VI : LIEN ENTRE FONCTIONNALITES ET DEGRADATIONS, METHODE D'ÉVALUATION DES CQA (ETUDE DE CAS INF-TNF-ALPHA)

1. INTRODUCTION SUR LES INTERACTIONS ANTICORPS-CIBLES

6.1.1 L'affinité de l'anticorps pour sa cible : un CQA important

Les propriétés les plus importantes des anticorps reposent sur leur affinité et spécificité pour leurs cibles biologiques. Ces propriétés sont liées à des sites spécifiques, appelés CDR (*Complementary determining region*) présents dans les régions variables (chaines lourdes variables, VH, et chaines légères variables, VL). Elles contribuent à la liaison avec l'antigène. D'autres propriétés clés des anticorps incluent leurs fonctions effectrices (cytotoxicité, affinité avec les récepteurs FcγR...) médiées par leurs régions constantes (fragment cristallisable, Fc). Ces différentes propriétés sont décrites dans le **Chapitre I** [335]. Ainsi, l'affinité de l'anticorps pour sa cible biologique est au cœur du développement de toutes applications thérapeutiques.

Comme présentés dans les **Chapitres I et II**, les propriétés physico-chimiques des Acms contribuent à leurs succès en tant qu'outils thérapeutiques. Par exemple, les propriétés biophysiques des anticorps, telles que leur stabilité conformationnelle et colloïdale (solubilité) élevée, permettent leur formulation, leur stockage, et leur administration, sans affecter leurs activités biologiques [336]. Des compromis sont souvent réalisés pour permettre le bon maintien de chacune de ces propriétés, souvent interdépendantes (**Figure 74**) [320], et nécessaires pour assurer l'activité thérapeutique.

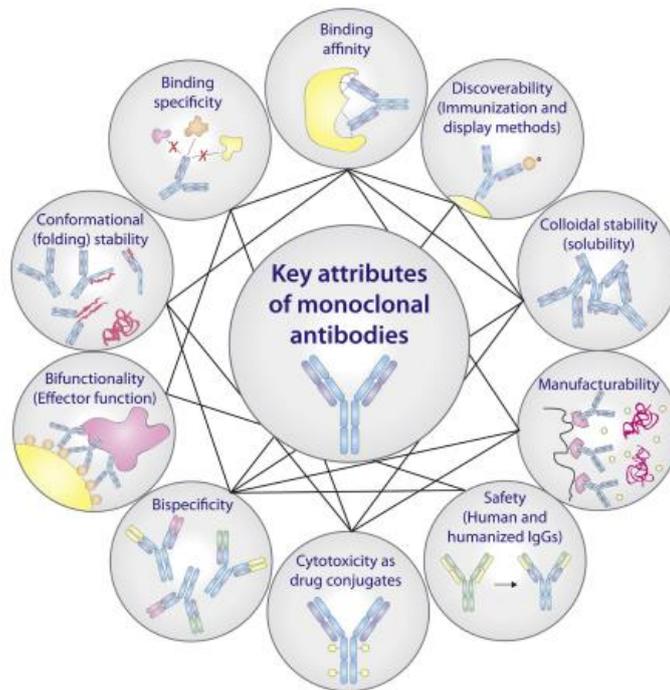


Figure 74 : Schéma des principales propriétés des anticorps monoclonaux. Les lignes reliant différentes propriétés d'anticorps mettent en évidence leur interdépendance et cette optimisation d'une propriété peut entraîner des défauts dans d'autres propriétés. (Rabia et al. 2018) [337]

Par conséquent, il est donc important d'évaluer chacune de ces propriétés depuis la conception des anticorps jusqu'à leur administration aux patients [337]. En effet, toute exposition à un stress intervenant entre la délivrance de lots et les administrations peuvent induire une ou plusieurs modifications de ces propriétés, une perte d'efficacité et/ou une immunogénicité, au même titre que lors de la production des lots. Il est maintenant bien établi que les molécules protéiques conservent leurs activités biologiques ainsi que leurs profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques lorsque les structures protéiques d'ordres supérieurs sont maintenues (secondaire, tertiaire, quaternaire) comme décrit dans le **Chapitre I** [320]. En effet, des modifications de structures, de conformations, des phénomènes d'agrégation dus à divers facteurs peuvent entraîner des réactions immunitaires et déclencher une immunogénicité [338]. Néanmoins, même sans modification apparente de la stabilité, l'efficacité du traitement peut diminuer après exposition à certains stress. Une étude de cas sur le Nivolumab a récemment montré que certains stress, comme l'agitation, pouvaient affecter les fonctions liées à l'activité biologique de l'anticorps sans pour autant avoir un impact sur sa structure. Tandis que d'autres stress, comme l'exposition prolongée à des températures élevées (40 et 60°C), n'entraînaient pas nécessairement de perte d'activité. Les auteurs ont donc conclu qu'une étude approfondie de l'affinité suite à l'exposition aux stress est nécessaire et complémentaire aux études de stabilité, celles-ci ne tenant compte uniquement de la caractérisation et l'identification des modifications que la molécule ait pu subir sans en évaluer les capacités thérapeutiques [301].

Par conséquent, aussi bien d'un point de vue thérapeutique qu'économique, il est important de développer des outils pour évaluer l'affinité des anticorps avant administration au patient, en complément d'études des propriétés physico-chimiques. Cela suppose d'effectuer des tests d'affinités entre la cible et l'anticorps lorsque celui-ci a été soumis à des stress [337].

Dans ce contexte, nous avons choisi de développer des méthodes pouvant nous renseigner sur les affinités entre l'Infliximab et sa cible biologique, le TNF- α . Dans la continuité des chapitres précédents, l'objectif est de vérifier si les stress appliqués ont un impact sur les interactions anticorps-antigènes. Lors de ce chapitre, la démarche de développement de méthodes pour permettre de conclure sur la capacité de l'anticorps à se lier avec sa cible est présentée.

Précédemment (**Chapitres IV et V**), des méthodes permettant les reconnaissances d'anticorps et des études de dégradations forcées ont été développées par icIEF, nous cherchons maintenant à évaluer les capacités de cette technique sur la problématique de l'affinité anticorps-cible. Ainsi, une méthode ciblant l'analyse de certains variants de charge par icIEF a été développée. Les résultats obtenus ont été corrélés avec ceux acquis à l'aide de techniques d'analyses de variants de taille (photométrie de masse et SEC). Dans la suite de ce chapitre, nous introduirons brièvement les techniques d'analyse traditionnellement utilisées pour les études d'affinité. Puis, nous détaillerons notre étude de cas pour les interactions entre l'Infliximab et le TNF- α .

6.1.2 Méthodes d'analyses utilisées pour évaluer l'affinité anticorps-antigène

6.1.2.1 Immuno essais et résonance plasmonique de surface (ELISA et SPR)

En plus des attributs de qualité mentionnés dans le chapitre précédent, l'affinité est un autre attribut critique pour les produits biologiques à base d'anticorps [48], [46]. Pour répondre aux exigences qualité et déterminer l'efficacité des fonctions biologiques de l'anticorps avec sa cible, plusieurs stratégies ont été mises en place. Certains tests, comme l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ou la résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance, SPR*), permettent notamment de déterminer la constante de dissociation à l'équilibre, K_D , du complexe en solution ou sur une surface [339], [340].

La technique ELISA est une technique de référence relativement simple et rapide pour évaluer les affinités Anticorps-Antigène (Ac-Ag) [341], [342], [343]. Il existe trois principaux types de tests ELISA : direct, indirect et sandwich. Chaque type est associé à une méthode de détection des complexes formés [344], [345].

La première étape consiste à immobiliser l'anticorps spécifique sur une surface (puits ou billes). Ensuite, l'échantillon contenant l'antigène d'intérêt est déposé, si l'antigène se lie à l'anticorps, il est, lui aussi, immobilisé. L'étape suivante permet d'éliminer par lavage successif ce qui dans l'échantillon ne s'est pas lié à l'anticorps immobilisé et un

anticorps secondaire spécifique de l'antigène est ajouté pour la détection. Par la suite, d'autres biomolécules sont ajoutés selon le type d'ELISA choisi pour permettre la détection du complexe (**Figure 75A**) [346].

Par exemple, dans le cadre de l'étude de stabilité de Torres et al., une méthode ELISA a permis d'évaluer l'interaction spécifique entre le Nivolumab et sa cible, le récepteur PD-1. Ils ont démontré que lorsque le Nivolumab est soumis à une température 40 °C et 60 °C pendant 1h, sa fonctionnalité n'est pas affectée. Cependant, une baisse de sa capacité de liaison au PD-1 a été observée suite à un stress par agitation (estimée autour de 20%) [301].

La seconde technique largement utilisée est la SPR [339], [347], [348], [349]. L'interaction entre l'antigène et l'anticorps est caractérisée par des données cinétiques. Les constantes d'affinité et les quantités d'analytes liés peuvent également être déterminées. La technique repose sur l'immobilisation de l'un des deux partenaires sur une surface de capteur SPR (à indice de réfraction élevé) exposé à une solution contenant le composé à détecter (**Figure 75B**). Une lumière incidente monochromatique polarisée est réfléchiée sur la surface SPR (fine couche de nanoparticules métalliques, souvent or ou argent) et génère des oscillations liées aux électrons libres (plasmons de surface) à la surface du capteur. Ces oscillations de surface sont sensibles à l'indice de réfraction, or celui-ci est modifié lorsque des analytes se lient au partenaire immobilisé en surface.

Beyer et al. ont utilisé la SPR pour comparer les affinités l'Infliximab (Remicade) et de ses biosimilaires (Remsima, Inflectra, and Flixabi). Les mesures SPR n'ont montré que des différences négligeables dans l'affinité antigénique des biosimilaires par rapport au Remicade [154].

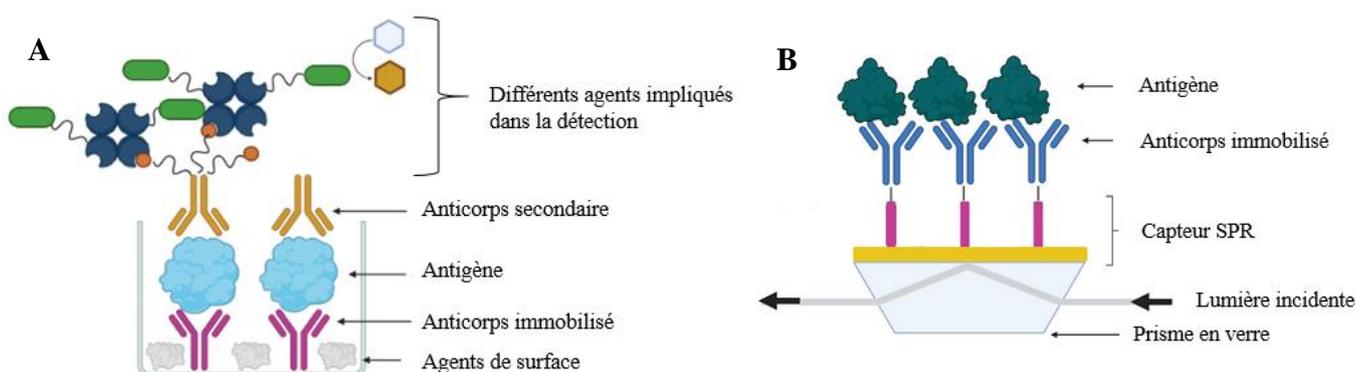


Figure 75 : Principe de (A) l'ELISA et (B) la SPR lorsque l'anticorps d'intérêt est immobilisé et que l'antigène se diffuse en solution pour se lier à l'anticorps.

L'inconvénient majeur de ces deux techniques est qu'elles mettent en jeu une affinité à partir d'une immobilisation des récepteurs sur des surfaces, ce qui peut la perturber. De plus, ces techniques ne sont pas considérées comme étant les plus adaptées pour les interactions de faibles affinités. Face à ces inconvénients, d'autres méthodes en

solution sont développées, notamment les analyses frontales.

6.1.3 Analyses frontales par chromatographie et électrophorèse d'affinité

L'analyse frontale est un mode d'analyse qui repose sur la compréhension de l'équilibre entre deux ou plusieurs espèces (dans notre cas Ac-Ag) [350]. Cet équilibre est très souvent étudié à l'aide d'isothermes d'absorption. L'analyse frontale (*Frontal Analysis*, FA) est fréquemment utilisée aussi bien en chromatographie qu'en électrophorèse [351].

La chromatographie d'affinité est méthode dans laquelle l'affinité de liaison d'un antigène (Ag) à un anticorps (Ac) est utilisée pour la séparation. L'anticorps spécifique ou la protéine cible est immobilisé sur un support solide rigide de la colonne pour former un immunosorbant actif. Les composés présents au sein d'un mélange complexe vont ensuite interagir avec l'immunosorbant. Les interactions Ac-Ag qui vont s'établir vont permettre de retenir les composés qui seront ensuite élués par changements de pH ou l'utilisation de chaotropes éluants [352], [353]. Cependant, en mode frontal, dans le cas où l'anticorps est immobilisé sur la colonne, [350], [354], la force des interactions est évaluée grâce au retard du front d'éluion de cette cible. Le schéma (**Figure 76**) explique le principe de cette technique[355].

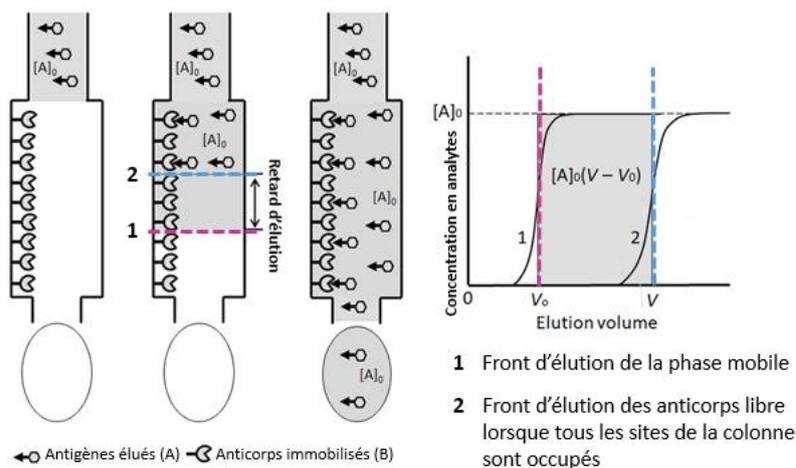


Figure 76 : Représentation schématique de la chromatographie d'affinité frontale (anticorps immobilisé et antigène dans le tampon d'élution). L'axe vertical du graphique représente la concentration de l'analyte, tandis que l'axe horizontal représente le volume d'élution. La courbe **1** est un tracé pour les molécules du tampon, et la courbe **2** est pour les antigènes libres. V_0 et V sont le volume d'élution frontal pour chaque type de molécule. $[A]_0$ représente la concentration initiale de l'analyte, et dans la colonne, la concentration d'antigènes libres $[A]$. (Adapté de Kenichi Kasai, 2020)[355]

L'inconvénient majeur de la chromatographie d'affinité en mode frontale est ; (i) la nécessité d'avoir une quantité importante d'anticorps et de sa cible, (ii) la conception ou l'achat des colonnes est couteux, c'est pourquoi elle est moins utilisée que l'électrophorèse capillaire en mode frontal.

Nous détaillerons cependant ici uniquement deux modes, l'analyse frontale (*Frontal Analysis CE, FACE*), qui est la méthode la plus classique, et l'analyse frontale en continu par électrophorèse capillaire (*Frontal Analysis continuous CE, FACCE*) [356]. Les mesures d'affinité par CE sont fondées sur les changements de mobilité électrophorétique du ligand d'affinité (par exemple, l'anticorps) et de la cible (par exemple, l'antigène) [357]. Ainsi, le mélange anticorps/antigène est réalisé au préalable et lorsque le voltage ou la pression sont appliquées en continu dans le capillaire (FACCE), l'antigène sera micro-injecté dans le capillaire. La **Figure 77**, présente le cas de la séparation par FACCE [358]. L'antigène libre, chargé positivement, migre vers le pôle de charge opposée, tandis que les complexes Ac-Ag chargés négativement ne migrent pas.

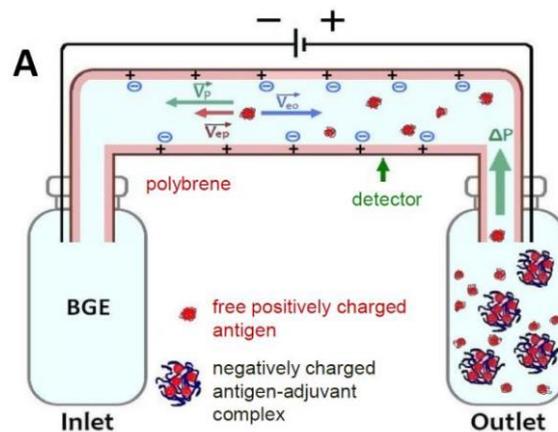


Figure 77 : Principe de fonctionnement de la FACCE. Dans cet exemple, l'antigène (en rouge) est chargé positivement et introduit en excès, tandis que le complexe antigène-adjuvant (Ac-Ag) est chargé négativement. Les différences de tailles et de charges des deux espèces permettent la séparation de celles-ci en un isotherme représenté graphiquement par un unique plateau. (Malburet et al. 2020)[358].

Lorsque l'injection n'est pas en continu, une méthode de CZE classique peut être appliquée permettant de rendre compte de l'équilibre à un instant donné pour des concentrations données de chaque partenaire de cet équilibre. Par exemple, dans l'étude de Andrasi et al. différents mélanges constitués d'un anticorps anti-HSA (mAb) à concentration fixe, préalablement incubé avec de la HSA à différentes concentrations, ont été injectés et analysés par CE couplée à une détection UV [359]. La **Figure 78** montre l'évolution des électrophérogrammes en fonction du déplacement d'équilibre lié à une augmentation de la concentration d'HSA. En effet, plus la concentration en HSA augmente plus la surface du pic correspondant à l'anticorps (mAb) diminue. En revanche, on observe l'apparition des complexes (mAb-HSA, et mAb-(HSA)₂) et du pic correspondant à la HSA libre.

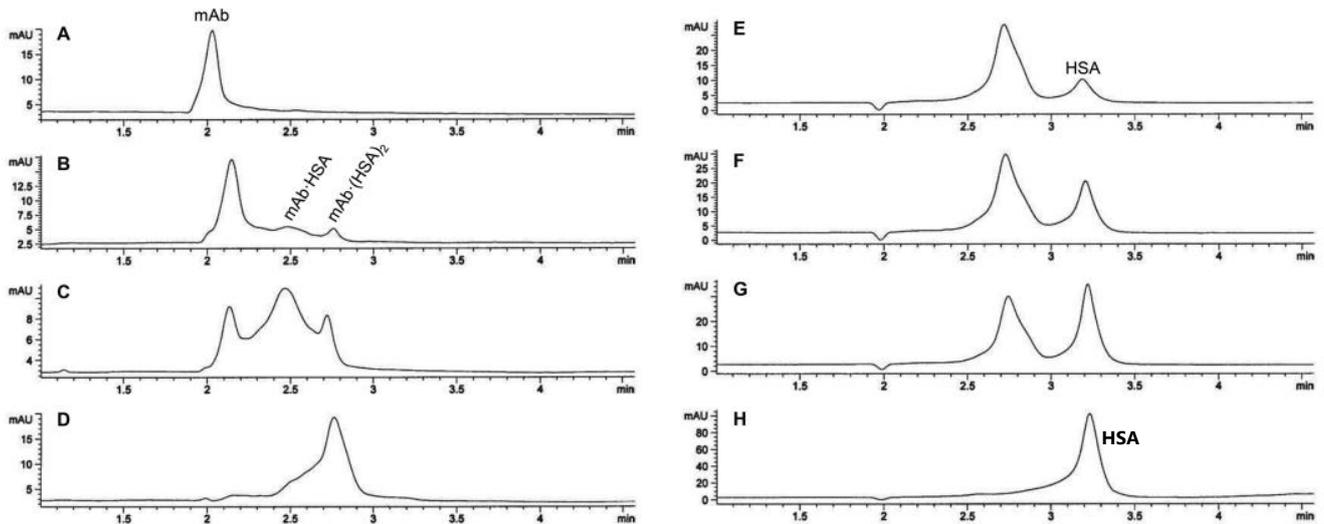


Figure 78 : Séparations en CZE de l'anticorps (mAb), de la HSA et des complexes (mAb-HSA, et mAb-(HSA)₂). Les échantillons injectés contiennent 4 M d'anticorps avec une concentration de HSA de 0 μ M (A), 0,5 μ M (B), 2,5 μ M (C), 5 μ M (D), 10 μ M (E), 15 μ M (F), 20 μ M (G). L'électrophérogramme (H) était obtenu pour 50 μ M HSA (sans anti-HSA-mAb). Conditions : 50 mM tampon borate de pH 9,3, capillaire : 33,5 cm x 50 μ m di, gauche : 25,5 cm, 100 mbar.s, +15 kV, = 200 nm. (Andradi et al. 2015)

D'autres méthodes ont également été développées pour étudier les interactions récepteurs-ligands. Par exemple, une méthode utilisant la TDA en CE (détaillée dans le **Chapitre II**) a été développée pour étudier les stœchiométries et constantes d'équilibres du TNF- α et de l'Adalimumab [193].

Cependant, les analyses par CE nécessitent une différence de mobilité des espèces à analyser. Si les mobilités des espèces sont proches, celles-ci seront peu séparées. De plus, l'adsorption sur la paroi capillaire et, peut-être plus particulièrement, la faible sensibilité des systèmes de détection (e.g. détecteurs UV), peuvent rendre les études d'affinité par électrophorèse capillaire difficiles à mettre en œuvre [356].

Enfin, il existe de nombreuses techniques fondées sur des approches biochimiques comme le SDS-PAGE couplé au western blot, et les immunoessais [360], [361].

Dans la suite de ce chapitre, nous décrivons plus particulièrement les méthodes et techniques que nous avons employées pour étudier l'équilibre entre l'Infliximab et le TNF- α . Une méthode par icIEF a été développée sur le même principe que ce qui a été décrit en FACE. Une étude de la stœchiométrie et de la taille des complexes a été réalisée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et par photométrie de masse (MP).

2. ÉTUDE DE L'AFFINITE DE L'INFLIXIMAB ET SA CIBLE BIOLOGIQUE (TNF- α)

6.2.1 Interactions Infliximab-TNF- α

L'Infliximab est un antagoniste du TNF- α , au même titre, que l'Adalimumab et

l'étanercept (protéine de fusion). Ces biomolécules sont des traitements efficaces contre la polyarthrite rhumatoïde, le rhumatisme psoriasique, la spondylarthrite ankylosante et le psoriasis, mais seuls l'Adalimumab et l'Infliximab se sont révélés efficaces dans la maladie de Crohn [362], [363]. L'Infliximab est un IgG1 chimérique, une des premières générations d'anticorps et sur laquelle nous avons le plus de recul et de données.

Les molécules de TNF- α sont des homotrimères (56 kDa) qui existent soit sous forme de TNF- α membranaire à la surface des cellules, soit, sous forme de molécules libres en solution. Lors ces travaux de thèse, nous avons uniquement travaillé sur du TNF- α en solution avec une concentration fixe de 10 nM.

Kaymakalan al. ont montré que le TNF- α soluble se liait et se dissociait de l'Infliximab au niveau des CDR sur des sites de liaison uniques. L'équipe a pu établir la valeur de la constante de dissociation (K_D) entre l'Infliximab et le TNF- α ($2,73 \times 10^{-11}$ M) [364]. Cette constante détermine l'affinité de la liaison TNF- α /Infliximab. Plus la valeur K_D est basse, plus l'affinité de liaison entre le ligand et sa cible est élevée. Ainsi, ils ont démontré la forte affinité entre l'anticorps et son antigène cible. D'autres paramètres qui caractérisent la cinétique de la réaction (la constante de vitesse d'association k_a et la constante de vitesse de dissociation k_d) peuvent être évalués.

Néanmoins, il est important de noter que le K_D peut varier en fonction du milieu dans lequel les expériences sont réalisées et des concentrations des différentes espèces impliquées dans l'équilibre ainsi que des méthodes employées pour les déterminer.

La liaison des anticorps anti-TNF- α avec le TNF- α peut impliquer des interactions multivalentes et induire la formation de complexes multimériques, potentiellement sous forme de réseaux. Les forces de telles interactions peuvent différer des affinités monovalentes. Kaymakalan et al. ont donné une valeur de K_D pour l'Infliximab ($4,2 \times 10^{-12}$ M). Ce résultat indique que les forces d'interactions de l'Infliximab avec le TNF- α solubles étaient supérieures à l'affinité unimoléculaire et donc que des complexes multivalents anticorps-antigènes sont formés. On parle dans ce cas d'avidité. La **Figure 79** décrit la différence entre affinité et avidité.

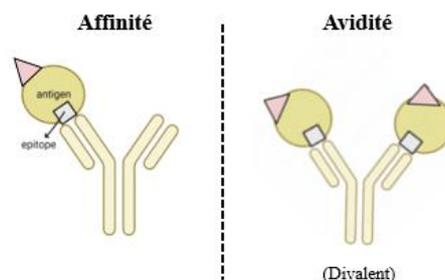


Figure 79 : Différence entre affinité et avidité, l'affinité décrit la force d'une seule interaction, l'avidité la force totale des multiples interactions [365].

En effet, la littérature décrit l'observation de complexes de stœchiométries différentes, notamment selon les méthodes d'incubation. La stœchiométrie la plus couramment observée est le complexe (3:1), formé par trois monomères d'Infliximab pour une molécule trimérique de TNF- α (**Figure 80B**) [364], [366].

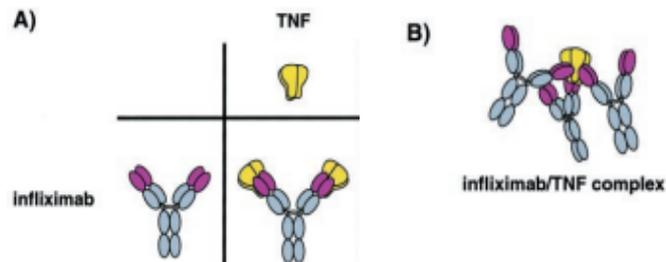


Figure 80 : Illustrations schématiques résumant des interactions entre l'Infliximab et le TNF- α . **(A)** Les régions variables (violet) et les régions constantes (bleu clair). L'Infliximab se lie au TNF- α (jaune). **(B)** Lorsque l'Infliximab est présent en excès molaire par rapport au TNF- α , trois molécules d'Infliximab peuvent se lier à chaque trimère de TNF- α . (Adapté de Scallon et al. 2002)[366].

Néanmoins, d'autres études ont montré que des complexes de stœchiométries différentes avaient pu être observés [367], [368]. En effet, Tran et al. ont constaté par TEM que les stœchiométries (1:1), (1:2), (2:2) et (3:2) (**Figure 81 et 82**) variaient selon les conditions d'incubation [368]. Une incubation par absorption sur une grille de carbone, a entraîné la formation de petits complexes 1:1 (**Figure 81B**) et 1:2 (**Figure 81C**) entre l'Infliximab et le TNF- α . Pour les complexes (1:2), chaque bras Fab de l'Infliximab était lié à une molécule trimère de TNF- α .

Une seconde méthode d'incubation en solution a permis d'obtenir, à partir de deux Infliximab monomérique, la liaison à deux trimères de TNF- α pour former un complexe en losange de stœchiométries (2:2) (**Figure 81D**) [368].

Dans un complexe (2:2), une partie du TNF- α reste disponible pour la liaison par une troisième molécule d'IgG pour former un complexe (3:2) Infliximab-TNF- α . Une incubation d'une nuit à 37°C a été testée pour l'obtention de ce complexe avant fractionnement par SEC et analyse par TEM. Bien que des stœchiométries (3:2) aient pu être détectées pour l'Infliximab et le TNF- α , Tran et al. émettent l'hypothèse que ce complexe (3:2) ne soit pas le plus stable dans le cas d'une incubation prolongée [368]. En effet, des complexes ou des agrégats d'ordres supérieurs ont également été observés. La **Figure 82**, montre une représentation de ce complexe (3:2) pour l'Adalimumab, car celui-ci semble plus stable pour cet anticorps [368].

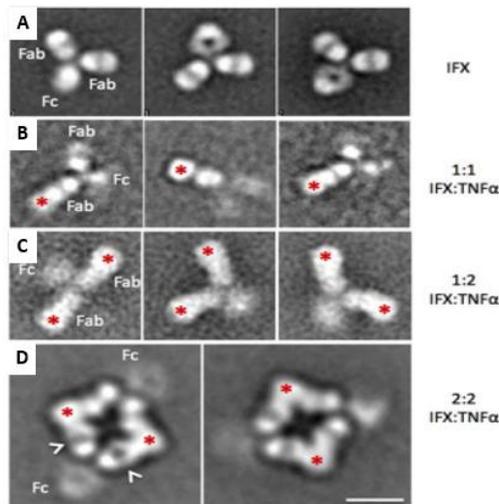


Figure 81 : Images obtenues par TEM de l'Infliximab (IFX) et ses complexes avec l'antigène TNF- α (astérisque rouge). **(A)** Infliximab seul, **(B)** Complexe Infliximab-TNF- α (1:1), **(C)** Complexe Infliximab-TNF- α (1:2) et **(D)** Complexe Infliximab-TNF- α (2:2). Barre 10 nm. (Adapté de Tran et al. 2017) [368]

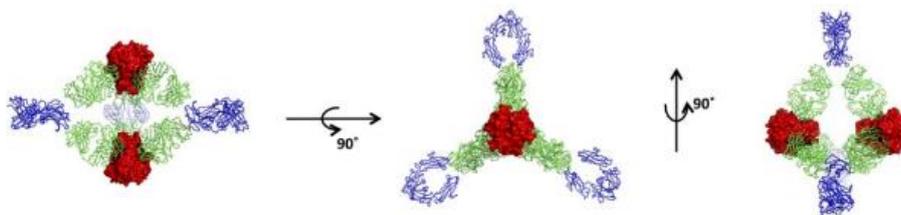


Figure 82 : Modèle du complexe complet, l'Adalimumab et TNF- α (3:2). Le modèle est dérivé d'un trimère TNF- α (rouge) et de trois domaines Fab (vert). Des résultats similaires ont été établis pour l'Infliximab (Adapté de Tran et al. 2017) [368].

Dans la suite de ces travaux de thèse, nous avons cherché à évaluer l'impact des dégradations induites par les stress sur (démontrées lors du **Chapitre V**) sur l'affinité de l'Infliximab avec sa cible biologique. Ainsi, nous nous sommes appuyés sur les travaux précédents afin d'identifier les complexes et leurs stœchiométries. Plusieurs techniques ont été employées, les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

6.2.2 Stratégies mises en œuvre pour évaluer l'impact des stress sur les affinités Infliximab-TNF- α

6.2.2.1 Évaluation de l'impact des stress sur l'affinité envers le TNF- α par l'étude des variants de charge

L'icIEF est une technique initialement utilisée pour vérifier l'identité et la stabilité des produits et de leurs isoformes. Cependant, des travaux ont été menés pour évaluer le potentiel de l'icIEF pour l'étude des interactions Ac-Ag [361], [369], [370].

En effet, le *pI* d'une protéine est défini par sa composition en acides aminés, sa

séquence, sa structure et, mais aussi par ses modifications post-traductionnelles. De nombreuses interactions biologiques des protéines impliquent la modification de composition, de variation conformationnelle et post-traductionnelle, entraînant des différences de *pI*. L'icIEF étant une technique dont la séparation est basée sur le *pI* des molécules, leurs modifications, induits par les interactions Ac-Ag, pourraient être détectées.

L'objectif de ce chapitre est (i) d'évaluer la capacité de l'icIEF à détecter les modifications des variants de charges lors d'interactions Ac-Ag, (ii) déterminer l'impact des modifications liées aux dégradations forcées sur l'activité biologique de l'anticorps. Ainsi, pour des applications en contrôle qualité, la simplicité et la rapidité de l'icIEF permettrait l'évaluation des affinités Ac-Ag au cours des processus de libération de lots.

6.2.2.2 Étude des interactions Infliximab-TNF- α par icIEF

a) Contexte

L'icIEF est une technique permettant d'établir un profil de variants de charge de protéines selon leur *pI*. Les différences observées sont liées à des modifications dans la répartition des charges ou à des changements de conformation. Notre objectif est donc de mettre à profit l'icIEF pour détecter ces modifications dans le cas de l'étude des interactions entre l'Acm et sa cible [47], [100]. L'exemple **Figure 83**, illustre ce propos lors de l'analyse d'un Acm et de sa protéine cible par icIEF. Dans ce cas, le pic principal de l'anticorps se déplace à mesure que la quantité de cibles augmente [371].

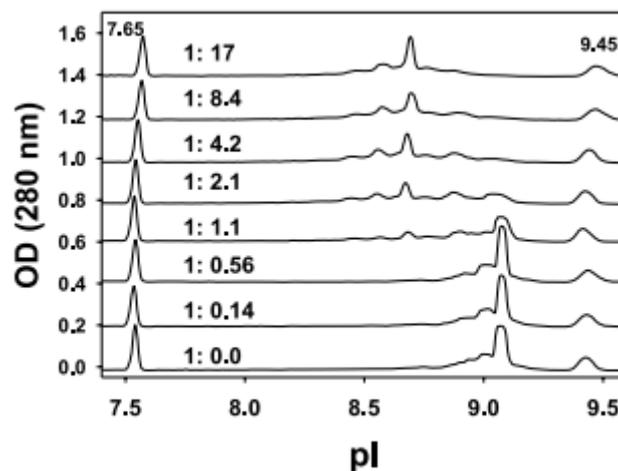


Figure 83 : Analyse d'un Acm par icIEF en présence d'une concentration croissante de la protéine cible. (Anderson et al., 2012) [371]

Les Acms comportent de nombreuses hétérogénéités, dont les hétérogénéités de charge (décrites dans le **Chapitre I et II**). Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que lors de l'exposition à certains stress, les variants les plus acides étaient affectés. Aussi, il a également été démontré, que les isoformes acides de certains Acms

réduisent leur capacité de liaison aux antigènes cibles [100].

Par ailleurs, au cours du **Chapitre V**, nous avons constaté que lorsque les anticorps subissaient un stress, les variants acides étaient significativement affectés. Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer quel était l'impact de ces changements, et par conséquent celui des stress sur les interactions Ac-Ag.

La première étape a consisté à étudier des interactions entre l'Infliximab natif (non stressé) et sa cible (TNF- α) par icIEF. Nous avons tout d'abord cherché à évaluer le *pI* du TNF- α (voir **Tableau 5** et **Figure 84**).

Tableau 5 : Points isoélectriques (*pI*) théoriques et expérimentaux, ainsi que les masses molaires, du TNF- α et de l'Infliximab.

	Infliximab	TNF- α
<i>pI</i> (théorique)	7.8	5.8
<i>pI</i> (expérimental)	7.9	6.2
Mw (kDa)	149	51 (trimère)

Après plusieurs séries de tests, il a été constaté que le TNF- α est difficilement détectable par fluorescence native aux concentrations employées. Afin d'obtenir un profil de cette protéine et de pouvoir déterminer son *pI*, il nous a été nécessaire d'augmenter significativement sa concentration par rapport à celle utilisée dans la suite de ce chapitre. Pour évaluer les interactions entre l'Infliximab et le TNF- α , des quantités de TNF- α bien inférieures à celles nécessaires à sa détection par icIEF ont été employées. De plus, l'Infliximab et le TNF- α ayant des points isoélectriques significativement différents, il n'y a pas de risque de superposition des signaux de TNF- α libres avec ceux de l'anticorps.

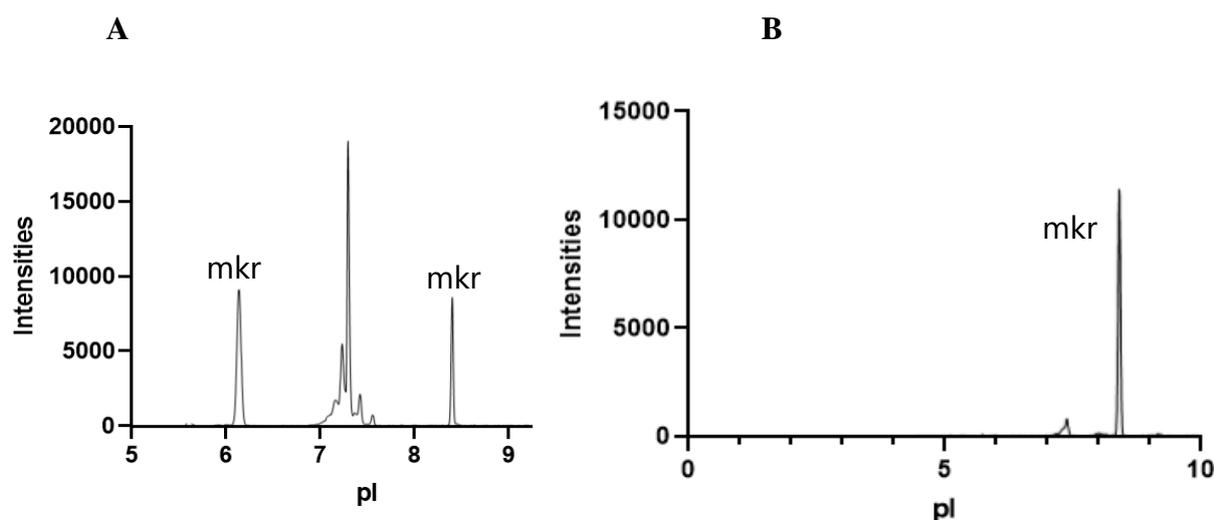


Figure 84 : Électrophérogrammes icIEF de **(A)** Infliximab 1 mg.mL⁻¹ (pharmalytes : 5-8, 8-10.5, marqueurs : 6.14 et 6.40, **(B)** du TNF- α (pharmalytes 3-10, marqueur : 8.40)) (marqueurs notés « mkr »)

b) Développement de la méthode d'analyse par icIEF

Adaptation des conditions d'analyses

Dans cette étude, nous avons choisi d'adapter les conditions analytiques utilisées dans les **Chapitres IV et V** au cas particulier de l'Infliximab (pI 7,3). Ainsi, la première adaptation pour permettre une résolution optimale a été le choix des pharmalytes. Il a été montré qu'un mélange (50/50) des pharmalytes 5-8 et 2-9 est le plus adapté pour établir une gamme de pH satisfaisante dans le capillaire. Les marqueurs de pI ont également été modifiés, et les marqueurs 6,14 et 8,40 ont été utilisés ici. Par ailleurs, afin de limiter le phénomène d'adsorption tout en évitant l'altération des interactions Ac-Ag, une quantité réduite d'urée a été utilisée par rapport aux méthodes précédentes (1M employé ici, au lieu de 2M). Pour l'ensemble des échantillons, une pré-focalisation de 1500V de 1 min, suivi d'une focalisation de 10 min à 3000 V ont été appliquées. En termes d'injection, une durée de 55 secondes a été appliquée pour l'introduction de l'échantillon et du mélange contenant les pharmalytes dans le capillaire.

Conditions d'incubation de l'Infliximab avec le TNF- α

Une des étapes ayant le plus d'influence sur la stœchiométrie des complexes Ac-Ag est l'incubation. Il existe plusieurs méthodes pour réaliser cette incubation, à savoir, incubation en ligne ou incubation hors-ligne [357]. Pour notre étude, nous avons arbitrairement choisi la méthode d'incubation hors-ligne, réalisée à 25°C pendant 40 min. Cette incubation hors-ligne est réalisée en amont de la préparation du mélange entre l'échantillon et les pharmalytes. Tout d'abord, afin de vérifier que l'incubation est adaptée, deux proportions Infliximab et TNF- α ont été testées (INF-TNF 1-10 et 10-1). Celles-ci sont présentées dans la **Figure 85** ci-dessous. Comme attendu, lorsque la proportion en TNF- α est en très faible concentration par rapport à celle de l'Infliximab, l'électrophérogramme est semblable au profil de l'Infliximab natif seul (sans TNF- α) (voir **Figure 85A**).

Cependant, lorsque le TNF- α est en excès, une très forte diminution du pic principal sur le profil de l'Infliximab est observée. Il en est de même pour les isoformes acides. Ces modifications témoignent donc d'une possible affinité entre l'anticorps et sa cible (voir **Figure 85B**).

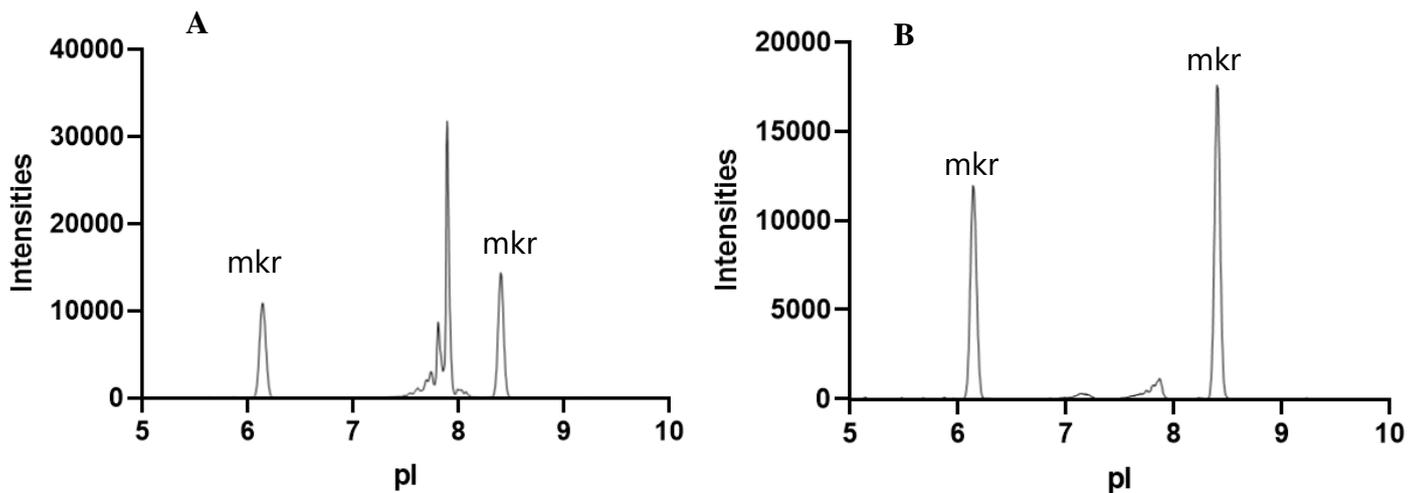


Figure 85 : Électropherogrammes icIEF de l'Infliximab et TNF- α après incubation dans les proportions INF-TNF **(A)** 10-1 et **(B)** 1-10. (50/50) des pharmalytes 5-8 et 2-9, marqueurs (notés « mkr ») 6,14 et 8,40.

Analyse des électropherogrammes d'Infliximab obtenus par icIEF

Pour l'analyse des données, nous avons décomposé les électropherogrammes en trois parties entre les deux marqueurs de *pI*. Une première zone inclut l'ensemble des pics correspondant aux variants acides, suivie d'une seconde zone comportant le pic de l'isoforme neutre (isoforme majoritaire lorsque l'anticorps est natif), et enfin, une zone avec l'ensemble des pics des variants basiques (**Figure 86**). Pour chaque zone, l'aire des pics a été mesurée et rapportée sur l'aire totale (aire entre les deux marqueurs) afin de normaliser les résultats. Cette méthode est utilisée en contrôle qualité comme approche quantitative des variants acides et basiques [372].

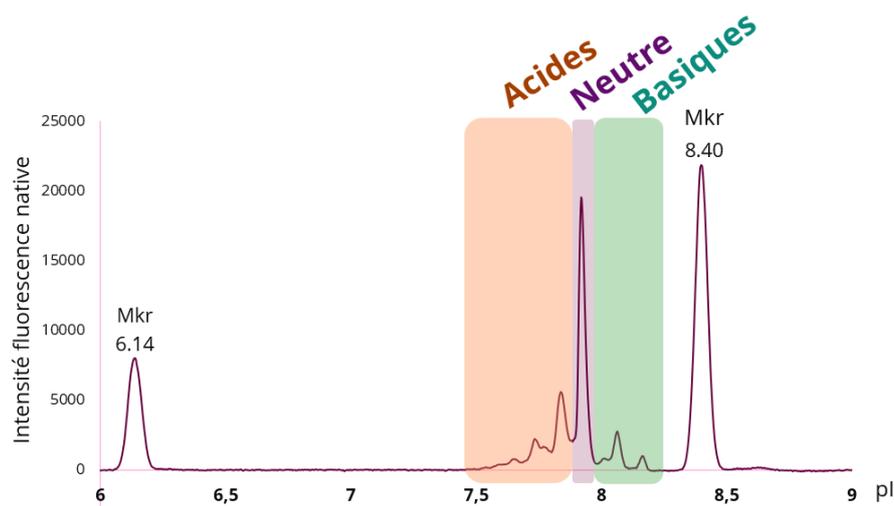


Figure 86 : Électropherogrammes de l'Infliximab natif ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), les trois zones représentées définissent les variants acides, neutres et basiques. Les marqueurs de *pI* à 6,14 et 8,40 sont notés mkr.

Étude des interactions Infliximab-TNF- α

La première étape de l'étude des interactions entre l'Infliximab natif et le TNF- α

consiste à évaluer les profils obtenus par icIEF lorsque la concentration en TNF- α augmente. Les concentrations en Infliximab sont maintenues fixes à 0,15 mg.mL⁻¹ dans le mélange final tandis que les concentrations en TNF- α varient de 0,0075 à 0,03 mg.mL⁻¹ (équivalence molaire avec l'Infliximab). Lorsque que la concentration en TNF- α a augmenté, la proportion de variants acides a également augmenté et la résolution de chacun des variants a diminué significativement (voir **Figure 87** superposition).

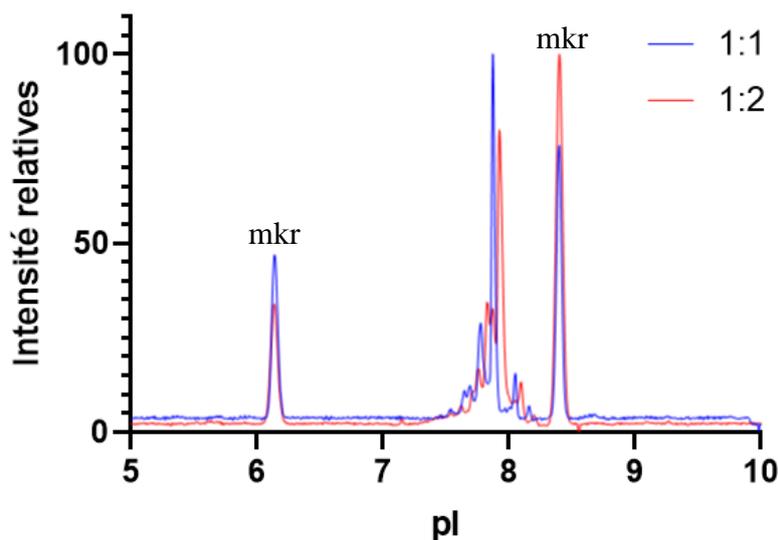


Figure 87 : Superposition d'électrophérogrammes icIEF d'échantillons d'Infliximab natif après incubation avec le TNF- α en différentes proportions INF-TNF, 1-1 et 1-2. Plus la quantité de TNF- α augmente, plus les variants acides sont affectés, le variant principal diminue et la résolution baisse. Pharmalytes (50/50) mélangés 2-9 et 5-8, marqueurs : 6.14 et 8.40 (notés « mkr »).

Une étude de corrélation pourcentage de l'aire normalisée des variants acides ou basiques, en fonction de la proportion de TNF (équivalence molaire avec l'Infliximab : 1-0,5 ; 1-1 ; 1-1,25 ; 1-1,5 ; 1-1,75 ; 1-2) a été réalisée. Les résultats obtenus montrent que le R² est relativement élevé (R²=0,975) et les écarts types sont faibles, ce qui démontre une forte corrélation entre la quantité de TNF- α mise avant incubation et la proportion de variants acides. En effet, une augmentation de la concentration de TNF- α entraîne à augmenter le pourcentage de l'aire normalisée des variants acides, ce qui peut être lié à une augmentation du nombre de complexes. Par ailleurs, un décalage des *pI* a également été observé. En effet, lorsque la concentration en TNF- α a augmenté, les isoformes se sont déplacés vers les *pI* les plus basiques. La proportion de variants basiques est restée identique et celle correspondant à l'isoforme majoritaire (neutre) a diminué. Les **Figures 88A, 88B et 88C**, présentent l'évolution des proportions des variants acides (**Fig. 88A**), neutres (**Fig. 88B**), ou basiques (**Fig. 88C**) en fonction de la quantité de TNF- α ajoutée (données issues de triplicat).

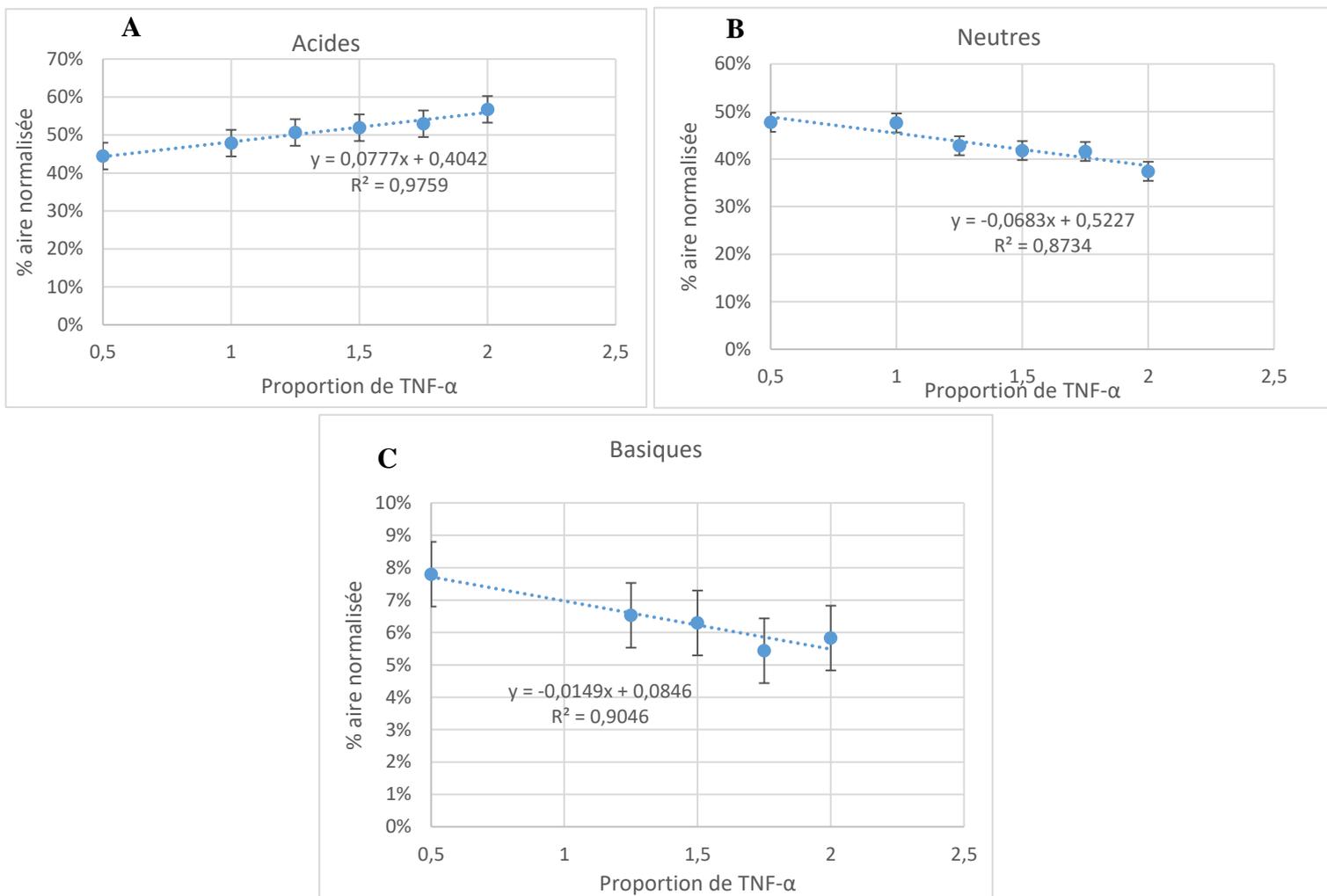


Figure 88 : Évolution des aires normalisées (sur l'aire totale) des variants acides **(A)**, neutres **(B)**, et basiques **(C)**, en fonction de la proportion Infliximab-TNF- α . L'Infliximab natif sans TNF- α a un profil qui n'est pas significativement différent de 0.5 en TNF- α .

Ces résultats montrent, d'une part, que l'icIEF permet de visualiser les affinités entre l'Infliximab et le TNF- α , et d'autre part, que les conditions d'incubations choisies permettent aux interactions Ac-Ag de s'établir. L'évolution des profils montre que les modifications les plus importantes portent sur les variants acides. En effet, une augmentation de l'aire normalisée sur l'aire totale (entre les marqueurs) est constatée et suit une tendance linéaire (voir **Figure 88A**). Cette augmentation de variants acides peut être liée à la formation de complexes Infliximab-TNF- α de plus en plus importante lorsque le TNF- α est ajouté en plus grande quantité. Ainsi, dans la suite de l'étude, nous nous sommes intéressés aux variants acides.

6.2.2.3 Étude de l'impact des stress sur les interactions Infliximab-TNF- α par icIEF

Par ailleurs, au cours du **Chapitre V**, nous avons démontré que lorsqu'un anticorps était soumis à un stress (UV, thermique ou agitation), l'impact portait principalement au niveau des variants acides. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'influence des stress sur l'affinité de l'anticorps envers sa cible. Cependant, il est important de tenir compte du fait que les changements observés au niveau des variants acides peuvent être liés à deux phénomènes ; (i) aux dégradations induites par les stress, (ii) aux modifications liées aux interactions Ac-Ag.

Les électrophérogrammes ci-dessous permettent d'effectuer une comparaison d'échantillons stressés par agitation (300 rpm) pendant 5h (**Figure 89A**) et 20h (**Figure 89B**) en présence ou absence de TNF- α . La présence de TNF- α conduit à un décalage des différents variants vers les *pI* les plus basiques. Plus le stress est intense (ou les temps d'exposition sont longs), plus ces décalages sont importants (fortement constaté pour les échantillons stressés à l'UV). De plus, la résolution des variants acides a tendance à diminuer et la proportion de ces variants tend à augmenter. La perte de résolution est liée à l'augmentation des aires des différents isoformes acides, plus difficiles à séparer. Cette comparaison visuelle des électrophérogrammes permet d'observer un impact du TNF- α sur les *pI* et les variants acides, mais celle-ci met également en valeur le rôle clé du stress dans l'évolution du profil électrophorétique.

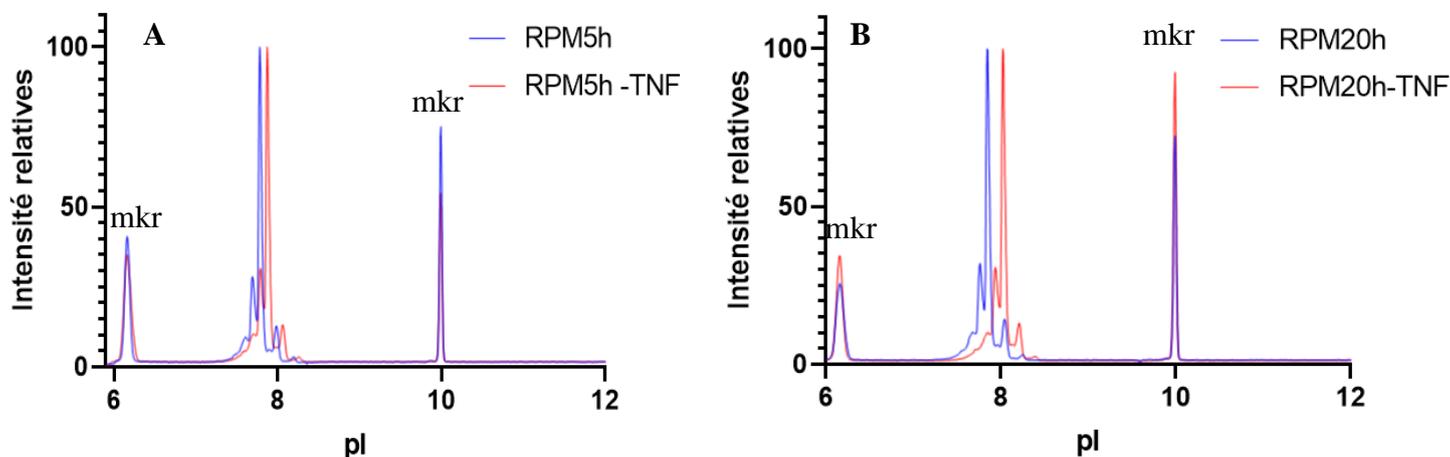


Figure 89 : Superposition d'électrophérogrammes d'échantillons d'Infliximab stressés **(A)** 5h RPM et **(B)** 20 h RPM, sans incubation au TNF- α (bleu) et avec incubation au TNF- α (rouge). Pharmalytes (50/50) mélangés 2-9 et 5-8, marqueurs : 6.14 et 8.40 (notés « mkr »). RPM correspond au stress par agitation 300 rpm.

Afin d'attribuer les variations à l'une des deux phénomènes (agrégation des anticorps ou formation de complexes infliximab/TNF- α), nous proposons ici une double lecture basée sur des ratios d'aires isoformes acides de différents échantillons. Chaque ratio sont présentés ci-dessous et calculés à partir des aires normalisées (standardisation sur l'aire totale de l'échantillon).

- **Pour l'étude de l'impact du stress** sur les variants acides, le ratio entre un échantillon ayant été **stressé** et pour lequel le TNF- α a été ajouté et un échantillon **non stressé comportant du TNF-alpha** est calculé (Eq. 12). Ce ratio est présenté ci-dessous :

$$\frac{A_{acidic} \textit{stressed binded}}{A_{acidic} \textit{unstressed binded}} \quad (12)$$

- **Pour l'étude de l'impact de l'affinité** sur les variants acides, le ratio entre un échantillon ayant été **stressé** et pour lequel le TNF- α a été ajouté et un échantillon **stressé ne comportant pas de TNF-alpha** est établi. Ce ratio est présenté ci-dessous :

$$\frac{A_{acidic} \textit{stressed binded}}{A_{acidic} \textit{stressed unbinded}} \quad (13)$$

Les résultats sont représentés sur les graphiques (**Figure 90**), il est possible de croiser les données et attribuer la part d'augmentation de la proportion des isoformes acides à l'une des deux causes présentées ci-dessus.

En effet, la **Figure 90A** décrit l'impact du stress, en comparant les échantillons stressés des échantillons non stressés, tous deux analysés après incubation avec le TNF- α . Par exemple, pour le stress UV, lorsque l'échantillon a été stressé pendant 20 h, la proportion d'isoformes acides est très élevée par rapport à un échantillon non stressé, donc le ratio est élevé. Cependant, la **Figure 90B**, décrit l'impact de la présence du TNF- α sur les proportions d'isoformes acides pour deux échantillons, mais avec ou sans incubation de TNF- α . Dans le cas de l'UV 20 h, le ratio de ces deux proportions est proche de 1, ce qui signifie que les proportions n'ont pas évoluées significativement en présence en TNF- α . Ainsi, pour cet exemple, nous pouvons déduire que l'augmentation des isoformes acides est davantage liée au stress UV 20 h appliqué plutôt qu'aux interactions Ac-Ag. Ce résultat ne permet cependant pas de conclure sur le fait que des interactions aient lieu ou non.

L'analyse croisée des données issues des deux ratios a montré que dans le cas des échantillons exposés aux UV, le stress a un impact sur le profil de l'anticorps, car la proportion d'isoformes acides liée au stress est proportionnelle au temps d'exposition (**Figure 90A**). En effet, cette proportion évolue de la manière suivante : 20 h > 10 h > 5 h. De plus, comme le montre la **Figure 90B**, la proportion d'isoformes acides après incubation avec le TNF- α plus élevée pour l'Infliximab exposé au stress UV 5 h par rapport à l'Infliximab soumis aux stress UV pendant 10 h et 20 h. Une corrélation inversée est observée, à savoir, 5 h > 10 h > 20 h lorsque l'échantillon est soumis à un stress important, comme les UV. Ceci s'explique par le fait qu'après 5 h d'exposition, l'échantillon est moins dégradé qu'après une exposition UV de 10 h ou 20 h (**Figure 90A**). On peut émettre l'hypothèse qu'étant moins dégradés, les interactions potentielles de l'Infliximab avec sa cible sont donc plus probables, se traduisant par

l'augmentation du ratio correspondant à l'équation 13 (**Figure 90B**).

Pour le stress par agitation, des résultats similaires sont obtenus quant à l'évolution des ratios en fonction des temps d'exposition. De plus, sur la **Figure 90B**, les ratios correspondant à l'agitation sont plus élevés que ceux correspondant au stress UV. Ceci est lié au fait que le stress par agitation à 300 rpm (agitation douce) est donc moins dénaturant que le stress UV, et donc la probabilité des interactions Ac-Ag est plus élevée.

Enfin, les échantillons soumis au stress thermique (30°C) ne présentent pas de modification majeure sur la **Figure 90B**, on en déduit que les interactions ne sont pas modifiées de manière significative par ce stress.

Pour conclure, comme attendu notamment dans le cas des stress UV et agitation, plus le stress a impacté l'Infliximab, moins celui-ci a pu établir d'interaction avec sa cible. Pour le stress thermique, l'impact sur l'anticorps est plus faible, il n'y pas de différence significative sur les interactions avec le TNF- α .

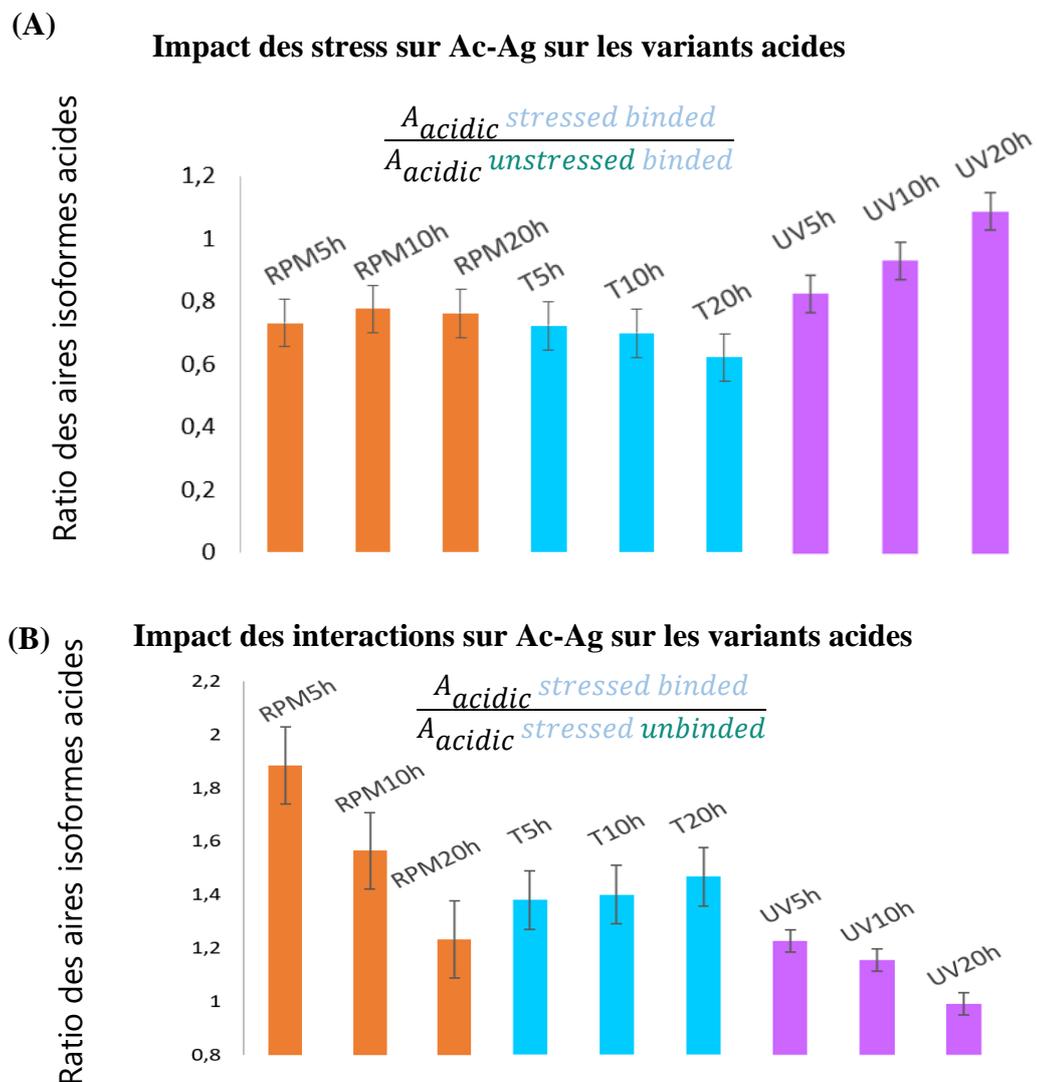


Figure 90 : Évaluation de (A) l'impact des stress, (B) l'impact de l'incubation avec TNF- α , sur les aires normalisées des isoformes acides. (n=6)

L'icIEF a donc permis, dans un premier temps, de montrer que lors de la présence de l'antigène, des modifications de variants acides des Acms sont détectées et proportionnelles à la quantité d'antigènes.

Aussi, cette étude nous a permis d'évaluer l'impact des stress sur les affinités entre l'Infliximab et le TNF- α . Les résultats obtenus indiquent qu'il existe une corrélation inversée entre l'état de dégradation des échantillons d'infliximab et leurs affinités pour le TNF- α . En effet, au cours du **Chapitre IV**, les échantillons d'Infliximab les plus dégradés (UV 20 h), montrent ici des affinités Ac-Ag plus faibles. Cette tendance est observée sur l'ensemble des échantillons. Plus le stress a engendré de modifications, plus la proportion d'isoformes acides liée à ce stress est importante et celle liée aux interactions Ac-Ag est faible. À l'inverse, les échantillons les moins dégradés présentent des proportions d'isoformes acides liées aux stress négligeables et celles liées aux interactions Ac-Ag sont plus importantes.

Cependant, dans l'état actuel, cette méthode ne permet pas de conclure sur la formation de complexe anticorps-antigène, ni sur la stœchiométrie ou la cinétique de complexation. Une étude plus approfondie et une validation de l'approche sont nécessaires, notamment grâce à d'autres techniques orthogonales. Néanmoins, nous avons ici montré le potentiel de l'icIEF pour une application supplémentaire, ce qui en fait une technique de choix pour une plate-forme de contrôle analytique. En effet, l'icIEF permet en même temps l'identification des produits thérapeutiques, l'étude de leur stabilité et de leur efficacité, par une simple et rapide caractérisation de leurs variants de charge. Aussi, à l'avenir, cette application pourrait être associée à des outils de chimométrie pour automatiser la discrimination entre les modifications liées aux stress ou à l'affinité, et peut-être approfondir nos connaissances à travers l'interprétation des données d'affinité Ac-Ag (degré d'affinité, lien avec la stœchiométrie...)

6.2.3 Évaluation de l'impact des stress par une étude des variants de taille

Afin de poursuivre notre étude par une approche holistique, nous avons choisi d'étudier un autre type de variants pour compléter nos résultats et en particulier attester de la présence de complexes Ac-Ag. Ainsi, nous avons utilisé deux méthodes basées sur des technologies différentes basées sur l'étude des variants de taille : la photométrie de masse et la chromatographie d'exclusion stérique.

6.2.3.1 *Les interactions anticorps-antigène par photométrie de masse*

La photométrie de masse (*Mass Photometry*, MP) a récemment été développée par Young et al [211]. C'est une nouvelle technologie basée sur la microscopie à diffusion interférométrique. Le principe de fonctionnement de cette technique a déjà été décrit dans le **Chapitre II**. Cette technique permet d'extraire des informations sur la distribution de masse. Celle-ci reflète l'homogénéité et la pureté de l'échantillon et permet l'analyse de l'oligomérisation et de la formation de complexes moléculaires.

Cette technique est donc parfaitement adaptée à notre problématique [31], [32], [33]. Elle permet, en même temps de caractériser les agrégats issus des stress, et d'étudier les complexes pouvant se former avec le TNF- α . Une calibration est préalablement réalisée à l'aide de la BSA et d'une IgG modèle, ce qui permet d'attribuer des masses molaires à chaque population, et ainsi d'identifier les oligomères et les complexes détectés.

Nous avons mis en place dans cette partie une stratégie semblable à celle employée en icIEF. En effet, la première étape consiste à voir l'influence de la concentration en TNF- α sur la formation de complexe Ac-Ag pour une concentration en anticorps fixe. Dans cette première étape, les échantillons d'Infliximab sont natifs (non stressés) à une concentration initiale de 1 mg.mL⁻¹. Comme dans l'expérience précédente, une incubation à 25°C pendant 40 min est réalisée à différentes concentrations en TNF- α . Dans cette partie, l'objectif est d'évaluer les masses des particules obtenues pour identifier les populations anticorps-antigènes et la stœchiométrie de ces complexes.

La seconde partie de ce travail a pour objectif de déterminer si les stress appliqués en amont sur les échantillons d'Infliximab ont une influence sur sa capacité de reconnaissance pour sa cible biologique. Ainsi, des échantillons d'Infliximab préalablement stressés (UV, température et agitation) à différents temps d'exposition ont été également incubés avec le TNF- α dans les conditions décrites précédemment (25°C, pendant 40 min, proportions INF-TNF 1-1,5).

D'un point de vue de la préparation d'échantillon, la MP ne nécessite pas de préparation d'échantillon particulière. Deux étapes importantes sont à réaliser au préalable : un blanc (eau miliQ), puis une dilution des échantillons pour que chaque particule soit considérée comme individuelle par le microscope. La MP ne requiert qu'un très faible volume d'échantillons, soit 10 μ L, à une très faible concentration de protéines (~1 à 20 nM). Pour les Acms, après plusieurs tests préliminaires, la concentration en anticorps optimale finalement déterminée était de 10 nM. Au-delà de cette concentration, trop de particules sont en suspension, ce qui ne permet pas au logiciel de traitement d'image de compter avec précision le nombre d'éléments dans la population. À l'inverse, si l'échantillon est trop dilué, il n'est pas représentatif de l'ensemble des différentes populations et ne permet pas la détection de populations de concentration trop faibles. Par ailleurs, les mesures de photométrie de masse peuvent être réalisées en quelques minutes et ne nécessitent ni marquage, ni immobilisation de molécules. Les résultats issus des contrastes (images du microscope) sont ensuite traduits sous forme d'histogrammes. Ces histogrammes comptent le nombre d'évènements (apparition d'une population sur la surface du microscope) en fonction de la masse moléculaire. Ensuite, le logiciel traite les résultats sous forme de pics gaussiens (obtenus à partir des histogrammes) pour en faciliter l'interprétation. Visuellement, ces résultats s'apparentent à ceux obtenus par chromatographie grâce au traitement de données effectué par le logiciel de Refeyn®.

Les résultats présentés **Figure 91** ci-dessous correspondent aux échantillons natifs d'Infliximab (**A**) et de TNF- α (**B**). Les masses molaires obtenues sont celles attendues avec les erreurs (± 30 kDa) sur la mesure de l'instrument. Les échantillons d'Infliximab présentent un monomère avec une masse de 155 kDa et un dimère en faible concentration ($< 2\%$) ne permettant pas au logiciel la détermination de sa masse molaire (**Figure 91A**). Le TNF- α présente ici également un monomère à 51 kDa et un oligomère en faible quantité proche de 84 kDa (**Figure 91B**). Les **Figures 91C** et **91D** correspondent aux deux proportions extrêmes (Infliximab : TNF- α), respectivement 10-1 et 1-10.

Sur la **Figure 91C**, l'Infliximab est en excès (10-1), on le retrouve donc majoritairement sous forme monomérique. Cependant, en comparaison avec l'Infliximab seul (**Figure 91A**), un épaulement est visible du côté des masses molaires plus élevées lorsque le TNF- α est présent. Cet épaulement correspond à une première complexation Infliximab-TNF- α . Aucune population correspondant à des fragments de TNF- α (libre) est détectée. La complexation du TNF- α est donc totale dans ces conditions.

Dans le cas où le TNF- α est en excès (1-10) (**Figure 91D**), la population majoritaire correspond au TNF- α libre sous forme trimérique. Néanmoins, trois autres populations minoritaires sont présentes, 395 kDa, 533 kDa et 742 kDa. Ces trois populations correspondent à des complexes Infliximab-TNF- α dont la composition sera explicitée dans le paragraphe suivant.

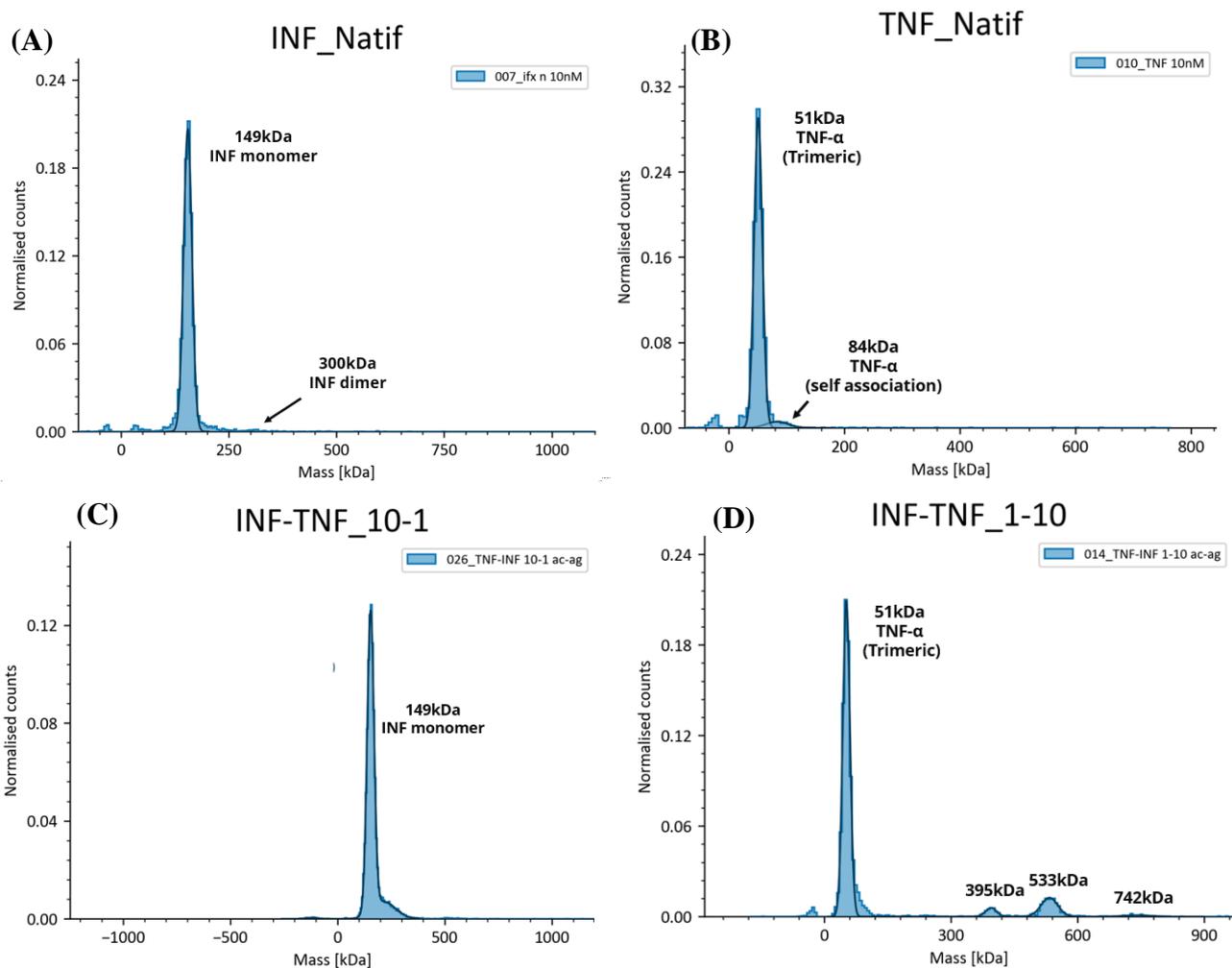


Figure 91 : Distribution en masses sous forme d'histogrammes (approximation des gaussiennes correspondantes) issus des analyses par MP pour (A) l'Infliximab et (B) le TNF- α . Les histogrammes (C) et (D) correspondent aux mélanges après incubation (25°C, 30 min) de l'Infliximab avec le TNF- α dans différentes proportions Infliximab-TNF- α : (C) 10-1 et (D) 1-10. Dilution des échantillons 10 nM.

a) Identification des complexes Ac-Ag : intérêt de leur suivi

Différents ratios Infliximab-TNF- α (Ac-Ag) ont ensuite été testés afin d'identifier les complexes pouvant se former lors de l'augmentation de la concentration en TNF- α . Les proportions choisies correspondent aux équivalents Infliximab-TNF- α suivants : 1-1, 1-1,25, 1-1,5, 1-1,75, 1-2. Une distribution de masse caractéristique a été obtenue (**Figure 92**) comportant différentes populations. L'Infliximab étant en excès (concentration) dans les différents ratios, le pic majoritaire correspond à son monomère (149 kDa). Aucune population correspondant au TNF- α libre a été identifiée. Trois autres populations de poids moléculaires plus élevés ont été identifiées : 245 kDa, 547 kDa, 695 kDa. Ces trois populations augmentent à mesure que la concentration en TNF- α augmentent. Ceci indique que ces populations sont issues de la formation de complexes (voir **Tableau 6** pour la stœchiométrie des complexes équivalents).

Tableau 6 : (A) Tableau des masses molaires des différents oligomères de l’Infliximab et du TNF- α . **(B)** Tableau comportant les masses molaires et la stœchiométrie associée pour les différents complexes Infliximab-TNF- α

(A)

Mw (kDa)	Monomère	Dimère	Trimères	Tétramère
Infliximab	149	298	447	596
TNF- α (trimérique)	51	102	153	204

(B)

Mw (kDa)	200	251	349	400	498	549	698	749
Infliximab	1	1	2	2	3	3	4	4
TNF- α (trimérique)	1	2	1	2	1	2	2	3

Grâce aux masses molaires, il est possible de faire une hypothèse sur les associations et considérer que la population de masse molaire de 245 kDa et 547 kDa correspondraient à l’association d’un anticorps pour deux TNF- α et de trois anticorps pour 2 TNF- α respectivement. Cette stœchiométrie est en accord avec les résultats décrits dans les travaux de Tran et al. (2017) pour l’Infliximab. De plus, la formation de complexe est très dépendante des conditions d’incubation, il est donc possible que les conditions utilisées dans cette étude aient favorisé cette stœchiométrie. Pour la population correspondante à 695 kDa, l’interprétation des équivalents en anticorps et en antigènes reste difficile, et ce, d’autant plus que des complexes ou agrégats de cette taille n’ont pas été décrits dans la littérature. D’autres techniques complémentaires ou des analyses par fractionnement de cette population isolée seraient donc nécessaires pour élucider la combinaison Ac-Ag correspondant à cette population. En revanche, il est à noter qu’aucune population significative de fragments d’anticorps ou TNF- α est observable, la complexation du TNF- α est donc supposée totale dans ces conditions.

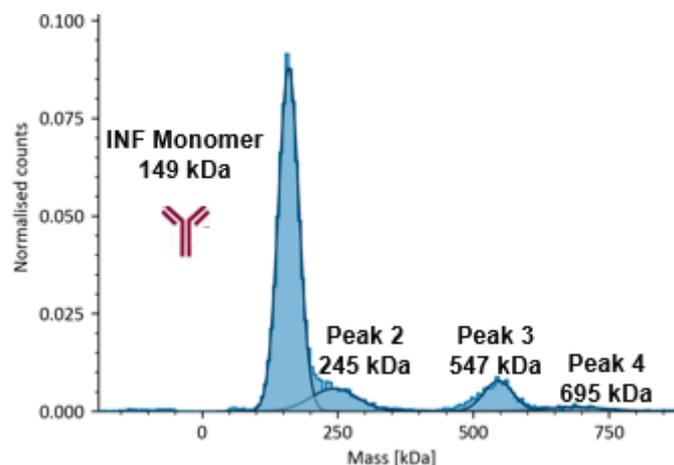


Figure 92 : Distribution en masses sous forme d’histogramme issues des analyses par MP pour un ratio Infliximab-TNF- α (1-1,5). Le monomère de l’Infliximab est identifié (149 kDa), ainsi que 3 autres populations de 245 kDa, 547 kDa, 695 kDa. Dilution de l’échantillon à 10 nM.

Il est intéressant de noter que la proportion des différentes populations évolue en fonction des quantités de TNF- α . En effet, la **Figure 93** montre que les proportions de monomères de l'Infliximab diminuent lorsque la quantité de TNF- α augmente, tandis que les proportions des différents complexes augmentent à mesure que la quantité TNF- α augmente.

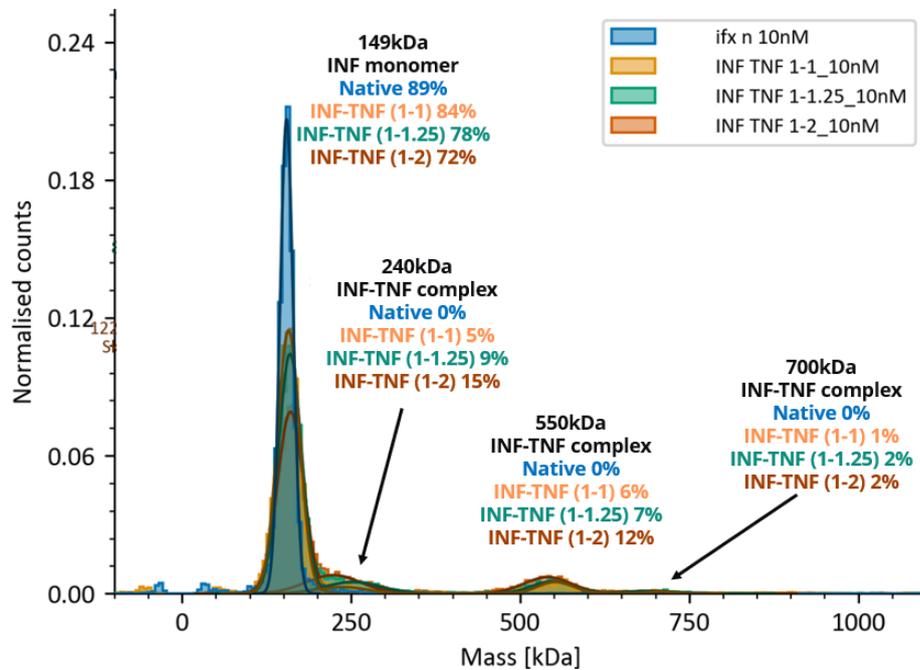


Figure 93 : Superposition des distributions en masses sous forme d'histogramme issues des analyses par MP pour les différents ratios Infliximab-TNF- α . En bleu, l'Infliximab natif, orange correspond à l'Infliximab-TNF- α (1-1), le vert à l'Infliximab-TNF- α (1-1,25), et le rouge à l'Infliximab-TNF- α (1-2). Le monomère de l'Infliximab est identifié (149 kDa), ainsi que 3 autres populations de 240 kDa, 550 kDa, 700 kDa sont des complexes Infliximab-TNF- α . Dilution des échantillons à 10 nM.

Pour chacune des différentes populations, les aires des gaussiennes issues des histogrammes ont permis de suivre l'évolution de ces populations en fonction de la proportion en TNF- α . La diminution de monomère d'Infliximab en fonction de l'augmentation en TNF- α peut être évaluée (**Figure 94A**) à partir d'une population donnée. De plus, comme la population à 245 kDa est un épaulement du pic principal (**Figure 94B**) et que celle à 695 kDa compte un très faible nombre d'évènements, les incertitudes sur l'évolution de ces populations sont plus élevées. Cependant, la population à 547 kDa peut permettre un meilleur suivi de l'augmentation du nombre de particules complexées en fonction de la proportion en TNF- α (**Figure 94C**).

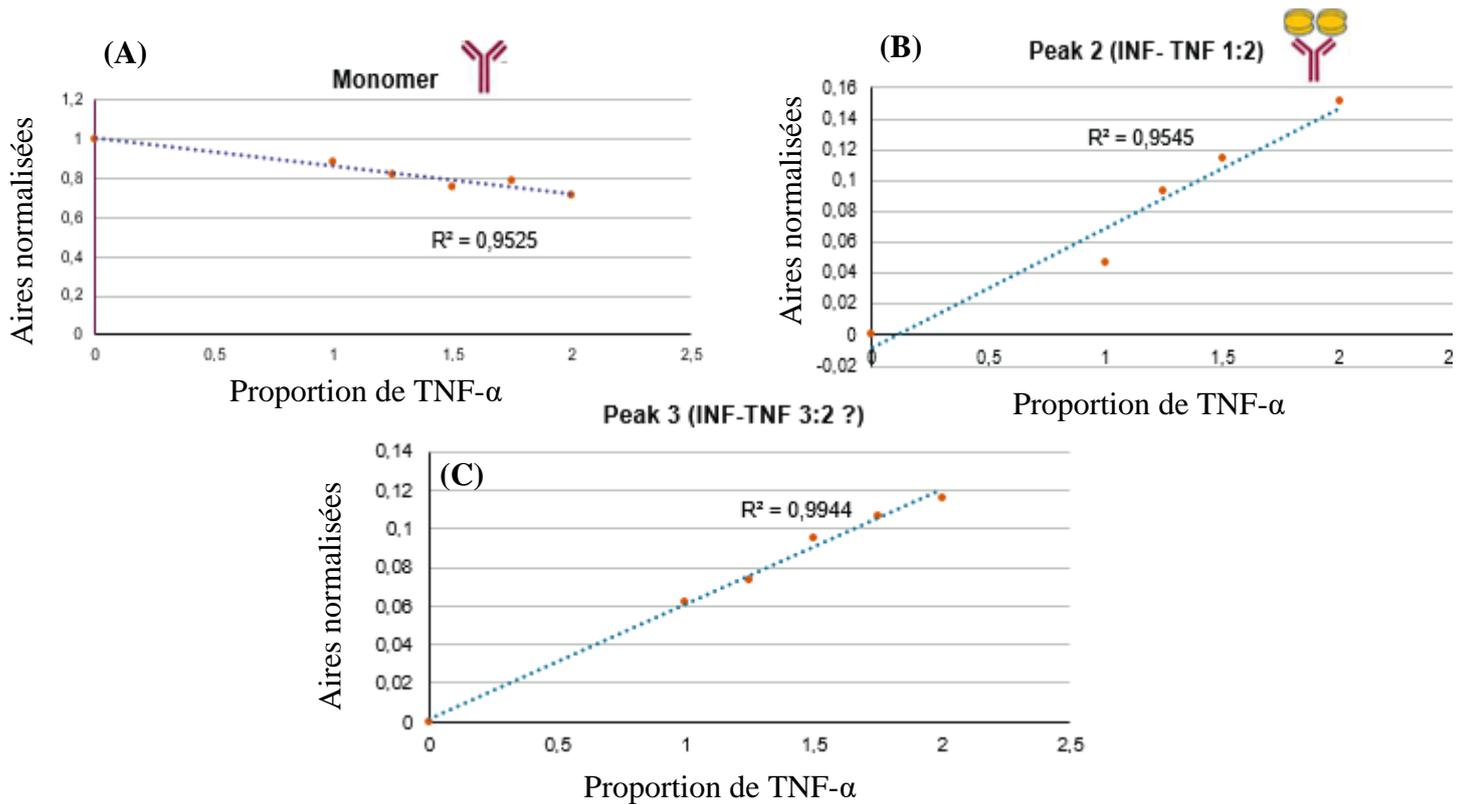


Figure 94 : Évolution des aires normalisées obtenues à partir des histogrammes de MP en fonction de la proportion en TNF- α . Ce suivi est effectué pour chaque population **(A)** le monomère de l’Infliximab, **(B)** la population à 245 kDa (Peak 2), **(C)** la population à 547 kDa (Peak 3). Pour des échantillons dilués à 10 nM.

b) Étude de l’impact des stress sur les interactions anticorps-cibles par MP

Pour la suite de ce travail, nous avons choisi de fixer arbitrairement la proportion d’Infliximab-TNF- α à (1-1,5) en conservant les mêmes conditions d’incubation de 25°C pendant 40 min. Chaque échantillon d’Infliximab a été stressés auparavant par différents moyens (agitation, température, lumières UV) comme décrits dans le **Chapitre V**. Les échantillons d’Infliximab natif (1 mg.mL⁻¹) « contrôles » ont été conservés à 4°C et n’ont subi aucun stress. Pour l’étude des affinités Ac-Ag, une fois les échantillons stressés, le TNF- α est ajouté pour obtenir la proportion souhaitée, l’incubation est réalisée et l’analyse est immédiatement effectuée. Des échantillons stressés en présence ou non de TNF- α ont été analysés.

La photométrie de masse a permis de suivre l’apparition d’oligomères et complexes de 50 à 2000 kDa. Les résultats de l’analyse des échantillons stressés (sans TNF- α) sont présentés en bleu dans le tableau ci-dessous (**Tableau 7**). Dans ces conditions, l’échantillon de contrôle et les échantillons stressés présentent les mêmes espèces détectées. Dans chaque échantillon, le monomère de l’Infliximab est détecté en espèce majoritaire à 149 kDa, tandis que deux populations sont également détectées à 200 kDa et 300 kDa. Il est possible d’identifier les populations grâce aux masses molaires ;

200 kDa peut correspondre à un monomère associé à un fragment d'anticorps, tandis que la population à 300 kDa peut correspondre à des dimères. Des populations de masses molaires inférieures ont aussi été identifiées à 50 kDa et 100 kDa. Les proportions de ces différentes populations varient cependant en fonction des stress appliqués et sont limitées dans le cas de l'échantillon de contrôle (non stressé). Les pourcentages de chacune des populations ont été calculés à l'aide du nombre total de comptes d'évènements et sont rapportés dans le **Tableau 7** (aires normalisées sur l'aire totale). À titre d'exemple, l'échantillon présenté dans la **Figure 95** ci-dessous a subi un stress UV pendant 20 h. Cet échantillon présente des fragments qui semblent caractéristiques des chaînes légères (50 kDa) et chaînes lourdes (100 kDa), ainsi que des dimères. Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, les fragments et agrégats sont des variants de tailles caractéristiques de l'exposition des Acms à un stress UV [63], [180], [373].

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des espèces présentes dans chaque échantillon. En bleu, les échantillons stressés et en rouge les échantillons incubés avec la cible (TNF- α). Dilution 10 nM.

Mw (kDa)	51	105	149	200	240	300	556
<i>Population (hypothétique)</i>	<i>Monomère TNF ou LC</i>	<i>Dimère TNF ou HC</i>	<i>Monomère INF</i>	<i>INF + Fragment</i>	<i>INF-TNF 1:2</i>	<i>Dimère INF</i>	<i>INF-TNF 3:2</i>
Natif (Contrôle)	1%	<2%	91	3%	-	1%	-
INF UV 5h	-	3%	90%	2%	-	2%	-
INF UV 20h	2%	9%	82%	<1%	-	2%	-
INF RPM 5h	-	2%	90%	<1%	-	2%	-
INF RPM 20h	-	3%	88%	<1%	-	2%	-
INF T 5h	-	4%	88%	<1%	-	2%	-
INF T 20h	-	4%	86%	<1%	-	2%	-
INF-TNF (1-1.5) (Contrôle)	-	1%	74%	-	11%	-	9%
INF-TNF UV 5h	2%	4%	91%	-	-	2%	-
INF-TNF UV 20h	7%	8%	76%	-	-	2%	-
INF-TNF RPM 5h	3%	2%	91%	<2%	-	2%	-
INF-TNF RPM 20h	6%	5%	83%	-	-	2%	-
INF-TNF T 5h	1%	2%	94%	<2%	-	2%	-
INF-TNF T 20h	2%	3%	89%	<2%	-	3%	-

Contrairement aux attentes, la quantité de dimères pour chacun des stress est relativement faible en comparaison aux résultats obtenus dans le **Chapitre V**. Une des explications de cette diminution du taux d'agrégation est sans doute liée à la forte dilution des échantillons effectuée pour la MP qui a pu entraîner une rupture de oligomères formés. Cette hypothèse est renforcée par le fait, nous avons montré par chromatographie de phase inverse que les dimères étaient non covalents.

Cette méthode nous a cependant permis d'observer des fragments, qui n'étaient pas détectés par SEC-FLD avec la colonne utilisée.

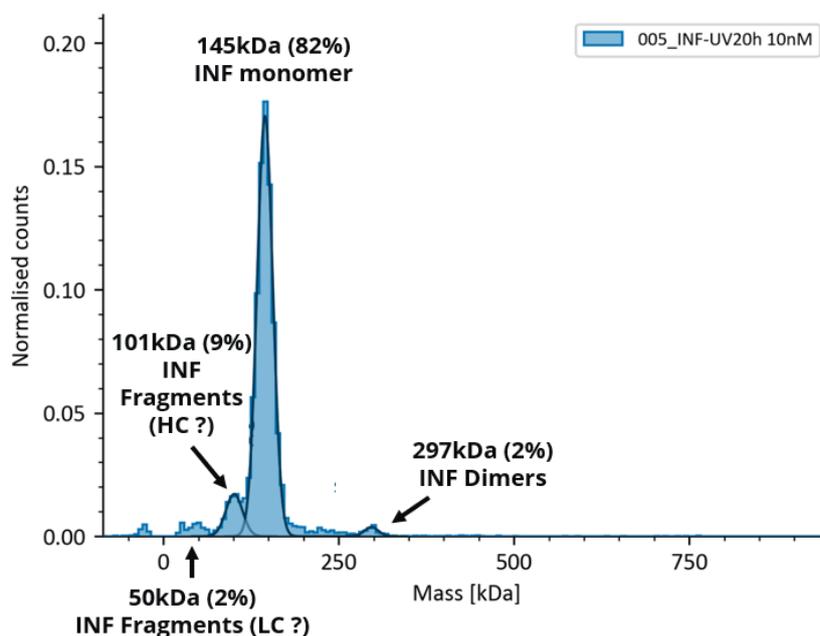


Figure 95 : Distribution en masses sous forme d'histogramme issues des analyses par MP pour l'Infliximab soumis au stress UV 20 h. Le monomère de l'Infliximab est identifié (149 kDa), ainsi que 3 autres populations de 50 kDa, 101 kDa, 297 kDa. L'échantillon a été dilué à 10 nM.

Dans le **Tableau 7**, les résultats présentés en rouge décrivent les populations des échantillons incubés en présence de la cible biologique (TNF- α). Dans l'échantillon de contrôle Infliximab-TNF- α en proportion (1-1,5), déjà présenté **Figure 95**, des fragments de petites tailles (LC et HC) ou molécules de TNF- α libres sont détectés en faibles quantités pour des masses molaires inférieures à 100 kDa. Dans cet échantillon de contrôle, le monomère de l'anticorps est également présent, son pourcentage a cependant significativement diminué, il a donc une diminution de monomères libres. De plus, deux nouvelles espèces sont présentes à 245 kDa et 546 kDa. Une absence de dimères (300 kDa) est également constatée. La population à 245 kDa pourrait correspondre à l'association d'un anticorps pour deux TNF- α , tandis que l'espèce à 546 kDa correspond à la stœchiométrie de complexes de l'Infliximab-TNF- α comportant 3 Infliximabs pour 2 TNF- α (556 kDa ; 2:3). L'échantillon de contrôle confirme que des interactions Infliximab-TNF- α s'établissent et résistent à l'étape de dilution.

Pour les échantillons ayant subi un stress et qui ont été incubés avec le TNF- α , il est constaté que la quantité de composés à 50 kDa a augmenté par rapport aux échantillons stressés ne comportant pas de TNF- α . Ces composés de 50 kDa peuvent correspondre à du TNF- α libre ou à des fragments d'anticorps. Cependant, il est difficile de discriminer la quantité de TNF- α libre de celle des fragments d'anticorps en raison de masses molaires attendues très proches. Par ailleurs, les pourcentages d'Infliximab libres n'ont pas variés, tandis que les espèces de hauts poids moléculaires ne sont pas détectées avec les pourcentages attendus dans le cas de l'apparition de complexes. Grâce à ces observations, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'avec l'application des

stress, les interactions entre l'Infliximab et le TNF- α ne seraient pas établies en quantités suffisantes pour être détectées par cette technique. De plus, la forte dilution effectuée avant la mesure peut perturber les équilibres, en dépit des interactions Ac-Ag qui présentent une haute affinité, et donc diminuer la quantité de ces complexes en solution.

Bien que nos résultats ne permettent pas de conclure sur les complexes Ac-Ag, ils sont cependant en accord avec les résultats obtenus par icIEF. En effet, plus le stress est important, plus le pourcentage de fragments/TNF- α (libre) est important et le pourcentage d'Infliximab monomérique est diminué. Par exemple, pour les échantillons soumis au stress UV pendant 5 h puis incubation avec le TNF- α , le pourcentage de fragments/TNF- α (libre) est de l'ordre de 2% et celui d'Infliximab est de 91%. Pour l'échantillon exposé au stress UV pendant 20 h, les pourcentages de fragments et d'Infliximab sont respectivement de 7% et 76% (**Figure 96**). La même tendance est observée pour les stress par agitation et température. Ainsi, lorsque le stress est important, la capacité de l'anticorps à établir des interactions avec sa cible est diminuée.

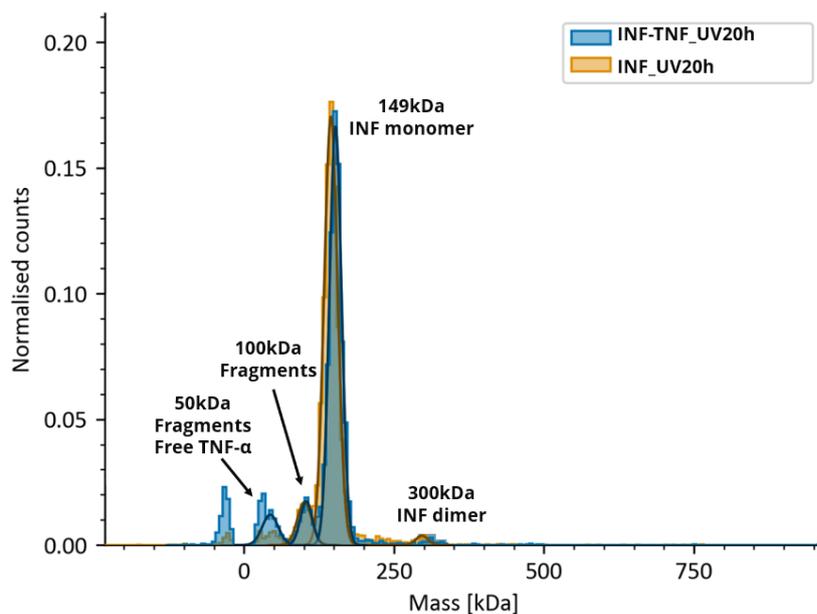


Figure 96 : Distribution des masses sous forme d'histogrammes issus des analyses par MP pour l'Infliximab soumis au stress UV 20 h. En orange l'échantillon avant incubation avec le TNF- α , en bleu l'échantillon après incubation avec le TNF- α . Les pourcentages des aires des gaussiennes augmentent pour les fragments avec la présence de TNF- α . La complexation Ac-Ag n'est donc pas totale. Les échantillons ont été dilués à 10 nM.

Cette technique étant limitée dans ce contexte par l'étape de dilution, elle ne permet pas de conclure avec certitude, mais seulement de confirmer les hypothèses préalablement émises lors de l'analyse par icIEF. Nous avons donc choisi de poursuivre les études sur les variants de taille pour évaluer l'impact des stress sur les interactions entre l'Infliximab et le TNF- α avec une autre technique. Ainsi, la dernière partie de ce chapitre présente les résultats obtenus par chromatographie d'exclusion stérique.

6.2.3.2 Études des interactions Anticorps stressés-Antigènes par chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) est une technique standard de référence pour l'analyse des isoformes de taille des protéines. Des méthodes ont donc été développées afin de séparer les différentes espèces conduisant à la formation de complexes. Celles-ci ont notamment permis de déterminer la cinétique des associations entre les protéines [374].

La SEC est souvent utilisée pour étudier la composition des complexes Ac-Ag et permettre de proposer des stœchiométries à l'aide d'une combinaison avec des détecteurs tels que la spectrométrie de masse [375] ou le MALS [376] pour obtenir directement la masse molaire des composés, ou encore un détecteur UV (ou de fluorescence) nécessitant une calibration conventionnelle (étalonnage avec gamme de molécules de tailles différentes).

Comme effectué avec la photométrie de masse, une première étude a consisté à étudier l'évolution de la distribution en masse en fonction de la quantité en TNF- α pour une quantité d'Infliximab fixe. Puis, dans un second temps, pour une concentration donnée de d'Infliximab et de TNF- α , les interactions entre l'anticorps dégradé par différents stress et sa cible ont été évaluées.

La méthode utilisée en SEC est la même que celle présentée dans le **Chapitre V**, les conditions sont considérées non dénaturantes. Les sels des phases mobiles sont relativement peu concentrés (150 mM de phosphate de potassium, 50 mM de chlorure de potassium), à pH 7,3 et celles-ci comportent 5% de phases organiques (isopropanol). La phase stationnaire BEH450 de Waters a été sélectionnée (300 x 4.6 mm, 2.6 μ m, 450 Å). La gamme de tailles de cette colonne est de 100 kDa à 1500 kDa. L'Infliximab, ses oligomères, et d'après les résultats de la photométrie de masse, les complexes Infliximab-TNF- α , devraient pouvoir être séparés. Cependant, le TNF- α libre (51 kDa) n'est pas dans la gamme, il devrait donc être exclu dans le volume de perméation totale.

a) Étude des interactions anticorps-cibles par SEC-FLD

Pour la première étape, des échantillons d'Infliximab natif sont incubés à 25°C pendant 40 min en présence du TNF- α . Des échantillons composés des proportions suivantes de Infliximab-TNF- α sont injectées en triplicat : 1-1, 1-1,25, 1-1,5, 1-1,75, 1-2. Les chromatogrammes obtenus sont superposés **Figure 97**. Le premier constat est que la quantité de monomères d'Infliximab diminue à mesure que la quantité de TNF- α augmente (temps de rétention 11,7 min). Simultanément, une augmentation des quantités de populations de poids moléculaires supérieurs à celui des monomères est observée (**Figure 97A**). Ces populations peuvent être constituées d'oligomères, d'anticorps (dimères, trimère...) ou de complexes Infliximab-TNF- α . Pour la suite, nous les considérerons sans pouvoir les distinguer comme des molécules à haut poids

moléculaire (*High Molecular Weight*, HMW). En effet, l'analyse par SEC-FLD ne permettent pas une distinction claire entre les différentes populations ni de leur identification.

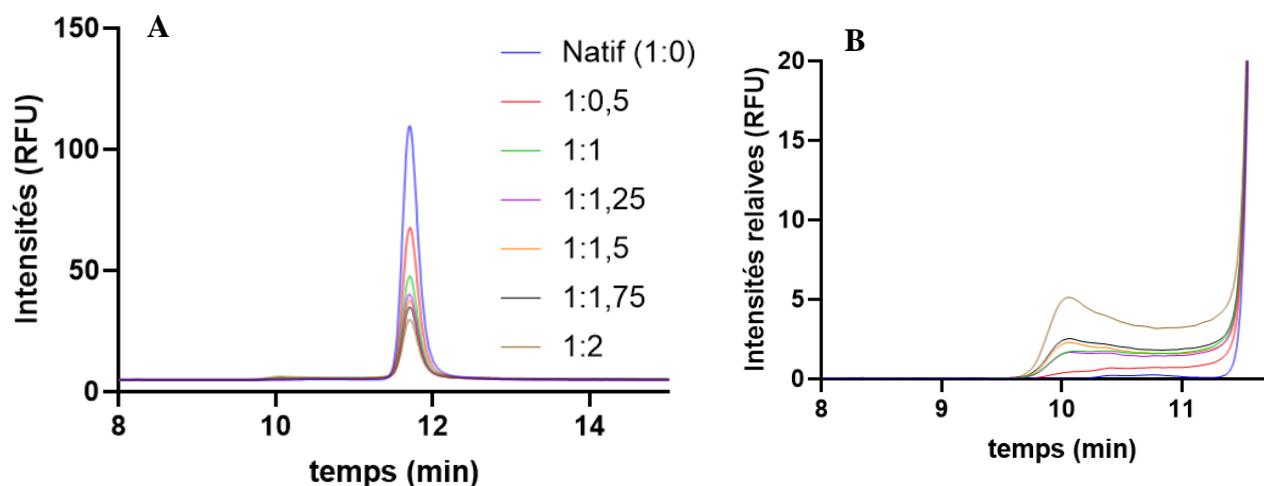


Figure 97 : Superposition de chromatogrammes, d'Infliximab natif (bleu) de concentration fixe de 1 mg.mL⁻¹ et différentes proportions en TNF- α . Les proportions Infiximab-TNF- α sont représentées en rouge pour 1-0.5, en vert pour 1-1, en violet pour 1-1.25, en jaune pour 1-1.5, en noir pour 1-1,75 et beige pour 1-2. **(A)** chromatogrammes en entier, **(B)** zoom sur les poids moléculaires plus élevés.

De plus, contrairement aux résultats obtenus en photométrie de masse, des populations de l'ordre de 550 kDa devraient être détectées. Or, bien que ces populations soient dans la gamme de masse de la colonne, elles ne sont pas détectées. Cela peut être dû à la limite de détection du détecteur FLD employé (0.13 μ g pour IgG1) ou à l'adsorption de ces populations dans la colonne ou pré-colonne. En effet, des pertes significatives lors des analyses ont été remarquées (jusqu'à 60% pour le ratio Ac-Ag 1-2). Des agrégats ou complexes de plus grandes tailles détectés par photométrie de masse ne sont pas observés par SEC. Seuls les oligomères ou complexes de l'ordre des dimères et trimères sont visibles.

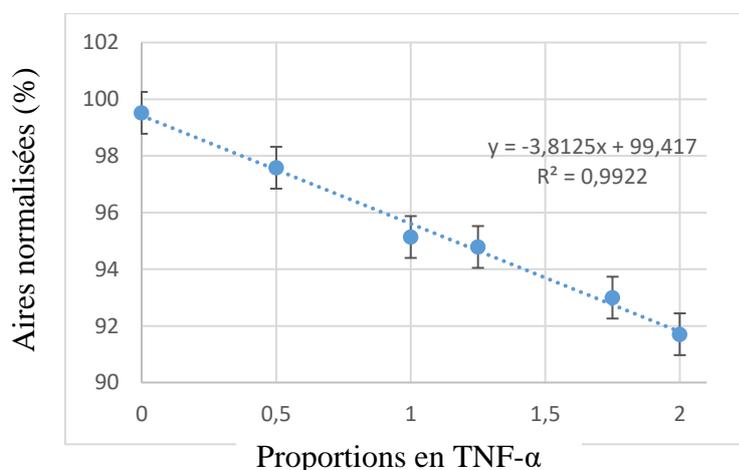


Figure 98 : Évolution de l'aire du pic correspondant au monomère (normalisée sur l'aire totale) pour l'Infliximab natif de concentration fixe à 1mg.mL⁻¹ et différentes proportions en TNF- α (1-0.5, 1-1, 1-1,25, 1-1,5, 1-1,75, 1-2). Une diminution significative de la quantité de monomères est observée avec une augmentation des quantités de TNF- α .

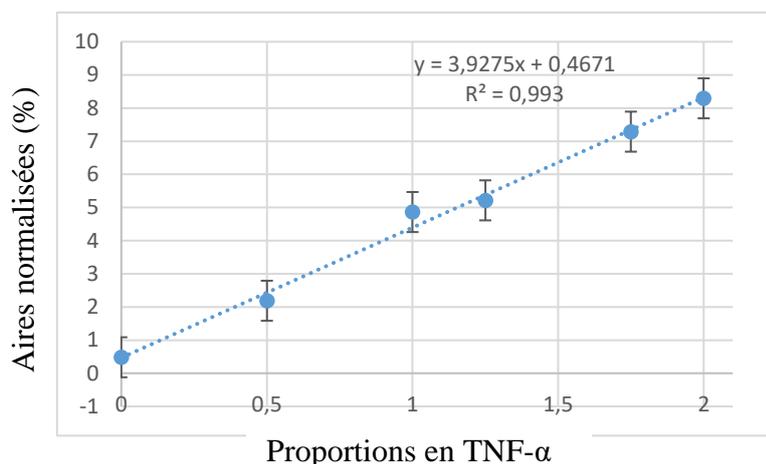


Figure 99 : Évolution de l'aire du pic correspondant aux oligomères (normalisée sur l'aire totale) pour l'Infliximab natif de concentration fixe à 1mg.mL^{-1} et différentes proportions en TNF- α (1-0,5, 1-1, 1-1,25, 1-1.5, 1-1,75, 1-2). Une augmentation linéaire de la quantité d'oligomères est observée avec une augmentation des quantités de TNF- α .

Les analyses par SEC-FLD des échantillons de l'Infliximab natif incubés en présence de TNF- α ont permis d'évaluer les différentes populations présentes dans les échantillons en fonction de la concentration en TNF- α . Tout d'abord, une diminution importante du signal du pic monomérique d'Infliximab a été observée. Celle-ci était proportionnelle à la quantité de TNF- α ajoutée à l'échantillon d'Infliximab natif (jusqu'à 60% de diminution de signal pour le ratio INF-TNF- α à 1-2). Ceci montre une interaction entre l'Infliximab et le TNF- α . Il a donc été supposé que des populations de tailles supérieures aux limites de la colonne d'exclusion stérique se sont formées et ont été exclues. Malgré les pertes observées, les proportions de chaque population détectée ont été interprétées à partir du signal FLD (les aires sont normalisées sur l'aire totale du signal en négligeant les pertes). Ainsi, les résultats (**Figure 98 et 99**) sont obtenus. Ceux-ci montrent une forte diminution du monomère et une forte augmentation des oligomères lors de l'augmentation de la concentration en TNF- α . À partir de ces deux tendances, il est possible de conclure sur l'existence d'interactions entre l'Infliximab et le TNF- α , mais également de constater que les complexes formés sont de plus en plus importants (proportion de HMW plus élevée). De plus, l'évolution des pertes étant également proportionnelle à la concentration en TNF- α , cela suggère que le nombre de complexes obtenus de tailles supérieures à la capacité de la colonne augmente également. Pour l'ensemble des interprétations sur les proportions de chaque population détectée, nous tiendrons en compte de ces pertes de complexes.

Les résultats obtenus en photométrie de masse (**Figure 93**) ont montré que la proportion en monomère pouvait diminuer jusqu'à 30% pour un ratio INF-TNF à (1-2). Pour la SEC, le même ratio INF-TNF, entraîne une diminution de l'aire du pic monomérique de 10%. Cet écart entre les deux techniques peut être lié aux pertes de complexes observées en SEC (exclusion par la colonne). En effet, les agrégats ou complexes de hauts poids moléculaires n'étant pas détectés, cela peut entraîner une surestimation d'autres populations (les populations détectées et considérées pour le calcul). Ainsi, la SEC semble pour cette application moins adaptée que la photométrie

de masse du fait de la perte conséquente de complexe de hauts poids moléculaires. Néanmoins, les résultats présentés ici en photométrie de masse ne sont que des résultats préliminaires dus au manque de répétitions entre les essais et aux dilutions. Les conclusions doivent donc être nuancées.

Pour conclure, sur l'étude des interactions entre l'Infliximab natif et le TNF- α par chromatographie d'exclusion stérique, une diminution de la proportion en monomères, ainsi qu'une augmentation du pourcentage de populations de poids moléculaires plus élevées ont été constatées lorsque la concentration en TNF- α augmente. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres techniques, seule la perte de complexe de haut poids moléculaire empêche de conclure. Les variations observées suggèrent que des interactions entre l'Infliximab et le TNF- α se produisent et peuvent en partie être détectées par SEC-FLD. Cependant, la combinaison méthode séparative et détection ne permettent pas d'identifier chaque population et des pertes d'information importantes peuvent être constatées. La SEC-FLD est donc une méthode facile à mettre en œuvre et peut apporter une première preuve de la présence de populations de plus hauts poids moléculaires causée par l'interaction avec le TNF- α . Cependant, cette technique ne permet pas de conclure sur les masses molaires des populations présentes, ni sur leurs proportions, dans les conditions chromatographiques mises en œuvre (une colonne avec un intervalle de tailles acceptées plus large aurait peut-être pu éviter les pertes).

b) Impact des stress sur les interactions anticorps-cibles par SEC-FLD

Dans la seconde partie de l'étude, les interactions entre le TNF- α et l'Infliximab ayant subi un stress ont été évaluées par SEC-FLD. Les échantillons stressés par UV, agitation ou température ont été incubés avec du TNF- α pendant 40 min à 25°C. Les échantillons ont été analysés en triplicat et chaque condition a été réalisée trois fois sur des jours différents. La même méthode de SEC-FLD que décrite précédemment a été employée. Les pourcentages d'éventuels fragments, monomères et populations de poids moléculaires ont été calculés et comparés. Dans cette seconde étude, les pourcentages sont donnés sans tenir compte des pertes de populations de hauts poids moléculaires dues à la présence de TNF- α (autour de 40% pour INF-TNF 1-1,5, avec l'Infliximab natif). La **Figure 100** permet de comparer les pourcentages d'espèces de plus haut poids moléculaires en présence ou non de TNF- α . Une première comparaison avec l'anticorps natif et les échantillons stressés sans TNF- α montre que seul le stress UV a une réelle influence sur les hétérogénéités de taille (histogrammes orange). Cependant, lorsque le TNF- α est présent (**Figure 100**, histogrammes bleus), une augmentation du pourcentage « d'agrégats » (oligomères ou complexes) est observée, ce qui prouve la présence d'interactions entre l'Infliximab et le TNF- α . De plus, la comparaison avec l'Infliximab non stressé, prouve que seuls les stress ayant déjà causé la formation de HMW ont des pourcentages d'aires significativement différents de l'anticorps non stressé avec le TNF- α (noté « ref » pour référence **Figure 100**).

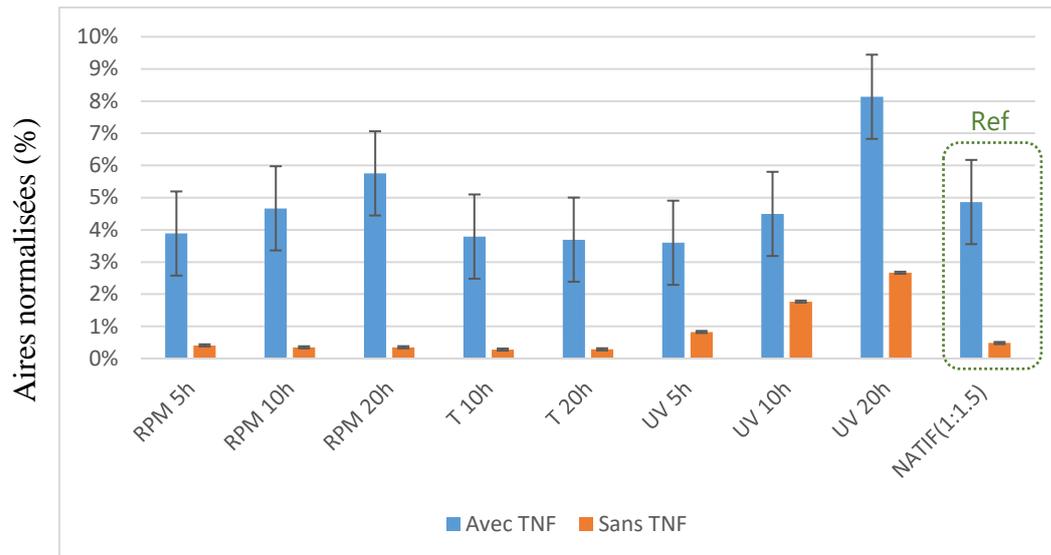


Figure 100 : Pourcentage d'agrégats observés pour des échantillons d'Infliximab ayant subi un stress. En bleu, les échantillons stressés ayant subi une étape d'incubation supplémentaire avec le TNF- α et en orange les échantillons stressés sans incubation au TNF- α .

Le chromatogramme ci-dessous permet de comparer visuellement l'effet des stress avec l'effet du TNF- α (**Figure 101**). Lorsque les échantillons avec et sans TNF- α sont comparés, une augmentation de la proportion d'espèces de plus hauts poids moléculaires est constatée lorsque le TNF- α est présent. Il est donc possible que des complexes entre l'Infliximab et le TNF- α se forment. De plus, il est également à noter qu'en l'absence de TNF- α , l'échantillon exposé 5h aux UV présente moins de HMW en comparaison avec celui exposé pendant 10h et 20h.

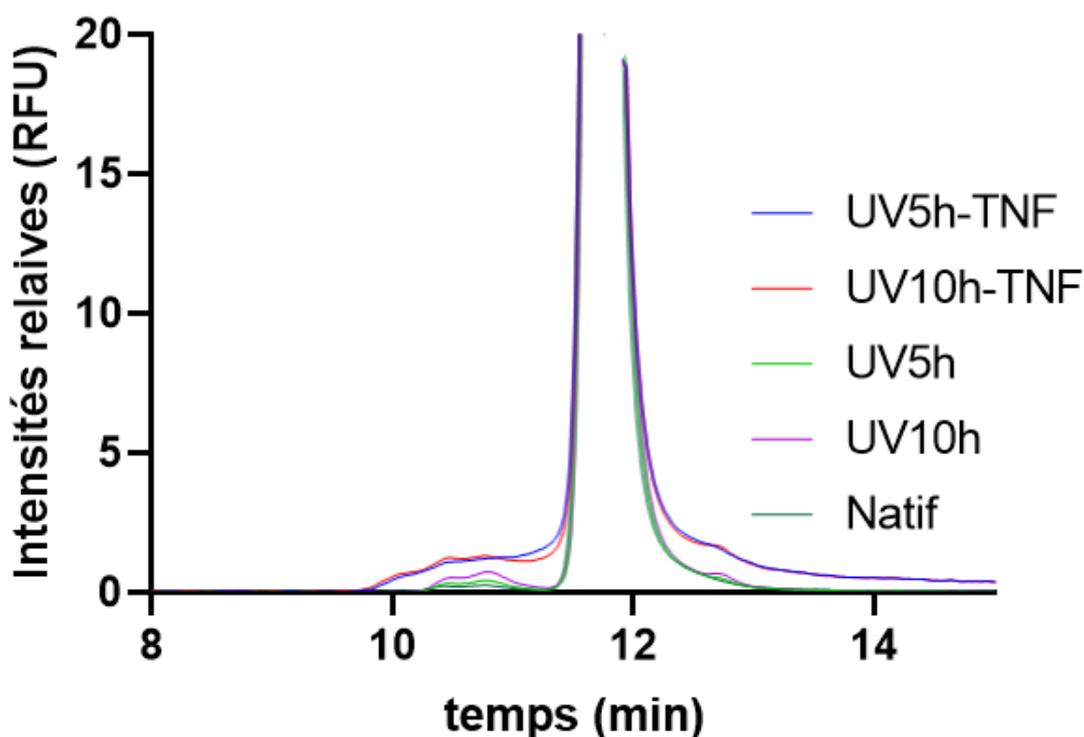


Figure 101 : Superposition de chromatogrammes d'échantillon d'Infliximab natif (vert foncé), Infliximab stressé aux UV pendant 5h (vert clair), pendant 10h (violet), et Infliximab incubé avec le TNF- α après avoir été stressé aux UV pendant 5h (bleu) et 10h (rouge).

Comme dans l'étude des interactions par icIEF, des ratios ont été calculés pour évaluer la part « d'agrégats » pouvant être attribuée aux stress et celle attribuée aux interactions.

Chaque ratio sont présentés ci-dessous et calculés à partir des aires normalisées (normalisation sur l'aire totale de l'échantillon).

- **Pour l'étude de l'impact du stress** sur les variants de taille supérieure à celle du monomère (*High Molecular weight*, HMW), le ratio entre un échantillon ayant été **stressé** et pour lequel le TNF- α a été ajouté est effectué avec un échantillon **non stressé incubé avec du TNF- α** . Ce ratio est présenté ci-dessous :

$$\frac{A_{HMW} \text{ stressed binded}}{A_{HMW} \text{ unstressed binded}} \quad (14)$$

- **Pour l'étude de l'impact de l'affinité** sur ces mêmes variants de taille, le ratio entre un échantillon ayant été **stressé** et pour lequel le TNF- α a été ajouté est effectué avec un échantillon **stressé ne comportant pas de TNF- α** . Ce ratio est présenté ci-dessous :

$$\frac{A_{HMW} \text{ stressed binded}}{A_{HMW} \text{ stressed unbinded}} \quad (15)$$

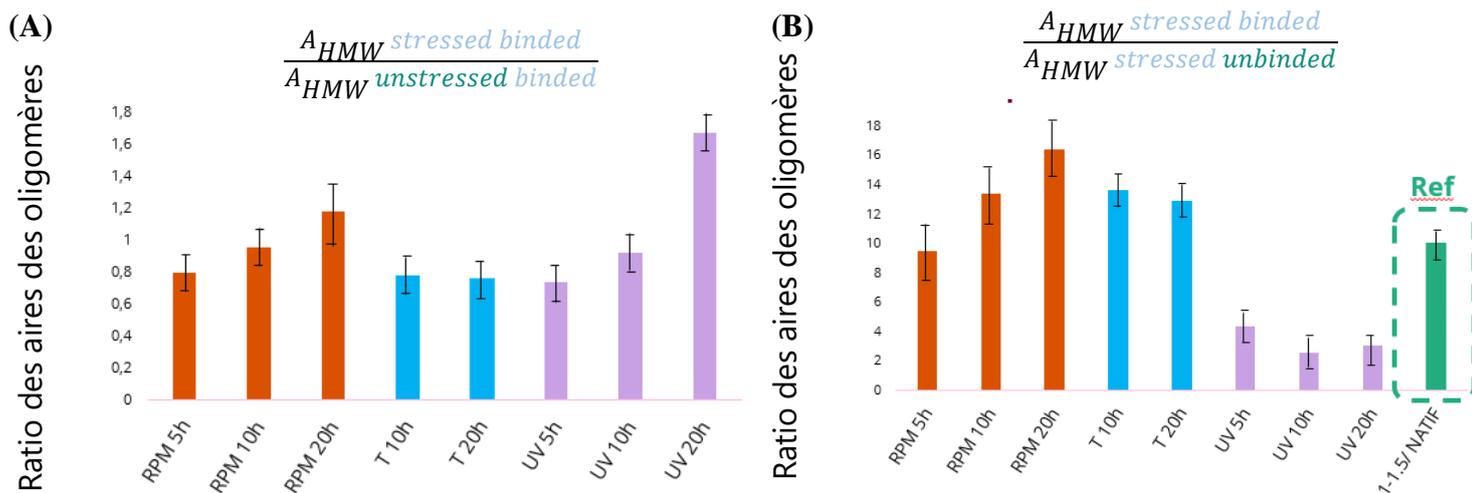


Figure 102 : Histogrammes des différents ratios (A) échantillons stressés sur non stressé ayant tous subis une incubation au TNF- α , (B) échantillons stressés avec une incubation au TNF- α sur échantillons stressés sans incubation au TNF- α

D'après la **Figure 102A**, il est remarqué que pour les stress UV et par agitation, lorsque le stress augmente, le ratio correspondant au taux de HMW augmente, ce qui signifie que la part de variants de hauts poids moléculaires augmente du fait du stress. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en icIEF. Pour le stress par la température, les variations ne semblent pas être significatives à 10 h et 20 h d'exposition.

Le second ratio permet d'évaluer les interactions sur les échantillons stressés. De la même manière qu'en icIEF, le stress UV (le plus impactant) limite les interactions avec la cible. En effet, l'échantillon initialement stressé a déjà une quantité relativement importante d'espèces de plus hauts poids moléculaires. Lorsque le TNF- α est ajouté, le ratio évaluant les HMW ne varie pas de manière significative. Cela signifie qu'en raison du stress, et probablement des dégradations causées par celui-ci, l'incubation avec le TNF- α a permis de former un nombre limité d'interactions. Par conséquent, lorsque l'anticorps est soumis aux UV, la proportion de HMW est davantage liée au stress qu'à la formation de complexes. Pour les stress par agitation et température, étant des stress plus modérés, les agrégats formés lors du stress, sont, d'après la **Figure 102B**, moins impactants sur les possibles interactions avec le TNF- α . En effet, les ratios sont plus élevés en présence de TNF- α , le taux de HMW augmente. La comparaison des ratios permet de suggérer que la formation des HMW est dans ces cas liée majoritairement à la formation de complexe Ac-Ag.

Cette dernière étude sur l'Infliximab stressé avec le TNF- α a révélé la formation de populations de taille plus importantes et a donc confirmé l'existence d'interactions entre l'anticorps et sa cible bien que les anticorps aient été stressés. De plus, la SEC-FLD a permis de retrouver des résultats cohérents avec ceux obtenus en icIEF. Cela conforte l'utilisation de l'icIEF pour évaluer les interactions Ac-Ag. Toutefois, les pertes de populations de hauts poids moléculaires observées en SEC-FLD, nécessitent que les résultats soient nuancés, car ces conclusions sont obtenues sachant qu'une partie de l'échantillon analysé est exclue de la colonne. Des analyses complémentaires

établiraient la taille des particules exclues, et donc de mieux identifier les complexes, leurs tailles et leurs stœchiométries.

3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI

Ce chapitre avait pour objectif d'évaluer l'impact des stress, mis en place dans les études de dégradations forcées précédentes, sur les affinités entre l'Infliximab et le TNF- α . Dans ce cadre, deux approches ont été développées pour suivre aussi bien les variants de charge que les variants de taille, deux CQA très importants pour les anticorps. Ainsi, une méthode par icIEF a été développée pour les variants de charge, tandis que deux techniques ont été testées pour les variants de taille, la SEC-FLD et la photométrie de masse. Lors des interactions Ac-Ag, une augmentation des variants acides par icIEF a été constatée. En comparant différents échantillons stressés et non stressés, en présence ou absence de TNF- α , il a été montré que certaines dégradations liées aux stress les plus forts (UV) pouvaient limiter les interactions Ac-Ag. Des résultats similaires sont retrouvés en SEC-FLD, lors de l'étude des variants de tailles, pour lesquels des espèces de plus haut poids moléculaires peuvent être détectées lorsque des interactions Ac-Ag s'établissent. Ces conclusions ont permis de montrer le lien étroit entre les différentes dénaturations qui peuvent être détectées par ces deux techniques.

Néanmoins, chacune d'entre elles démontre ses avantages et inconvénients pour cette application aux interactions Ac-Ag. L'icIEF est une méthode très facile à mettre en œuvre et rapide. Cependant, la préparation d'échantillon peut contenir des espèces dénaturantes (urée) ce qui ne permet pas de garantir l'intégralité des interactions inter et intramoléculaires malgré les faibles concentrations en espèces dénaturantes. Par opposition, la SEC est non dénaturante, ce qui permet de pallier ce problème. Néanmoins, les résultats montrent une perte importante de complexes. Ces pertes de complexes peuvent être dues ; (i) à la taille des espèces formées pouvant être supérieures à la capacité de la colonne, (ii) à la limite de détection du FLD, (iii) à d'une adsorption sur la phase stationnaire. Celles-ci sont d'autant plus importantes que la quantité de TNF- α est importante.

Enfin, dans notre étude, nous avons souhaité inclure les résultats obtenus en photométrie de masse, malgré le nombre limité d'analyses, dans le but de comparer cette technique avec la SEC et de tester son potentiel pour cette application. L'avantage de la photométrie de masse est sa rapidité de préparation et d'analyse. Elle garantit également aucune perte de complexe et une détection sensible. Néanmoins, concernant les études de dégradations forcées et de fonctionnalité, il est nécessaire de s'assurer que les interactions soient fortes ou stables avant de procéder à la dilution. En effet, cette technique d'analyse d'images nécessite une importante étape de dilution pour permettre le compte des populations de tailles différentes, ce qui a pu altérer nos résultats.

Par ailleurs, à partir des observations réalisées avec les différents ratios prouvant des

différences significatives entre échantillons stressés ou natifs, avec présence ou absence de TNF- α , il serait possible de développer une méthode par chimiométrie pour interpréter les données. Celle-ci identifierait les cas où les modifications des électrophérogrammes (ou chromatogrammes) proviennent majoritairement d'interactions Ac-Ag ou de dénaturations liées aux stress. Ainsi, les études de fonctionnalité pourraient être réalisées à partir des mêmes méthodes analytiques que celles des études de stabilité, avec un traitement de données fiable et automatisé.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ces travaux de thèse a été de proposer et d'évaluer de nouvelles approches analytiques destinées au contrôle qualité de médicaments à base d'anticorps monoclonaux reconstitués dans les hôpitaux. L'essor de cette classe de biomédicaments sur le marché pharmaceutique conduit à de nouvelles problématiques en contexte hospitalier. En effet, la multiplication des molécules disponibles sur le marché et la diversité des prescriptions nécessitent le développement de méthodes permettant l'identification des anticorps pour limiter les erreurs d'administration. De plus, les anticorps étant des molécules complexes, plus ou moins sensibles à leur environnement, des modifications peuvent rapidement apparaître suite à l'exposition à une contrainte extérieure. Pour limiter l'administration de médicaments partiellement dégradés, il est important d'inclure des méthodes de contrôle en routine dans les hôpitaux. En plus de répondre aux problématiques des tests d'identité et de dosages, ces méthodes doivent renseigner le personnel hospitalier sur l'intégrité des médicaments. Le défi de cette thèse a été d'envisager des méthodes innovantes, rapides et simples pour analyser des préparations d'anticorps afin d'assurer leurs bonnes administrations aux patients et garantir au mieux leur sécurité.

La première partie de notre étude visait à répondre au besoin d'identification des traitements via une méthode analytique simple. Pour répondre à cette problématique, nous avons choisi d'associer la focalisation isoélectrique capillaire en image (icIEF) avec des outils chimiométriques (PCA et PLS-DA). Notre étude a permis d'établir un prototype comprenant la construction d'un modèle (PLS-DA) et sa validation à l'aide de six anticorps monoclonaux de générations, de classes et d'activités biologiques différentes. Nous avons réussi par notre méthode de prétraitement à nous affranchir de l'influence des excipients (composition de la solution de reconstitution) et des effets liés aux différentes posologies des traitements (concentrations). L'élaboration de cette méthode de prétraitement a été réalisée en effectuant des PCA sur le jeu de données constitué de 235 électrophérogrammes. Le prétraitement automatique des données est réalisé en trois étapes consistant à aligner les signaux, à sélectionner la zone d'intérêt du profil et à la normaliser.

L'utilisation de l'icIEF comme instrument analytique a permis de développer une méthode adaptable aux contraintes hospitalières. En effet, son implantation dans les hôpitaux ne nécessiterait que l'obtention de la solution contenant tous les réactifs utilisés pour l'injection dans l'instrument. La préparation d'échantillons ne consisterait qu'à l'ajout du traitement reconstitué, celui-ci pourra ensuite être automatiquement analysé après introduction dans l'icIEF. Le développement complet d'un logiciel de traitement de données fondé sur une stratégie de machine learning permettrait au pharmacien d'obtenir en quelques secondes une conclusion sur l'identité du traitement.

De plus, les méthodes actuelles de contrôle qualité à l'hôpital ne permettent pas de vérifier l'intégrité des traitements avant leur administration. Nous avons donc choisi d'exploiter la méthode icIEF-PCA développée précédemment et de l'adapter à cette nouvelle problématique. Une étude de dégradations forcées sur trois anticorps monoclonaux (Infliximab, Pembrolizumab et Pertuzumab) a été effectuée. Les stress appliqués lors de cette étude étaient considérés comme relativement modérés en comparaison avec ceux appliqués selon les normes ICH. Pour un anticorps donné, les échantillons ayant subi différentes conditions de stress ont été comparés aux échantillons correspondant à l'anticorps natif. Afin de détecter les possibles modifications liées aux stress, la procédure de prétraitement des signaux a été optimisée pour permettre de mettre davantage en valeur les écarts entre les échantillons. Le nombre de variables utilisées pour les analyses en PCA a été limité aux variables les plus importantes. Ainsi, des PCA avec des scores (PC1, PC2) supérieurs à 90% ont été obtenues. Puis, dans le but de comparer le potentiel de cette méthode icIEF-PCA à d'autres méthodes utilisées pour vérifier la stabilité des anticorps, une étude comparative a été réalisée à partir des données issues de la chromatographie d'exclusion stérique, de la chromatographie d'hydrophobicité, du dichroïsme circulaire et de la mobilité ionique. Ces méthodes ont permis de conclure que parmi les stress étudiés, l'UV est le stress qui engendre le plus de modifications. Pour les conditions de stress les plus modérées, certaines modifications ont été détectées par icIEF associée à la PCA mais pas par les autres méthodes séparatives, à l'exception du dichroïsme circulaire et de la mobilité ionique. Cela suggère que ces modifications détectées par l'icIEF comme des changements de charges soient liées à des modifications de conformations. Cette étude a donc permis de mettre en valeur le potentiel de l'icIEF lorsque cette technique est associée à l'analyse en composantes principales pour vérifier l'intégrité des traitements. L'avantage des deux méthodes développées en icIEF pour l'identification et l'intégrité des traitements est qu'elles ne demandent qu'une seule analyse à partir du même échantillon pour contrôler ces deux aspects.

La technique par focalisation isoélectrique capillaire s'est donc avérée être un outil à fort potentiel pour le suivi des anticorps thérapeutiques. Associée à la chimométrie, cette technique s'est révélée être une méthode de choix pour analyser l'hétérogénéité de la charge liée à des stress modérés et peut être adaptée pour des applications simples nécessitant un temps d'analyse et de préparation réduits. Les applications dans des environnements de contrôle qualité dédiés à la vérification de l'identité du produit, aux tests de stabilité, aux déviations de formulation, peuvent donc être réalisées par des analyses simples en icIEF. La combinaison avec des outils chimométriques a permis de mettre en valeur certaines modifications, permettant d'aboutir à de nouvelles interprétations et de renforcer leurs robustesses.

Nos études de dégradations forcées précédentes ont montré qu'en particulier, l'Infliximab était le traitement le plus fragile parmi ceux étudiés. Cependant, bien que celui-ci soit partiellement dégradé, cela ne signifie pas que les dégradations affectent son activité biologique.

Dans notre dernière étude, nous avons souhaité étudier l'influence des stress sur les interactions entre l'Infliximab et sa cible biologique, le TNF- α . Le but était de développer plusieurs approches analytiques pour conclure sur les interactions établies. Une première approche fondée la modification du profil de charge de l'anticorps lorsque celui-ci interagit avec sa cible a été réalisée en icIEF. Il a été remarqué que les variants les plus acides du profil de charges sont les plus affectés par la présence de la cible. Cependant, les stress des études de dégradations forcées influencent également ces variants. Une méthode de calcul a donc été mise en place pour déterminer le facteur ayant le plus d'impact sur les variants de charge. Il en a été conclu que, plus le stress est important, plus les variants de charges acides sont affectés par le stress. Par conséquent, l'impact sur les variants acides par la présence de la cible est moindre en comparaison à celui engendré par les stress. Par déduction, lorsque l'anticorps est partiellement dégradé, ses interactions avec sa cible biologique en sont affectées. De plus, ces résultats ont été corrélés aux conclusions issues de deux autres techniques analytiques fondées sur les variants de taille. Ces techniques sont donc supposées détecter les oligomères obtenus par les stress et les complexes anticorps-antigène. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) a permis de confirmer que des interactions s'établissent entre l'anticorps natif et sa cible. De même qu'avec l'icIEF, il a été prouvé que les interactions diminuent lorsque les dégradations par les stress sont plus importantes. Néanmoins, la SEC ne permet pas de distinguer les populations correspondant aux oligomères ou aux complexes, et donc ne permet pas de conclure sur la proportion de chacune de ces populations. Enfin, une dernière technique innovante, la photométrie de masse, a été utilisée pour distinguer les masses molaires des composés, et ainsi identifier les oligomères des complexes. En effet, la présence de cible induit des complexes, qui dans les conditions d'incubation appliquées conduisent à l'obtention de stœchiométrie Infliximab-TNF (1: 2) et (3 : 2). Cependant, la photométrie de masse présente un inconvénient majeur lié à la méthode de détection, celle-ci nécessite que l'échantillon soit peu concentré, et donc impose une étape de dilution. Or, cette dilution peut destabiliser l'équilibre entre l'anticorps et sa cible, les résultats en sont donc moins fiables. Néanmoins, la photométrie de masse est une technique récente qui présente de nombreux avantages (facilité, temps) dont le potentiel et l'étendue des applications mériteraient davantage de recherches.

Cette étude sur les interactions entre l'Infliximab dégradé et le TNF- α a ainsi mis en valeur l'importance d'inclure des études d'affinités à la suite des études de dégradations forcées et de diversifier les approches analytiques afin d'avoir les interprétations les plus complètes possibles.

En conclusion, cette thèse a démontré la portée de l'utilisation de la focalisation isoélectrique comme méthode de contrôle qualité des médicaments constitués d'anticorps monoclonaux et applicable dans les hôpitaux. De plus, la thèse a présenté avec succès des applications de méthodes d'analyse fondées sur la chimométrie en conjonction avec l'icIEF. Ces combinaisons ont ensuite été utilisées pour reconnaître différents médicaments et distinguer différentes modifications liées à des stress du

contexte hospitalier. Les chapitres ont mis l'accent sur l'étendue des applications pouvant être obtenues à partir des profils de charges, depuis les écarts de formulation, la vérification des lots, la détection de formes dégradées, les contrôles de stabilité, l'évaluation des interactions.

De plus, les résultats apportés par d'autres méthodes plus classiques (chromatographiques, CD, IM) se sont avérés complémentaires dans la détermination des dégradations. En particulier, les analyses conduisant à des interprétations sur la structure des protéines ont montré la forte corrélation entre la répartition des charges et la conformation adoptée par l'anticorps. Cela confirme la pertinence de l'utilisation de cette technique dans le cadre de la détermination des CQA pour les anticorps.

En résumé, avec davantage de développements techniques, notamment sur l'interfaçage des logiciels d'acquisition et ceux de traitement de données chimiométriques l'icIEF pourrait se révéler très utile, aussi bien pour l'industrie pharmaceutique que pour les hôpitaux, répondant aux besoins d'évaluer à chaque étape les CQA des anticorps monoclonaux.

Références

- [1] H. Kaplon *et al.*, "Antibodies to watch in 2023 ABSTRACT," *MAbs*, vol. 15, no. 1, 2023, doi: 10.1080/19420862.2022.2153410.
- [2] X. Wang, T. K. Das, S. K. Singh, and S. Kumar, "Therapeutic Monoclonal Antibodies in the Market," vol. 1, no. 3, pp. 254–267, 2009.
- [3] "Antibody therapeutics approved or in regulatory review n the EU or US," *Antibody society*. <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>.
- [4] "FDA: Emergency use authorization," *Food and Drugs Administration*. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization>.
- [5] H. Kaplon and J. M. Reichert, "Antibodies to watch in 2021," *MAbs*, vol. 13, no. 1, 2021, doi: 10.1080/19420862.2020.1860476.
- [6] I. N. Foltz, M. Karow, and S. M. Wasserman, "Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know," *Circulation*, vol. 127, no. 22, pp. 2222–2230, 2013.
- [7] J. C. Almagro, T. R. Daniels-wells, and S. M. Perez-tapia, "Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy," *Front. Immunol.*, vol. 8, no. 1751, pp. 1–19, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2017.01751.
- [8] A. L. Grilo, "Science & Society The Increasingly Human and Pro fi table Monoclonal Antibody Market," *Trends Biotechnol.*, vol. 37, no. 1, pp. 9–16, 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.014.
- [9] L. Van Hoecke and K. Roose, "How mRNA therapeutics are entering the monoclonal antibody field," *J. Transl. Med.*, vol. 17, 2019.
- [10] J. T. Ryman and B. Meibohm, "Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies," *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol*, vol. 6, pp. 576–588, 2017, doi: 10.1002/psp4.12224.
- [11] "Antibody fragments," *absolute antibody*. <https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-engineering/antibody-fragments/>.
- [12] M. Surowka, W. Schaefer, and C. Klein, "Ten years in the making: application of CrossMab technology for the development of therapeutic bispecific antibodies and antibody fusion proteins," *MAbs*, vol. 13, no. 1, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1080/19420862.2021.1967714.
- [13] A. Beck and S. Sanglier-cianfe, "Biosimilar, Biobetter, and Next Generation

- Antibody Characterization by Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 84, pp. 4637–46646, 2012.
- [14] B. Rosa-helena, E. Efrain, G. Julio-César, and J. Edwin, "Biosimilars: An Approach to some Current Worldwide Regulation Frameworks," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 1984, no. 14, pp. 16–40, 2019, doi: 10.2174/1574884713666181025142928.
- [15] R. Gahoual, J.-M. Busnel, A. Beck, Y.-N. François, and E. Leize-Wagner, "Full antibody primary structure and microvariant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 86, pp. 9074–9081, 2014.
- [16] P. Giansanti, L. Tsiatsiani, T. Y. Low, and A. J. R. Heck, "Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin," *Nat. Protoc.*, vol. 11, pp. 993–1006, 2016.
- [17] A. Hauptmann, G. Hoelzl, M. Mueller, K. Bechtold-Peters, and T. Loerting, "Raman Marker Bands for Secondary Structure Changes of Frozen Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations During Thawing," *J. Pharm. Sci.*, vol. 112, no. 1, pp. 51–60, 2023, doi: 10.1016/j.xphs.2022.10.015.
- [18] N. J. Greenfield, "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure," *Nat. Protoc.*, vol. 1, pp. 2876–2890, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.202.
- [19] L. LIU, L. JONES BRAUN, W. WANG, and J. F. RANDOLPH, THEODORE W. CARPENTER, "Freezing-Induced Perturbation of Tertiary Structure of a Monoclonal Antibody," *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 7, pp. 1979–1986, 2015, doi: 10.1002/jps.24013.Freezing-Induced.
- [20] S. A. Abbas, G. Gaspar, V. K. Sharma, and T. W. D. S. K. Patapoff, "Application of Second-Derivative Fluorescence Spectroscopy to Monitor Subtle Changes in a Monoclonal Antibody Structure," *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, pp. 52–61, 2013.
- [21] D. D. Vallejo *et al.*, "Ion Mobility-Mass Spectrometry Reveals the Structures and Stabilities of Biotherapeutic Antibody Aggregates," *Anal. Chem.*, vol. 94, pp. 6745–6753, 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.2c00160.
- [22] S. W. De Taeye, T. Rispens, and G. Vidarsson, "The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions," *Antobodies*, vol. 8, no. 30, pp. 1–18, 2019.
- [23] E. Bell, "IgG effector function: a question of balance," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, 2006.
- [24] J. G. Salfeld, "Isotype selection in antibody engineering," *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, pp. 1369–1372, 2007.

- [25] M. K. Joubert, Q. Luo, Y. Nashed-Samuel, J. Wypych, and L. O. Narhi, "Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 28, pp. 25118–25133, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.160457.
- [26] F. H, B. SR, K. CG, and R. RS, "Increased aggregation propensity of IgG2 subclass over IgG1: role of conformational changes and covalent character in isolated aggregates," *Protein Sci.*, vol. 19, pp. 1601–1615, 2010.
- [27] H. Pan, K. Chen, L. Chu, F. Kinderman, I. Apostol, and G. Huang, "Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn," *Protein Sci.*, vol. 18, no. 2, pp. 424–433, 2009, doi: 10.1002/pro.45.
- [28] T. Ito and K. Tsumoto, "Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress," *Protein Sci.*, vol. 22, no. 11, pp. 1542–1551, 2013, doi: 10.1002/pro.2340.
- [29] K. S. Satich, "Impact of Product-Related Factors on Immunogenicity of Biotherapeutics," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 2, pp. 354–387, 2011, doi: 10.1002/jps.
- [30] Fradkin AH, C. JF, and R. TW, "Immunogenicity of aggregates of recombinant human growth hormone in mouse models," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, pp. 3247–3264, 2009.
- [31] B. Gurel *et al.*, "Structural and Functional Analysis of CEX Fractions Collected from a Novel Avastin® Biosimilar Candidate and Its Innovator: A Comparative Study," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 8, pp. 2–23, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14081571.
- [32] J. Vlasak *et al.*, "Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody," *Anal. Biochem.*, vol. 392, no. 2, pp. 145–154, 2009, doi: 10.1016/j.ab.2009.05.043.
- [33] M. Habberger *et al.*, "Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies: Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes," *MAbs*, vol. 6, no. 2, pp. 327–339, 2014, doi: 10.4161/mabs.27876.
- [34] I. Schmid *et al.*, "Assessment of susceptible chemical modification sites of trastuzumab and endogenous human immunoglobulins at physiological conditions," *Commun. Biol.*, vol. 1, no. 28, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1038/s42003-018-0032-8.
- [35] A. Vaisman-Mentesh, M. Gutierrez-Gonzalez, B. J. DeKosky, and Y. Wine, "The Molecular Mechanisms That Underlie the Immune Biology of Anti-drug Antibody Formation Following Treatment With Monoclonal Antibodies," *Front. Immunol.*, vol. 11, no. August, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01951.

- [36] M. M. C. Van Beers and M. Bardor, "Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins," *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 12, pp. 1473–1484, 2012, doi: 10.1002/biot.201200065.
- [37] 1 OZAN S. KUMRU, 1 JUN LIU, 2 JUNYAN A. JI, 2 WILSON CHENG, 2 Y. JOHN WANG, 2 TINGTING WANG, 1 SANGEETA B. JOSHI and 1 DAVID B. VOLKIN1 C. RUSSELL MIDDUAGH, "Compatibility, Physical Stability, and Characterization of an IgG4 Monoclonal Antibody After Dilution into Different Intravenous Administration Bags," *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 10, pp. 3636–3651, 2012, doi: 10.1002/jps.
- [38] J. Fukuda, T. Iwura, S. Yanagihara, and K. Kano, "Factors to govern soluble and insoluble aggregate formation in mAbs," *Anal. Sci.*, vol. 31, pp. 1233–1240, 2015.
- [39] S. Hermeling, D. Crommelin, H. Schellekens, and W. Jiskoot, "Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins," *Pharm. Res.*, vol. 21, pp. 897–903, 2004.
- [40] I. Ordas, D. R. Mould, B. G. Feagan, and W. J. Sandborn, "Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 91, pp. 635–646, 2012.
- [41] H. Schellekens, "Biosimilar therapeutics – what do we need to consider?," *NDT Plus*, vol. 2, pp. 27–36, 2009.
- [42] T. T. Hansel, H. Kropshofer, T. Singer, J. A. Mitchell, and A. J. T. George, "The safety and side effects of monoclonal antibodies," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 9, no. 4, pp. 325–338, 2010, doi: 10.1038/nrd3003.
- [43] N. Aktar *et al.*, "Review Article Understanding of Immune Escape Mechanisms and Advances in Cancer Immunotherapy," *Hindawi*, vol. 10, no. 1155, pp. 1–13, 2022.
- [44] G. L. Beatty and W. L. Gladney, "Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy," *Clin. Cancer Res.*, no. 10, pp. 687–692, 2014, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1860.
- [45] J. B. Iorgulescu, D. Braun, G. Oliveira, D. B. Keskin, and C. J. Wu, "Acquired mechanisms of immune escape in cancer following immunotherapy," *Genome Med.*, vol. 2, pp. 2–5, 2018.
- [46] N. Alt *et al.*, "Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles," *Biologicals*, vol. 44, no. 5, pp. 291–305, 2016, doi: 10.1016/j.biologicals.2016.06.005.
- [47] A. Beck *et al.*, "Risk-Based Control Strategies of Recombinant Monoclonal

- Antibody Charge Variants," *Antibodies*, vol. 11, no. 4, pp. 1–25, 2022, doi: 10.3390/antib11040073.
- [48] R. Gleixner and A. Eon-duval, "Quality Attributes of Recombinant Therapeutic Proteins: An Assessment of Impact on Safety and Efficacy as Part of a Quality by Design Development Approach," *AICHE*, vol. 28, no. 3, pp. 608–622, 2012, doi: 10.1002/btpr.1548.
- [49] M. Jaffar-Aghaei *et al.*, "QbD-guided pharmaceutical development of Pembrolizumab biosimilar candidate PSG-024 propelled to industry meeting primary requirements of comparability to Keytruda[®]," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 173, no. April, p. 106171, 2022, doi: 10.1016/j.ejps.2022.106171.
- [50] A. S. Rathore, A. Weiskopf, and A. J. Reason, "Defining critical quality attributes for monoclonal antibody therapeutic products," *BioPharm Int.*, vol. 27, no. 7, pp. 34–43, 2015.
- [51] "Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations," *Food and Drugs Administration*. <https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations>.
- [52] S. K. Niazi, "Pharmaceutical Quality System," *Handb. Pharm. Manuf. Formul.*, pp. 24–31, 2020, doi: 10.1201/9781315102856-3.
- [53] European Medicines Agency, "ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development." p. EMA/CHMP/ICH/167068/2004, 2017.
- [54] European Medicines Agency, "ICH guideline Q9 on quality risk management." p. EMA/CHMP/ICH/24235/2006, 2015.
- [55] European Medicines Agency, "ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system." p. EMA/CHMP/ICH/214732/2007, 2015.
- [56] S. A. VanDuyse, M. J. Fulford, and M. G. Bartlett, "ICH Q10 PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM GUIDANCE: UNDERSTANDING ITS IMPACT ON PHARMACEUTICAL QUALITY," *AAPS J.*, vol. 23, 2021.
- [57] R. Sennoun, "Relations de l' ICH Q10 " Système qualité pharmaceutique " avec les standards ISO , les GMP et son application chez SGS Life Science Services," 2018.
- [58] S. Berdot, F. Gillaizeau, T. Caruba, P. Prognon, P. Durieux, and B. Sabatier, "Drug Administration Errors in Hospital Inpatients: A Systematic Review," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, pp. 1–11, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068856.
- [59] R. N. Keers, S. D. Williams, J. Cooke, and D. M. Ashcroft, "Causes of Medication

- Administration Errors in Hospitals: a Systematic Review of Quantitative and Qualitative Evidence," *Drug Saf.*, vol. 36, pp. 1045–1067, 2013, doi: 10.1007/s40264-013-0090-2.
- [60] R. N. Keers, S. D. Williams, J. Cooke, and D. M. Ashcroft, "Understanding the causes of intravenous medication administration errors in hospitals: a qualitative critical incident study," *BPJ open*, vol. 5, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1136/bmjopen-2014-005948.
- [61] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps), "Bonnes pratiques de préparation," *Bull. Off.*, vol. 2007/7 bis, no. 0, pp. 1–80, 2017, [Online]. Available: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/a5d6ae4b3d5fdee013ca463462b7b296.pdf.
- [62] Y. Le Basle, P. Chennell, N. Tokhadze, A. Astier, and V. Sautou, "Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review," *J. Pharm. Sci.*, vol. 109, no. 1, pp. 169–190, 2020, doi: 10.1016/j.xphs.2019.08.009.
- [63] C. Nowak *et al.*, "Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide," *MABs*, vol. 9, no. 8, pp. 1217–1230, 2017, doi: 10.1080/19420862.2017.1368602.
- [64] E. Zhang *et al.*, "Quality by Design–Based Assessment for Analytical Similarity of Adalimumab Biosimilar HLX03 to Humira®," *AAPS J.*, vol. 22, no. 3, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1208/s12248-020-00454-z.
- [65] L. Grassi and C. Cabrele, "Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous chemical modifications by oxidation, cyclization, and elimination reactions," *Amino Acids*, vol. 51, no. 10–12, pp. 1409–1431, 2019, doi: 10.1007/s00726-019-02787-2.
- [66] B. Yan *et al.*, "Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography / mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1164, pp. 153–161, 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.06.063.
- [67] L. K. Hmiel, K. A. Brorson, and M. T. Boyne, "Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 1, pp. 79–94, 2015, doi: 10.1007/s00216-014-8108-x.
- [68] S. Millán-martín *et al.*, "Inter-laboratory study of an optimised peptide mapping workflow using automated trypsin digestion for monitoring monoclonal antibody product quality attributes," *Anal. Bioanal. Chem.*, pp. 6833–6848, 2020.

- [69] Y. Wang, X. Li, Y. Liu, D. Richardson, H. Li, and X. Yang, "Simultaneous monitoring of oxidation, deamidation, isomerization, and glycosylation of monoclonal antibodies by liquid chromatography-mass spectrometry method with ultrafast tryptic digestion," *MAbs*, vol. 8, no. 8, pp. 1477–1486, 2016, doi: 10.1080/19420862.2016.1226715.
- [70] Y. Mimura *et al.*, "The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms," *Mol. Immunol.*, vol. 12, pp. 697–706, 2012.
- [71] R. Zeunik *et al.*, "Investigation of Immune Responses to Oxidation, Deamidation, And Isomerization in Therapeutic Antibodies using Preclinical Immunogenicity Risk Assessment Assays," *J. Pharm. Sci.*, vol. 111, pp. 2217–2229, 2022.
- [72] A. R. Evans, A. S. Hebert, J. Mulholland, M. J. Lewis, and P. Hu, "ID-MAM: A Validated Identity and Multi-Attribute Monitoring Method for Commercial Release and Stability Testing of a Bispecific Antibody," *Anal. Chem.*, vol. 93, no. 26, pp. 9166–9173, 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c01029.
- [73] Z. Hao *et al.*, "Multi-attribute method performance profile for quality control of monoclonal antibody therapeutics," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 205, p. 114330, 2021, doi: 10.1016/j.jpba.2021.114330.
- [74] X. Li *et al.*, "Analytical Performance Evaluation of Identity, Quality-Attribute Monitoring and new Peak Detection in a Platform Multi-Attribute Method Using Lys-C Digestion for Characterization and Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies," *J. Pharm. Sci.*, pp. 1–31, 2022, doi: 10.1016/j.xphs.2022.10.018.
- [75] V. Severino, "Monoclonal Antibodies - Quality Control and Quantification through Mass Spectrometry," *Mater. Methods*, vol. 6, pp. 1–13, 2016, [Online]. Available: <https://www.labome.com/method/Monoclonal-Antibodies-Quality-Control-and-Quantification-through-Mass-Spectrometry.html>.
- [76] A. Goyon *et al.*, "Streamlined Characterization of an Antibody-Drug Conjugate by Two-Dimensional and Four-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 91, pp. 14896–14903, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02454.
- [77] S. Oezipek, S. Hoelterhoff, S. Breuer, C. Bell, and A. Bathke, "mD-UPLC-MS/MS: Next Generation of mAb Characterization by Multidimensional Ultraperformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Parallel On-Column LysC and Trypsin Digestion," *Anal. Chem.*, vol. 94, no. 23, pp. 8136–8145, 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c04450.
- [78] L. Verscheure, A. Cerdobbel, P. Sandra, F. Lynen, and K. Sandra, "Monoclonal

- antibody charge variant characterization by fully automated four-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1653, p. 462409, 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462409.
- [79] J. Camperi, L. Dai, D. Guillarme, and C. Stella, "Development of a 3D-LC/MS Workflow for Fast, Automated, and Effective Characterization of Glycosylation Patterns of Biotherapeutic Products," *Anal. Chem.*, vol. 92, pp. 4357–4363, 2020.
- [80] "2008_Pan_Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn." .
- [81] Shire, *Stability of monoclonal antibodies (mAbs)*. 2015.
- [82] A. Sreedhara *et al.*, "Effect of ambient light on IgG1 monoclonal antibodies during drug product processing and development," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 100, pp. 38–46, 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.12.003.
- [83] S. Baubek, G. Natalia, V. de M. Nico.C, and B. Rainer, "Analytical tools for the characterization of deamidation in monoclonal antibodies," *J. Chromatogr. Open*, no. 10, pp. 1–11, 2022.
- [84] Y. Mimura *et al.*, "Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy," *Protein Cell*, no. Cdc, 2017, doi: 10.1007/s13238-017-0433-3.
- [85] M. S. Lim *et al.*, "Validation of Rapi-Fluor method for glycan profiling and application to commercial antibody drugs," *Talanta*, vol. 198, no. November 2018, pp. 105–110, 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.093.
- [86] P. W. Tebbey, A. Varga, M. Naill, J. Clewell, and J. Venema, "Consistency of quality attributes for the glycosylated monoclonal antibody Humira® (adalimumab)," *MABs*, vol. 7, no. 5, pp. 805–811, 2015, doi: 10.1080/19420862.2015.1073429.
- [87] M. Melmer *et al.*, "HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals," *Anal Bioanal Chem*, vol. 398, pp. 905–914, 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3988-x.
- [88] C. Kalonia *et al.*, "Effects of Protein Conformation, Apparent Solubility, and Protein-Protein Interactions on the Rates and Mechanisms of Aggregation for an IgG1 Monoclonal Antibody," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 29, pp. 7062–7075, 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b03878.
- [89] H. Liu and K. May, "Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function," *MABs*, vol. 4, no. 1, pp. 17–23, 2012, doi: 10.4161/mabs.4.1.18347.

- [90] G. Rouby, N. T. Tran, Y. Leblanc, M. Taverna, and N. Bihoreau, "Investigation of monoclonal antibody dimers in a final formulated drug by separation techniques coupled to native mass spectrometry," *MABs*, vol. 12, no. 1, 2020, doi: 10.1080/19420862.2020.1781743.
- [91] A. Singla, R. Bansal, V. Joshi, and A. S. Rathore, "Aggregation kinetics for IgG1-based monoclonal antibody therapeutics," *AAPS J.*, vol. 18, no. 3, pp. 689–702, 2016, doi: 10.1208/s12248-016-9887-0.
- [92] R. Bansal, S. Gupta, and A. S. Rathore, "Analytical Platform for Monitoring Aggregation of Monoclonal Antibody Therapeutics," *Pharm. Res.*, vol. 36, pp. 1–11, 2019.
- [93] R. M. Meyer, L. Berger, J. Nerkamp, S. Scheler, S. Nehring, and W. Friess, "Identification of monoclonal antibody variants involved in aggregate formation – Part 1: Charge variants," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 158, no. November 2020, pp. 123–131, 2021, doi: 10.1016/j.ejpb.2020.10.020.
- [94] R. M. Meyer, L. Berger, J. Nerkamp, S. Scheler, S. Nehring, and W. Friess, "Identification of monoclonal antibody variants involved in aggregate formation – Part 2: Hydrophobicity variants," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 160, no. January, pp. 134–142, 2021, doi: 10.1016/j.ejpb.2021.01.006.
- [95] J. Dobson *et al.*, "Inducing protein aggregation by extensional flow," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 18, pp. 4673–4678, 2017, doi: 10.1073/pnas.1702724114.
- [96] A. Zhang, S. K. Singh, M. R. Shirts, S. Kumar, and E. J. Fernandez, "Distinct Aggregation Mechanisms of Monoclonal Antibody Under Thermal and Freeze-Thaw Stresses Revealed by Hydrogen Exchange," *Pharm. Res.*, pp. 236–250, 2012, doi: 10.1007/s11095-011-0538-y.
- [97] J. Vlasak and R. Ionescu, "Fragmentation of monoclonal antibodies," *MABs*, no. June, pp. 253–263, 2011, doi: 10.4161/mabs.3.3.15608.
- [98] R. J. Harris, "Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function," *Dev. Biol.*, vol. 122, pp. 117–127, 2005.
- [99] S. K. Singh, G. Narula, and A. S. Rathore, "Should charge variants of monoclonal antibody therapeutics be considered critical quality attributes?," *Electrophoresis*, vol. 37, no. 17–18, pp. 2338–2346, 2016, doi: 10.1002/elps.201600078.
- [100] Y. D. Liu *et al.*, "Challenges and Strategies for a Thorough Characterization of Antibody Acidic Charge Variants," *Bioengineering*, vol. 9, no. 641, pp. 2–14, 2022.
- [101] S. K. Singh, D. Kumar, H. Malani, and A. S. Rathore, "LC–MS based case-by-case

- analysis of the impact of acidic and basic charge variants of bevacizumab on stability and biological activity," *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, 2021, doi: 10.1038/s41598-020-79541-2.
- [102] Y. Y. Zhao, N. Wang, W. H. Liu, W. J. Tao, L. L. Liu, and Z. D. Shen, "Charge variants of an avastin biosimilar isolation, characterization, in vitro properties and pharmacokinetics in rat," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151874.
- [103] Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, K. May, and H. Liu, "Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies Yi Du, A," *MAbs*, vol. 4, no. 5, pp. 578–585, 2012.
- [104] Q. Luo, M. K. Joubert, R. Stevenson, R. R. Ketchem, L. O. Narhi, and J. Wypych, "Chemical modifications in therapeutic protein aggregates generated under different stress conditions," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 28, pp. 25134–25144, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.160440.
- [105] J. Kahle, H. Zagst, R. Wiesner, and H. Wätzig, "Comparative charge-based separation study with various capillary electrophoresis (CE) modes and cation exchange chromatography (CEX) for the analysis of monoclonal antibodies," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 174, pp. 460–470, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.058.
- [106] M. Yüce *et al.*, "Fractionated charge variants of biosimilars: A review of separation methods, structural and functional analysis," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1152, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.12.064.
- [107] E. Chiaradia *et al.*, "Extracellular vesicles under oxidative stress conditions: Biological properties and physiological roles," *Cells*, vol. 10, no. 7, pp. 1–25, 2021, doi: 10.3390/cells10071763.
- [108] S. Fekete, A. Beck, and D. Guillarme, "Characterization of cation exchanger stationary phases applied for the separations of therapeutic monoclonal antibodies," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 111, pp. 169–176, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.03.041.
- [109] J. Kahle and H. Wätzig, "Determination of protein charge variants with (imaged) capillary isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 39, no. 20, pp. 2492–2511, 2018, doi: 10.1002/elps.201800079.
- [110] E. Farsang *et al.*, "Coupling non-denaturing chromatography to mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 185, p. 113207, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2020.113207.

- [111] F. Füssl, A. Trappe, K. Cook, K. Scheffler, O. Fitzgerald, and J. Bones, "Comprehensive characterisation of the heterogeneity of adalimumab via charge variant analysis hyphenated on-line to native high resolution Orbitrap mass spectrometry," *MAbs*, vol. 11, no. 1, pp. 116–128, 2019, doi: 10.1080/19420862.2018.1531664.
- [112] Y. Leblanc, V. Faid, M. A. Lauber, Q. Wang, N. Bihoreau, and G. Chevreux, "A generic method for intact and subunit level characterization of mAb charge variants by native mass spectrometry," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1133, p. 121814, 2019, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121814.
- [113] A. Murisier *et al.*, "Towards a simple on-line coupling of ion exchange chromatography and native mass spectrometry for the detailed characterization of monoclonal antibodies," *J. Chromatogr. A*, vol. 1655, p. 462499, 2021, doi: 10.1016/j.chroma.2021.462499.
- [114] S. Fekete, A. Beck, J. Veuthey, and D. Guillarme, "Analysis Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 113, pp. 43–55, 2015.
- [115] L. Bai, S. Burman, and L. Gledhill, "Development of ion exchange chromatography methods for monoclonal antibodies," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 22, pp. 605–611, 2000.
- [116] A. Goyon *et al.*, "Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1065–1066, no. September, pp. 119–128, 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.09.033.
- [117] A. P. Liu, Y. Yan, S. Wang, and N. Li, "Coupling Anion Exchange Chromatography with Native Mass Spectrometry for Charge Heterogeneity Characterization of Monoclonal Antibodies," *Anal. Chem.*, vol. 94, no. 16, pp. 6355–6362, 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.2c00707.
- [118] G. Ponniah, C. Nowak, A. Neill, and H. Liu, "Characterization of charge variants of a monoclonal antibody using weak anion exchange chromatography at subunit levels," *Anal. Biochem.*, vol. 520, pp. 49–57, 2017, doi: 10.1016/j.ab.2016.12.017.
- [119] A. Martinez-Ortega, A. Herrera, A. Sameron-Gracia, J. Cabeza, R. Perez-robles, and N. Navas, "Degradation and in-use stability study of five marketed therapeutic monoclonal antibodies by generic weak cation exchange liquid chromatographic method ((WCX) HPLC / DAD)," *J. Chromatogr. B*, vol. 1203, pp. 1–12, 2022.
- [120] F. Füssl, K. Cook, K. Scheffler, A. Farrell, S. Mittermayr, and J. Bones, "Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies Using Direct Coupled pH Gradient

- Cation Exchange Chromatography to High-Resolution Native Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 7, pp. 4669–4676, 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b05241.
- [121] G. Teshima *et al.*, "Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 15, pp. 2091–2097, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2010.10.107.
- [122] R. Jennifer, W. Yajun, M. Tony, R. Parikh, Y. Lou, and D. Farnan, "Monoclonal Antibody Development and Physicochemical Characterization by High Performance Ion Exchange Chromatography," in *Monoclonal Antibody Development and Physicochemical Characterization by High Performance Ion Exchange Chromatography*, 2012, pp. 440–464.
- [123] F. Szabolcs, A. Beck, F. Jenó, and D. Guillaume, "Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography , Part I: Salt gradient approach," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 102, pp. 33–44, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2014.08.035.
- [124] F. Szabolcs, A. Beck, F. Jenó, and D. Guillaume, "Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography , Part II: pH gradient approach," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 102, pp. 282–289, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2014.09.032.
- [125] E. Farsang *et al.*, "Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations , part 1 : Alternative mobile phases and fine tuning of the separation," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 168, pp. 138–147, 2019.
- [126] L. Zhang, T. Patapoff, D. Farnan, and B. Zhang, "Improving pH gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength," *J. Chromatogr. A*, vol. 1272, pp. 56–64, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2012.11.060.
- [127] M. Dadouch, Y. Ladner, and C. Perrin, "Analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis: Sample preparation, separation, and detection," *Separations*, vol. 8, no. 1, pp. 1–30, 2021, doi: 10.3390/separations8010004.
- [128] C. E. Espinosa- de la Garza *et al.*, "Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 34, no. 8, pp. 1133–1140, 2013, doi: 10.1002/elps.201200575.
- [129] V. Le-Minh, N. T. Tran, A. Makky, V. Rosilio, M. Taverna, and C. Smadja, "Capillary zone electrophoresis-native mass spectrometry for the quality control of intact therapeutic monoclonal antibodies," *J. Chromatogr. A*, vol. 1601, pp. 375–384, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.05.050.

- [130] B. Moritz *et al.*, "Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies," *J. Chromatogr. B*, vol. 983–984, pp. 101–110, 2015, doi: 10.1016/j.jchromb.2014.12.024.
- [131] Y. He, C. Isele, W. Hou, and M. Ruesch, "Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary," *J. Sep. Sci.*, vol. 34, no. 5, pp. 548–555, 2011, doi: 10.1002/jssc.201000719.
- [132] L. Leclercq, C. Renard, M. Martin, and H. Cottet, "Quantification of Adsorption and Optimization of Separation of Proteins in Capillary Electrophoresis," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 15, pp. 10743–10750, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c02012.
- [133] L. Leclercq, M. Morvan, J. Koch, C. Neusüß, and H. Cottet, "Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1057, pp. 152–161, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.01.008.
- [134] K. R. Johnson, M. Greguš, J. C. Kostas, and A. R. Ivanov, "Capillary Electrophoresis Coupled to Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for Ultra-Sensitive Proteomic Analysis of Limited Samples," *Anal. Chem.*, vol. 94, no. 2, pp. 704–713, 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c02929.
- [135] E. Jaccoulet, C. Smadja, P. Prognon, and M. Taverna, "Capillary electrophoresis for rapid identification of monoclonal antibodies for routine application in hospital," *Electrophoresis*, vol. 36, no. 17, pp. 2050–2056, 2015, doi: 10.1002/elps.201400603.
- [136] S. Hjertén and M. de Zhu, "Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing," *J. Chromatogr. A*, vol. 346, no. C, pp. 265–270, 1985, doi: 10.1016/S0021-9673(00)90512-0.
- [137] K. Shimura, *Capillary isoelectric focusing*. Elsevier Inc., 2018.
- [138] J. Kahle and H. Watzig, "Determination of protein charge variants with (imaged) Capillary Isoelectric Focusing and Capillary Zone Electrophoresis," *Electrophoresis*, 2018.
- [139] J. Wu, W. McElroy, J. Pawliszyn, and C. D. Heger, "Imaged capillary isoelectric focusing: Applications in the pharmaceutical industry and recent innovations of the technology," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 150, p. 116567, 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116567.
- [140] C. Silverman, M. Komar, K. Shields, G. Diegnan, and J. Adamovics, "Separation of the Isoforms of a Monoclonal Antibody by Gel Isoelectric Focusing, High

- Performance Liquid Chromatography and Capillary Isoelectric Focusing," *J. Liq. Chromatogr.*, vol. 15, no. 2, pp. 207–219, 1992.
- [141] N. T. Tran, M. Taverna, M. Chevalier, and D. Ferrier, "One-step capillary isoelectric focusing for the separation of the recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein glycoforms," *J. Chromatogr. A*, vol. 866, no. 1, pp. 121–135, 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(99)01045-6.
- [142] Y. Jin, G. Luo, T. Oka, and T. Manabe, "Estimation of isoelectric points of human plasma proteins employing capillary isoelectric focusing and peptide isoelectric point markers," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 19, pp. 3385–3391, 2002, doi: 10.1002/1522-2683(200210)23:19<3385::AID-ELPS3385>3.0.CO;2-H.
- [143] K. G. Moorhouse, C. A. Eusebio, G. Hunt, and A. B. Chen, "Rapid one-step capillary isoelectric focusing method to monitor charged glycoforms of recombinant human tissue-type plasminogen activator," *J. Chromatogr. A*, vol. 717, no. 1–2, pp. 61–69, 1995, doi: 10.1016/0021-9673(95)00565-6.
- [144] O. Salas-Solano *et al.*, "Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: An interlaboratory study," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3124–3129, 2012, doi: 10.1002/jssc.201200633.
- [145] D. Suba, Z. Urbányi, and A. Salgó, "Capillary isoelectric focusing method development and validation for investigation of recombinant therapeutic monoclonal antibody," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 114, pp. 53–61, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.037.
- [146] L. H. H. Silvertand, J. S. Toraño, W. P. van Bennekom, and G. J. de Jong, "Recent developments in capillary isoelectric focusing," *J. Chromatogr. A*, vol. 1204, no. 2, pp. 157–170, 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.05.057.
- [147] P. G. Righetti, R. Sebastiano, and A. Citterio, "Carrier ampholytes for IEF, on their fortieth anniversary (1967 – 2007), brought to trial in court: The verdict *," *Electrophoresis*, vol. 28, pp. 3799–3810, 2007, doi: 10.1002/elps.200700232.
- [148] C. Páger, A. Vargová, A. Takácsi-Nagy, Á. Dörnyei, and F. Kilár, "Effect of electrolyte pH on CIEF with narrow pH range ampholytes," *Electrophoresis*, vol. 33, no. 22, pp. 3269–3275, 2012, doi: 10.1002/elps.201200175.
- [149] A. Turner and J. E. Schiel, "Qualification of NISTmAb charge heterogeneity control assays," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, pp. 2079–2093, 2018.
- [150] G. Wu *et al.*, "Mass Spectrometry-Based Charge Heterogeneity Characterization of Therapeutic mAbs with Imaged Capillary Isoelectric Focusing and Ion-Exchange Chromatography as Separation Techniques," *Anal. Chem.*, vol. 95, pp. 2548–2560, 2023, doi: 10.1021/acs.analchem.2c05071.

- [151] X. He, M. ElNaggar, M. A. Ostrowski, A. Guttman, E. Gentalen, and J. Sperry, "Evaluation of an icIEF-MS system for comparable charge variant analysis of biotherapeutics with rapid peak identification by mass spectrometry," *Electrophoresis*, vol. 43, no. 11, pp. 1215–1222, 2022, doi: 10.1002/elps.202100295.
- [152] J. Dai, J. Lamp, Q. Xia, and Y. Zhang, "Capillary Isoelectric Focusing–Mass Spectrometry Method for the Separation and Online Characterization of Intact Monoclonal Antibody Charge Variants," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 3, pp. 2246–2254, 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b04608.
- [153] B. Hintersteiner, N. Lingg, E. Janzek, O. Mutschlechner, H. Loibner, and A. Jungbauer, "Microheterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies is governed by changes in the surface charge of the protein," *Biotechnol. J.*, vol. 11, no. 12, pp. 1617–1627, 2016, doi: 10.1002/biot.201600504.
- [154] B. Beyer, N. Walch, A. Jungbauer, and N. Lingg, "How similar is Biosimilar? A comparison of Infliximab Therapeutics in regard to charge variant profile and antigen Binding affinity," *Biotechnol. J.*, vol. 14, pp. 1–9, 2019.
- [155] M. Haverick, S. Mengisen, M. Shameem, and A. Ambrogelly, "Separation of mAbs molecular variants by analytical hydrophobic interaction chromatography HPLC: Overview and applications," *MABs*, vol. 6, no. 4, pp. 852–858, 2014, doi: 10.4161/mabs.28693.
- [156] D. Kroon, B. F. Alysia, and P. Lalan, "Identification of sites of Degradation in a Therapeutic Monoclonal Antibody by peptide Mapping," *Pharm. Res.*, vol. 9, no. 11, pp. 1386–1393, 1992.
- [157] A. Martínez-Ortega, A. Herrera, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros Rodríguez, and N. Navas, "Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab _ Elsevier Enhanced Reader.pdf," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, pp. 117–124, 2016.
- [158] L. Fornelli, D. Ayoub, K. Aizikov, A. Beck, and Y. O. Tsybin, "Middle-Down Analysis of Monoclonal Antibodies with Electron Transfer Dissociation Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 86, pp. 3005–3012, 2014.
- [159] A. Murisier *et al.*, "Ultra-Fast Middle-Up Reversed Phase Liquid Chromatography Analysis of Complex Bispecific Antibodies Obtained in Less Than One Minute," *Pharmaceutics*, vol. 14, pp. 2–9, 2022.
- [160] B. L. Duivelshof, S. Fekete, D. Guillarme, and V. D'Atri, "A generic workflow for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies—application to daratumumab," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 411, no. 19, pp. 4615–4627, 2019, doi:

10.1007/s00216-018-1561-1.

- [161] B. Bobály, V. D'Atri, M. Lauber, A. Beck, D. Guillarme, and S. Fekete, "Characterizing various monoclonal antibodies with milder reversed phase chromatography conditions," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1096, no. March, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1016/j.jchromb.2018.07.039.
- [162] S. Fekete, S. Rudaz, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, "Impact of mobile phase temperature on recovery and stability of monoclonal antibodies using recent reversed-phase stationary phases," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 22, pp. 3113–3123, 2012, doi: 10.1002/jssc.201200297.
- [163] Y. Yan, T. Xing, S. Wang, T. J. Daly, and N. Li, "Online coupling of analytical hydrophobic interaction chromatography with native mass spectroscopy for the characterization of monoclonal antibodies and related products," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 186, pp. 1–8, 2020.
- [164] S. Fekete, J.-L. Veuthey, A. Beck, and D. Guillarme, "Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products," pp. 1–50.
- [165] J. Valliere-Douglass, A. Wallace, and A. Balland, "Separation of populations of antibody variants by fine tuning of hydrophobic-interaction chromatography operating conditions," *J. Chromatogr. A*, vol. 1214, no. 1–2, pp. 81–89, 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.10.078.
- [166] H. I. Okur *et al.*, "Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions," *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, no. 9, pp. 1997–2014, 2017, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10797.
- [167] R. Majumdar *et al.*, "Effects of salts from the Hofmeister series on the conformational stability, aggregation propensity, and local flexibility of an IgG1 monoclonal antibody," *Biochemistry*, vol. 52, no. 19, pp. 3376–3389, 2013, doi: 10.1021/bi400232p.
- [168] J. Vajda and E. Müller, *Hydrophobic interaction chromatography for the purification of antibodies*. 2017.
- [169] J. RUBIN, L. LARS, C. WAYNE M., B. ANDREAS S., and B. SVEN H., "Salt-Induced Aggregation of a Monoclonal Human Immunoglobulin G1," *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no. 2, pp. 377–388, 2012, doi: 10.1002/jps.
- [170] B. Beyer and A. Jungbauer, "Conformational changes of antibodies upon adsorption onto hydrophobic interaction chromatography surfaces," *J. Chromatogr. A*, vol. 1552, pp. 60–66, 2018, doi: 10.1016/j.chroma.2018.04.009.

- [171] A. Cusumano, D. Guillarme, A. Beck, and S. Fekete, "Practical method development for the separation of monoclonal antibodies and antibody-drug-conjugate species in hydrophobic interaction chromatography, part 2: Optimization of the phase system," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 121, pp. 161–173, 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.01.037.
- [172] B. Wei, G. Han, J. Tang, W. Sandoval, and Y. T. Zhang, "Native Hydrophobic Interaction Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry for Characterization of Monoclonal Antibody Minor Variants," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 24, pp. 15360–15364, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b04467.
- [173] A. Etkirch *et al.*, "An Online Four-Dimensional HIC×SEC-IM×MS Methodology for Proof-of-Concept Characterization of Antibody Drug Conjugates," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 3, pp. 1578–1586, 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02110.
- [174] X. Wang, S. K. Singh, and S. Kumar, "Potential aggregation-prone regions in complementarity-determining regions of antibodies and their contribution towards antigen recognition: A computational analysis," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 8, pp. 1512–1529, 2010, doi: 10.1007/s11095-010-0143-5.
- [175] European Medicines Agency, "ICH Q6B: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products." p. CPMP/ICH/365/96, 1999.
- [176] M. Ahmadi *et al.*, "Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics," *Pharm. Res.*, vol. 32, no. 4, pp. 1383–1394, 2015, doi: 10.1007/s11095-014-1541-x.
- [177] E. Pharmacopoeia, *2.2.1. Clarity and degree of opalescence of liquids*. 2008.
- [178] W. Frie, H. Mahler, R. Mu, A. Delille, and S. Matheus, "Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 59, pp. 407–417, 2005, doi: 10.1016/j.ejpb.2004.12.004.
- [179] M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, and F. Delie, "Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no. 1, pp. 1–9, 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2007.08.001.
- [180] R. Paul *et al.*, "Structure and function of purified monoclonal antibody dimers induced by different stress conditions," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 8, pp. 2047–2059, 2012, doi: 10.1007/s11095-012-0732-6.
- [181] F. Plath *et al.*, "Characterization of mAb dimers reveals predominant dimer forms common in therapeutic mAbs," *MABs*, vol. 8, no. 5, pp. 928–940, 2016, doi: 10.1080/19420862.2016.1168960.

- [182] C. Huang, D. Sharma, P. Oma, and R. Krishnamurthy, "Quantitation of Protein Particles in Parenteral Solutions Using Micro-Flow Imaging," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 9, pp. 3058–3071, 2009, doi: 10.1002/jps.
- [183] U. Nobbmann *et al.*, "Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies," *Biotechnol. generic Eng. Rev.*, vol. 24, pp. 117–128, 2013, doi: 10.1080/02648725.2007.10648095.
- [184] C. S. F. Cheung, K. W. Anderson, P. M. Patel, K. L. Cade, K. W. Phinney, and I. V Turko, "A new approach to quantification of mAb aggregates using peptide affinity probes," *Nat. Publ. Gr.*, pp. 1–9, 2017, doi: 10.1038/srep42497.
- [185] A. Hawe, W. L. Hulse, W. Jiskoot, and R. T. Forbes, "Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for the size analysis of therapeutic peptides and proteins and their aggregates," *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 9, pp. 2302–2310, 2011, doi: 10.1007/s11095-011-0460-3.
- [186] A. Paar, "The principles of dynamic light scattering." <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>.
- [187] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot, "Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates," *Pharm. Res.*, vol. 27, no. 5, pp. 796–810, 2010, doi: 10.1007/s11095-010-0073-2.
- [188] R. Vasudev, S. Mathew, and N. Afonina, "Characterization of Submicron (0.1–1 μm) Particles in Therapeutic Proteins by Nanoparticle Tracking Analysis," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 5, pp. 1622–1631, 2015.
- [189] M. R. Moser and C. A. Baker, "Taylor dispersion analysis in fused silica capillaries: A tutorial review," *Anal. Methods*, vol. 13, no. 21, pp. 2357–2373, 2021, doi: 10.1039/d1ay00588j.
- [190] L. Leclercq and H. Cottet, "Fast Characterization of Polyelectrolyte Complexes by InlineCoupling of Capillary Electrophoresis to Taylor Dispersion Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 84, p. 1740–1743, 2012.
- [191] A. Lavoisier and J. M. Schlaeppi, "Early developability screen of therapeutic antibody candidates using Taylor dispersion analysis and UV area imaging detection," *MAbs*, vol. 7, no. 1, pp. 77–83, 2015, doi: 10.4161/19420862.2014.985544.
- [192] "Evaluation of Taylor dispersion injections: Determining kinetic/affinity interaction constants and diffusion coefficients in label-free biosensing," *Anal. Biochem.*, vol. 421, pp. 401–410, 2012.

- [193] M. Pederson, R. Haegebaert, J. Ostergaard, and H. Jensen, "Size-based characterization of adalimumab and TNF-alpha interactions using flow induced dispersion analysis: assessment of avidity-stabilized multiple bound species," *Nature*, vol. 11, 2011.
- [194] J. Biron and M. Martin, "On the optimization of operating conditions for Taylor dispersion analysis of mixtures," *Analyst*, vol. 139, pp. 3552–3562, 2014, doi: 10.1039/c4an00192c.
- [195] J. Hernández-Jiménez *et al.*, "Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 118, pp. 511–524, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.105.
- [196] "Unraveling the mysteries of modern size exclusion chromatography - the way to achieve confident characterization of therapeutic proteins," *J. Chromatogr. B*, vol. 1092, pp. 368–378, 2018.
- [197] A. Goyon, A. Beck, O. Colas, K. Sandra, D. Guillarme, and S. Fekete, "Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 μm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins," *J. Chromatogr. A*, vol. 1498, pp. 80–89, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2016.11.056.
- [198] J. Vajda, W. Conze, and E. Müller, "Kinetic plots in aqueous size exclusion chromatography of monoclonal antibodies and virus particles," *J. Chromatogr. A*, vol. 1426, pp. 118–125, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.11.057.
- [199] A. Goyon, A. Beck, J. L. Veuthey, D. Guillarme, and S. Fekete, "Comprehensive study on the effects of sodium and potassium additives in size exclusion chromatographic separations of protein biopharmaceuticals," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 144, pp. 242–251, 2017, doi: 10.1016/j.jpba.2016.09.031.
- [200] C. E. Espinosa-De La Garza, M. P. Miranda-Hernández, L. Acosta-Flores, N. O. Pérez, L. F. Flores-Ortiz, and E. Medina-Rivero, "Analysis of therapeutic proteins and peptides using multiangle light scattering coupled to ultra high performance liquid chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 38, no. 9, pp. 1537–1543, 2015, doi: 10.1002/jssc.201400863.
- [201] H. Ye, "Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering," *Anal. Biochem.*, vol. 356, no. 1, pp. 76–85, 2006, doi: 10.1016/j.ab.2006.05.025.
- [202] W. Fraunhofer and G. Winter, "The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 58, no. 2, pp. 369–383, 2004, doi: 10.1016/j.ejpb.2004.03.034.

- [203] B. Demeule, M. J. Lawrence, A. F. Drake, R. Gurny, and T. Arvinte, "Characterization of protein aggregation: The case of a therapeutic immunoglobulin," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1774, no. 1, pp. 146–153, 2007, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.10.010.
- [204] F. Meier and G. Heinzmann, "Field-Flow Fractionation: A powerful technology for the separation and advanced characterization of proteins, antibodies, viruses, polymers and nano-/microparticles," *Chimie.de*, pp. 1–34, 2017.
- [205] R. Wiesner, C. Scheller, F. Krebs, H. Wätzig, and I. Oltmann-Norden, "A comparative study of CE-SDS, SDS-PAGE, and Simple Western: Influences of sample preparation on molecular weight determination of proteins," *Electrophoresis*, vol. 42, no. 3, pp. 206–218, 2021, doi: 10.1002/elps.202000199.
- [206] H. Kaur, J. Beckman, Y. Zhang, Z. J. Li, M. Szigeti, and A. Guttman, "Capillary electrophoresis and the biopharmaceutical industry," *Trends Anal. Chem.*, vol. 144, pp. 2–10, 2021.
- [207] A. Lechner, J. Giorgetti, R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, and Y. N. François, "Insights from capillary electrophoresis approaches for characterization of monoclonal antibodies and antibody drug conjugates in the period 2016–2018," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1122–1123, no. May, pp. 1–17, 2019, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.05.014.
- [208] S. Uchiyama, M. Noda, and E. Krayukhina, "Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation for characterization of therapeutic antibodies," *Biophys. Rev.*, vol. 10, no. 2, pp. 259–269, 2018, doi: 10.1007/s12551-017-0374-3.
- [209] A. Pekar and M. Sukumar, "Quantitation of aggregates in therapeutic proteins using sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: Practical considerations that affect precision and accuracy," *Anal. Biochem.*, vol. 367, no. 2, pp. 225–237, 2007, doi: 10.1016/j.ab.2007.04.035.
- [210] M. F. Pignataro, M. G. Herrera, and V. I. Dodero, "Evaluation of Peptide/Protein Self-Assembly and Aggregation by Spectroscopic Methods," *Molecules*, vol. 25, pp. 2–35, 2020, doi: 10.3390/molecules25204854.
- [211] G. Young *et al.*, "Quantitative mass imaging of single biological macromolecules," *Science (80-.)*, vol. 360, no. 6387, pp. 423–427, 2018, doi: 10.1126/science.aar5839.
- [212] A. Fineberg, T. Surrey, and P. Kukura, "Quantifying the Monomer–Dimer Equilibrium of Tubulin with Mass Photometry," *J. Mol. Biol.*, vol. 432, no. 23, pp. 6168–6172, 2020, doi: 10.1016/j.jmb.2020.10.013.
- [213] F. Soltermann *et al.*, "Quantifying Protein–Protein Interactions by Molecular

- Counting with Mass Photometry," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 59, no. 27, pp. 10774–10779, 2020, doi: 10.1002/anie.202001578.
- [214] R. Asor and P. Kukura, "Characterising biomolecular interactions and dynamics with mass photometry," *Chem. Biol.*, vol. 68, pp. 1–8, 2022.
- [215] D. Wu and G. Piszczek, "Rapid Determination of Antibody-Antigen Affinity by Mass Photometry," *J. Vis Exp.*, vol. 168, 2021, doi: 10.4049/jimmunol.1801473.The.
- [216] K. Pisupati *et al.*, "A Multidimensional Analytical Comparison of Remicade and the Biosimilar Remsima," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 9, pp. 4838–4846, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04436.A.
- [217] Y. Yang *et al.*, "Detecting low level sequence variants in recombinant monoclonal antibodies Detecting low level sequence variants in recombinant monoclonal antibodies," *MABs*, vol. 0862, no. May, 2010, doi: 10.4161/mabs.2.3.11718.
- [218] J. Bongers *et al.*, "Validation of a peptide mapping method for a therapeutic monoclonal antibody: what could we possibly learn about a method we have run 100 times?," *J. Pharm. Anal.*, vol. 21, pp. 1099–1128, 2000.
- [219] "LC-MS characterization of antibody based therapeutics: recent highlights and future projects," in *Approaches to the purification, analysis and characterization antibody-based therapeutics*, 2016, pp. 1–31.
- [220] O. O. Dada, Y. M. Zhao, N. Jaya, and O. Salas-Solano, "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," *Anal. Chem.*, vol. 89, pp. 11236–11242., 2017.
- [221] L. W. Dick, D. Mahon, D. Qiu, and K. C. Cheng, "Peptide mapping of therapeutic monoclonal antibodies: Improvements for increased speed and fewer artifacts," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 3, pp. 230–236, 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.12.009.
- [222] J. Camperi, D. Guillarme, and C. Stella, "monoclonal antibodies by multi-dimensional LC / MS Targeted bottom-up characterization of recombinant monoclonal antibodies by multi-dimensional LC / MS," *Anal. Chem.*, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c02780.
- [223] X. Li *et al.*, "High throughput peptide mapping method for analysis of site specific monoclonal antibody oxidation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1460, pp. 51–60, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.06.085.
- [224] J. A. Pavon *et al.*, "Analysis of monoclonal antibody oxidation by simple mixed

- mode chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1431, pp. 154–165, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2015.12.068.
- [225] M. Cao *et al.*, "Characterization and quantification of succinimide using peptide mapping under low-pH conditions and hydrophobic interaction chromatography," *Anal. Biochem.*, vol. 566, no. April 2019, pp. 151–159, 2019, doi: 10.1016/j.ab.2018.11.021.
- [226] M. Cao *et al.*, "Charge variants characterization and release assay development for co-formulated antibodies as a combination therapy," *MAbs*, vol. 11, no. 3, pp. 489–499, 2019, doi: 10.1080/19420862.2019.1578137.
- [227] R. Gahoual, A. Beck, Y.-N. François, and E. Leize-Wagner, "Independent highly sensitive characterization of asparagine deamidation and aspartic acid isomerization by sheathless CZE-ESI-MS/MS," *J. Mass Spectrom.*, vol. 51, pp. 150–158, 2016.
- [228] L. W. D. Jr, C. Kim, D. Qiu, and K. Cheng, "Determination of the Origin of the N-Terminal Pyro-Glutamate Variation in Monoclonal Antibodies Using Model Peptides," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 97, no. 3, pp. 544–553, 2007, doi: 10.1002/bit.
- [229] L. W. D. Jr, D. Qiu, D. Mahon, M. Adamo, and K. Cheng, "C-Terminal Lysine Variants in Fully Human Monoclonal Antibodies: Investigation of Test Methods and Possible Causes," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 100, no. 6, pp. 1132–1143, 2008, doi: 10.1002/bit.21855.
- [230] Y. Wang, "What is Peptide Mapping?," 2022. <https://www.rapidnovor.com/what-is-peptide-mapping/>.
- [231] B. S. McAvan *et al.*, "Raman Spectroscopy to Monitor Post-Translational Modifications and Degradation in Monoclonal Antibody Therapeutics," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 15, pp. 10381–10389, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c00627.
- [232] B. S. McAvan, A. P. France, B. Bellina, P. E. Barran, R. Goodacre, and A. J. Doig, "Quantification of protein glycation using vibrational spectroscopy," *Analyst*, vol. 145, no. 10, pp. 3686–3696, 2020, doi: 10.1039/c9an02318f.
- [233] K. A. Esmonde, W. Maryann, and C. Ian, "The role of Raman spectroscopy in biopharmaceuticals from development to manufacturing," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 414, pp. 969–991, 2022.
- [234] S. Pieters, J. M. Roger, T. De Beer, M. D'Hondt, B. De Spiegeleer, and Y. Vander Heyden, "Raman model development for the protein conformational state classification in different freeze-dried formulations," *Anal. Chim. Acta*, vol. 825, pp. 42–50, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.03.027.

- [235] C. Zhang, J. S. Springall, X. Wang, I. Barman, B. Development, and R. Science, "Rapid, quantitative determination of aggregation and particle formation for antibody drug conjugate therapeutics with label-free Raman spectroscopy," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1081, pp. 138–145, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.07.007.Rapid.
- [236] S. Matheus, W. Friess, and H. Mahler, "FTIR and nDSC as Analytical Tools for High-Concentration Protein Formulations," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 6, pp. 1350–1363, 2006, doi: 10.1007/s11095-006-0142-8.
- [237] J. C. Lin, Z. K. Glover, and A. Sreedhara, "Assessing the Utility of Circular Dichroism and FTIR Spectroscopy in Monoclonal-Antibody Comparability Studies," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 12, pp. 4459–4466, 2015, doi: 10.1002/jps.24683.
- [238] H. Yao, E. Wynendaele, X. Xu, A. Kosgei, and B. De Spiegeleer, "Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 147, pp. 50–64, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.08.031.
- [239] V. Joshi, T. Shivach, N. Yadav, and A. S. Rathore, "Circular dichroism spectroscopy as a tool for monitoring aggregation in monoclonal antibody therapeutics," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 23, pp. 11606–11613, 2014, doi: 10.1021/ac503140j.
- [240] P. Garidel, M. Hegyi, S. Bassarab, and M. Weichel, "A rapid, sensitive and economical assessment of monoclonal antibody conformational stability by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy," *Biotechnol. J.*, vol. 3, pp. 1201–1211, 2008, doi: 10.1002/biot.200800091.
- [241] C. Huang, M. Hsieh, and Q. Zhou, "Application of Tryptophan Fluorescence Bandwidth-Maximum Plot in Analysis of Monoclonal Antibody Structure Application of Tryptophan Fluorescence Bandwidth-Maximum Plot in Analysis of Monoclonal Antibody Structure," *AAPS PharmSciTech*, no. August, 2017, doi: 10.1208/s12249-016-0568-1.
- [242] E. Christofi and P. Barran, "Ion Mobility Mass Spectrometry (IM-MS) for Structural Biology: Insights Gained by Measuring Mass, Charge, and Collision Cross Section," *Chem. Rev.*, vol. 123, pp. 2902–2949, 2023, doi: 10.1021/acs.chemrev.2c00600.
- [243] G. Terral, A. Beck, and S. Cianféroni, "Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1032, pp. 79–90, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.03.044.
- [244] G. Ben-Nissan and M. Sharon, "The application of ion-mobility mass spectrometry for structure/function investigation of protein complexes," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 42, pp. 25–33, 2018.

- [245] E. Deslignière, S. Ollivier, A. Beck, D. Ropartz, and S. Cianf, "Benefits and Limitations of High-Resolution Cyclic IM-MS for Conformational Characterization of Native Therapeutic Monoclonal Antibodies," *Anal. Chem.*, vol. 95, pp. 4162–4171, 2023.
- [246] O. Hernandez-alba *et al.*, "Native Mass Spectrometry , Ion Mobility , and Collision-Induced Unfolding for Conformational Characterization of IgG4 Monoclonal Antibodies To cite this version: HAL Id: hal-02327964 Native Mass Spectrometry , Ion Mobility and Collision Induced Un- fold," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 15, pp. 8865–8872, 2018.
- [247] S. M. Mercier, B. Diepenbroek, R. H. Wijffels, and M. Streefland, "Multivariate PAT solutions for biopharmaceutical cultivation: current progress and limitations," vol. 32, no. 6, pp. 329–336, 2014.
- [248] "Pharmaceutical Quality for the 21st Century A Risk-Based Approach Progress Report," *Department of Health and Human Services U.S. Food and Drug Administration*, 2007. <https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/pharmaceutical-quality-21st-century-risk-based-approach-progress-report>.
- [249] S. Carillo, A. Criscuolo, F. Füssl, K. Cook, and J. Bones, "Intact multi-attribute method (iMAM): A flexible tool for the analysis of monoclonal antibodies," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 177, no. May, pp. 241–248, 2022, doi: 10.1016/j.ejpb.2022.07.005.
- [250] A. R. Tôrres, A. Diógenes, P. De Oliveira, S. Grangeiro, and W. D. Frago, "Multivariate statistical process control in annual pharmaceutical product review," *J. Process Control*, vol. 69, pp. 97–102, 2018, doi: 10.1016/j.jprocont.2018.06.001.
- [251] "Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance," *U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) Office of Regulatory Affairs (ORA)*, 2004. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances>.
- [252] S. Challa and R. Potumarthi, "Chemometrics-Based Process Analytical Technology (PAT) Tools: Applications and Adaptation in Pharmaceutical and Biopharmaceutical Industries," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 169, pp. 66–76, 2013, doi: 10.1007/s12010-012-9950-y.
- [253] W. Torsten and D. Version, "Process analytical technology (PAT) for biopharmaceuticals," *Biotechnol. J.*, vol. 6, pp. 369–377, 2011, doi:

10.1002/biot.201000356.

- [254] M. Banner *et al.*, "A decade in review: use of data analytics within the biopharmaceutical sector," *Chem. Eng.*, vol. 34, pp. 2–10, 2021.
- [255] R. Singh, A. Sahay, K. M. Karry, F. Muzzio, M. Ierapetritou, and R. Ramachandran, "Implementation of an advanced hybrid MPC – PID control system using PAT tools into a direct compaction continuous pharmaceutical tablet manufacturing pilot plant," *Int. J. Pharm.*, vol. 473, no. 1–2, pp. 38–54, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.045.
- [256] A. Olivieri and A. C., "Analytical Advantages of Multivariate Data Processing . One , Two , Three , Infinity?," *Anal. Chem.*, vol. xxx, no. xx, 2007.
- [257] J. Boccard and S. Rudaz, "Harnessing the complexity of metabolomic data with chemometrics," *J. Chemom.*, vol. 28, pp. 1–9, 2014, doi: 10.1002/cem.2567.
- [258] S. Rudaz, J. Boccard, and J.-L. Veuthey, "Knowledge discovery in metabolomics: An overview of MS data handling," *J. Sep. Sci.*, vol. 33, pp. 290–304, 2010, doi: 10.1002/jssc.200900609.
- [259] D. Guillarme, J. Schappler, J. Boccard, J.-L. Veuthey, and S. Rudaz, "New Insights in Pharmaceutical Analysis," *Chimia (Aarau).*, vol. 66, no. 5, pp. 330–334, 2012.
- [260] A. P. Ferreira and M. Tobyn, "Multivariate analysis in the pharmaceutical industry: enabling process understanding and improvement in the PAT and QbD era," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 20, no. 5, pp. 513–527, 2015, doi: 10.3109/10837450.2014.898656.
- [261] J. Huang *et al.*, "Quality by design case study: An integrated multivariate approach to drug product and process development," *Int. J. Pharm.*, vol. 382, no. 1–2, pp. 23–32, 2009, doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.07.031.
- [262] A. S. Rathore, N. Bhushan, and S. Hadpe, "Chemometrics applications in biotech processes: A review," *Biotechnol. Prog.*, vol. 27, no. 2, pp. 307–315, 2011, doi: 10.1002/btpr.561.
- [263] T. Kourti, "The Process Analytical Technology initiative and multivariate process analysis, monitoring and control," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 384, no. 5, pp. 1043–1048, 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0303-y.
- [264] J. A. Lopes, P. F. Costa, T. P. Alves, and J. C. Menezes, "Chemometric Process Analytical Technology (PAT) applications in bioprocess engineering," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 74, no. 2 SPEC.ISS., pp. 269–275, 2004, doi: 10.1016/j.chemolab.2004.07.006.

- [265] P. Nomikos and J. F. MacGregor, "Monitoring batch processes using multiway principal component analysis," *AIChE J.*, vol. 40, no. 8, pp. 1361–1375, 1994, doi: 10.1002/aic.690400809.
- [266] P. Nomikos and J. F. MacGregor, "Multi-way partial least squares in monitoring batch processes," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 30, no. 1, pp. 97–108, 1995, doi: 10.1016/0169-7439(95)00043-7.
- [267] S. Navea, R. Tauler, E. Goormaghtigh, and A. de Juan, "Chemometric tools for classification and elucidation of protein secondary structure from infrared and circular dichroism spectroscopic measurements," *Proteins*, vol. 63, no. 3, pp. 527–541, 2006.
- [268] S. Pieters *et al.*, "Raman spectroscopy and multivariate analysis for the rapid discrimination between native-like and non-native states in freeze-dried protein formulations," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 85, no. 2, pp. 263–271, 2013, doi: 10.1016/j.ejpb.2013.03.035.
- [269] M. Saikat, Y. Jun, S. Maitra, and J. Yan, "Principle Component Analysis and Partial Least Squares: Two Dimension Reduction Techniques for Regression," *Casualty Actuar. Soc.*, pp. 79–90, 2008.
- [270] E. Jaccoulet, J. Boccard, M. Taverna, A. S. Azevedos, S. Rudaz, and C. Smadja, "High-throughput identification of monoclonal antibodies after compounding by UV spectroscopy coupled to chemometrics analysis," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 21, pp. 5915–5924, 2016, doi: 10.1007/s00216-016-9708-4.
- [271] C. A. Sellick *et al.*, "Rapid monitoring of recombinant antibody production by mammalian cell cultures using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 106, no. 3, pp. 432–442, 2010, doi: 10.1002/bit.22707.
- [272] C. Eliasson *et al.*, "Non-invasive quantitative assessment of the content of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 47, pp. 221–229, 2008, doi: 10.1016/j.jpba.2008.01.013.
- [273] C. Jones, "Circular dichroism of biopharmaceutical proteins in a quality-regulated environment," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 219, 2022.
- [274] S. Wold and M. Sjostrom, "PLS-regression: a basic tool of chemometrics," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 58, pp. 109–130, 2001.
- [275] S. Wold, "Cross-Validatory Estimation of the Number of Components in Factor and Principal Components Models," *Technometrics*, vol. 20, pp. 397–405, 1978.
- [276] D. Ballabio and V. Consonni, "Classification tools in chemistry. Part 1: linear

- models. PLS-DA," *Anal. Methods*, vol. 5, pp. 3790–3798, 2013, doi: 10.1039/c3ay40582f.
- [277] A. M. Jim, S. Martín-torres, and F. Ortega-gavil, "Talanta PLS-DA vs sparse PLS-DA in food traceability . A case study: Authentication of avocado samples," *Talanta*, vol. 224, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121904.
- [278] E. Trullols, I. Ruisánchez, F. X. Rius, and J. Huguet, "Validation of qualitative methods of analysis that use control samples," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 24, no. 6, pp. 516–524, 2005, doi: 10.1016/j.trac.2005.04.001.
- [279] L. C. Preda Christian, Saporta Gilbert, "PLS classification function," *Computational Statistics*, vol. 22, no. 2. pp. 223–235, 2007, doi: 10.1007/s00180-007-0041-4.
- [280] J. Pezzatti *et al.*, "Implementation of liquid chromatography–high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1105, pp. 28–44, 2022.
- [281] J. W. McIlroy, R. W. Smith, and V. L. McGuffin, "Assessing the effect of data pretreatment procedures for principal components analysis of chromatographic data," *Forensic Sci. Int.*, vol. 257, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1016/j.forsciint.2015.07.038.
- [282] J. Engel *et al.*, "Breaking with trends in pre-processing," *Trends Anal. Chem.*, vol. 50, pp. 96–106, 2013.
- [283] R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, and M. J. van der Werf, "Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data," *BMC Genomics*, vol. 7, pp. 1–15, 2006, doi: 10.1186/1471-2164-7-142.
- [284] P. Geladi and B. Kowalski, "Partial least-squares regression: a tutorial," *Anal. Chim. Acta*, vol. 185, pp. 1–17, 1986.
- [285] H. C. Keun *et al.*, "Improved analysis of multivariate data by variable stability scaling: Application to NMR-based metabolic profiling," *Anal. Chim. Acta*, vol. 490, no. 1–2, pp. 265–276, 2003, doi: 10.1016/S0003-2670(03)00094-1.
- [286] E. Jaccoulet, T. Daniel, D. Dammak, P. Prognon, and E. Caudron, "Interest of flow injection spectrophotometry as an orthogonal method for analyzing biomolecule aggregates: Application to stressed monoclonal antibody study," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 251, p. 119436, 2021, doi: 10.1016/j.saa.2021.119436.
- [287] E. J. Kim, J. H. Kim, M. Kim, S. H. Jeong, and D. H. Choi, "Process Analytical Technology Tools for Monitoring Pharmaceutical Unit Operations: A Control

- Strategy for Continuous Process Verification," *Pharmaceutics*, vol. 13, pp. 2–45, 2021.
- [288] B. Wei *et al.*, "Multi-attribute Raman spectroscopy (MARS) for monitoring product quality attributes in formulated monoclonal antibody therapeutics," *MAbs*, vol. 14, no. 1, 2022, doi: 10.1080/19420862.2021.2007564.
- [289] L. Minh *et al.*, "Optimization of classification and regression analysis of four monoclonal antibodies from Raman spectra using collaborative machine learning approach Author ' s Accepted Manuscript," *Talanta*, vol. 184, pp. 260–265, 2018.
- [290] S. Goldrick *et al.*, "High-Throughput Raman Spectroscopy Combined with Innovate Data Analysis Workflow to Enhance," *Processes*, vol. 8, pp. 2–31, 2020.
- [291] I. Council, T. Requirements, and H. Use, "Overview of ICH," no. June, 2022.
- [292] A. Kulakova *et al.*, "Chemometrics in Protein Formulation: Stability Governed by Repulsion and Protein Unfolding," *Mol. Pharm.*, 2023.
- [293] H. Svilenov, U. Markoja, and G. Winter, "Isothermal chemical denaturation as complementary tool to overcome limitations of thermal differential scanning fluorimetry in predicting physical stability of protein formulations," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 106, pp. 106–113, 2018.
- [294] S. M. Shatat, M. A. Al-ghobashy, F. A. Fathalla, S. S. Abbas, and B. M. Eltanany, "Coupling of Trastuzumab chromatographic profiling with machine learning tools: A complementary approach for biosimilarity and stability assessment," *J. Chromatogr. B*, vol. 1184, no. September, p. 122976, 2021, doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122976.
- [295] L. A. Hassan, S. M. Shatat, B. M. Eltanany, M. A. Al-ghobashy, and S. S. Abbas, "Analytical Methods using an orthogonal testing protocol and mapping †," *Anal. Methods*, vol. 11, pp. 3198–3211, 2019, doi: 10.1039/c9ay00903e.
- [296] E. Jaccoulet, A. Schweitzer-Chaput, B. Toussaint, P. Prognon, and E. Caudron, "Simple and ultra-fast recognition and quantitation of compounded monoclonal antibodies: Application to flow injection analysis combined to UV spectroscopy and matching method," *Talanta*, vol. 187, no. May, pp. 279–286, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.05.042.
- [297] Y. Qiu *et al.*, "Systematic review with meta-analysis: loss of response and requirement of anti-TNF α dose intensification in Crohn's disease," *J. Gastroenterol.*, vol. 52, no. 5, pp. 535–554, 2017, doi: 10.1007/s00535-017-1324-3.

- [298] S. S. Said and W. N. Ibrahim, "Cancer Resistance to Immunotherapy: Comprehensive Insights with Future Perspectives," *Pharmaceutics*, vol. 15, pp. 2–31, 2023.
- [299] A. Cassotta *et al.*, "A single T cell epitope drives the neutralizing anti-drug antibody response to natalizumab in multiple sclerosis patients," *Nat. Med.*, vol. 25, no. September, 2019, doi: 10.1038/s41591-019-0568-2.
- [300] C. Mbogning *et al.*, "Occurrence of Anti-Drug Antibodies against Interferon-Beta and Natalizumab in Multiple Sclerosis: A Collaborative Cohort Analysis," *pone*, vol. 30, pp. 1–19, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0162752.
- [301] A. Torrente-López, J. Hermosilla, A. Salmerón-García, J. Cabeza, and N. Navas, "Comprehensive Analysis of Nivolumab, A Therapeutic Anti-Pd-1 Monoclonal Antibody: Impact of Handling and Stress," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 4, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14040692.
- [302] L. Havard, B. Bonan, J. Huen, Y. Roche, and P. Prognon, "Le contrôle de qualité en unité centralisée de reconstitution des cytotoxiques: mythe ou réalité?," *Pharma Prat.*, vol. 15, pp. 148–160, 2005.
- [303] P. Bedouch *et al.*, "La sécurisation du circuit du médicament dans les établissements de santé : données actuelles et expérience du centre hospitalier universitaire de Grenoble," *Ann. Pharm. Fr.*, vol. 67, no. 1, pp. 3–15, 2009, doi: 10.1016/j.pharma.2008.10.006.
- [304] F. Martin *et al.*, "PREVENTION OF PREPARATION ERRORS OF CYTOTOXIC DRUGS IN CENTRALIZED UNITS: FROM EPIDEMIOLOGY TO QUALITY ASSURANCE," *Bull. Cancer*, vol. 91, pp. 972–976, 2004.
- [305] Legifrance, "Article R5126-9 - Code de la santé publique," *Code de la santé publique*, 2023. [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000038598073/#:~:text=Une pharmacie à usage intérieur peut être autorisée à assurer,sens de l'article L.](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000038598073/#:~:text=Une%20pharmacie%20%C3%A0%20usage%20int%C3%A9rieur%20peut%20%C3%AAtre%20autoris%C3%A9e%20%C3%A0%20assurer,sens%20de%20l%27article%20L.)
- [306] M. J. and M. C. W.-L. S. Limat, J.P. Drouhin, K. Demesmay, E. Tissot, "Incidence and risk factors of preparation errors in a centralized cytotoxic preparation unit," *Pharm. world Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 102–106, 2001.
- [307] A. (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de Santé), "Les bonnes pratiques des préparations hospitalières," 2023. <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-preparation>.
- [308] H. Zenier and A. N. Professeur, "Contrôle analytique des préparations cytotoxiques: bilan de 7 ans d'activité et perspectives," *Le Pharm. Hosp. Clin.*, vol.

- 50, pp. 233–242, 2015, doi: 10.1016/j.phclin.2014.07.012.
- [309] C. Berge-Bouchara, M. Hergli, and E. Olivier, "Contrôle des préparations hospitalières et magistrales : quelles pratiques dans les pharmacies à usage intérieur d'établissements de santé," *Pharm. Hosp. Clin.*, vol. 52, no. 1, pp. 26–32, 2017, doi: 10.1016/j.phclin.2016.10.060.
- [310] C. Bazin, B. Cassard, E. Caudron, P. Prognon, and L. Havard, "Comparative analysis of methods for real-time analytical control of chemotherapies preparations," *Int. J. Pharm.*, vol. 494, no. 1, pp. 329–336, 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.041.
- [311] M. Floutier, "Contrôle vidéo des préparations de chimiothérapie par le dispositif Drugcam[®] : analyse rétrospective sur trois ans à l'Institut Paoli-Calmettes , centre régional de lutte contre le cancer de Marseille," 2020.
- [312] A. Delmas *et al.*, "Quantitative and qualitative control of cytotoxic preparations by HPLC-UV in a centralized parenteral preparations unit," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 49, pp. 1213–1220, 2009, doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.007.
- [313] A. Camut, "Mise en place du contrôle terminal des préparations d'anticancéreux injectables par spectrométrie UV-visible-IRTF, Multispec[®] à l'Unité de Pharmacie Clinique et Cancérologique de l'Hôpital Bon Secours de Metz: aspects analytiques et organisationnels," 2018.
- [314] P. Bourget, A. Amin, F. Vidal, C. Merlette, P. Troude, and A. Baillet-guffroy, "The contribution of Raman spectroscopy to the analytical quality control of cytotoxic drugs in a hospital environment: Eliminating the exposure risks for staff members and their work environment," *Int. J. Pharm.*, vol. 470, no. 1–2, pp. 70–76, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.04.064.
- [315] D. Ruiz-Perez, H. Guan, P. Madhivanan, K. Mathee, and G. Narasimhan, "So you think you can PLS-DA?," *BMC Bioinformatics*, vol. 21, 2020, doi: 10.1186/s12859-019-3310-7.
- [316] E. Szymańska, E. Saccenti, A. K. Smilde, and J. A. Westerhuis, "Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies," *Metabolomics*, vol. 8, pp. 3–16, 2012, doi: 10.1007/s11306-011-0330-3.
- [317] and H. L. L. Dawn M Ecker, Susan Dana Jones, "The therapeutic monoclonal antibody market," *MAbs*, vol. 1, pp. 9–14, 2015, doi: 10.1172/JCI103931.
- [318] H.-J. L. & H.-C. W. Ruei-Min Lu, Yu-Chyi Hwang, I-Ju Liu, Chi-Chiu Lee, Han-Zen Tsai, "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases," *J. Biomed. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–30, 2020, doi: 10.1186/s43556-022-00098-9.
- [319] S. M. Singh, S. Bandi, D. N. M. Jones, and K. M. G. Mallela, *Effect of Polysorbate 20*

and Polysorbate 80 on the Higher-Order Structure of a Monoclonal Antibody and Its Fab and Fc Fragments Probed Using 2D Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, vol. 106, no. 12. American Pharmacists Association, 2017.

- [320] T. Laptoš and J. Omersel, "The importance of handling high-value biologicals: Physico-chemical instability and immunogenicity of monoclonal antibodies (Review)," *Exp. Ther. Med.*, vol. 15, pp. 3161–3168, 2018, doi: 10.3892/etm.2018.5821.
- [321] H. Ma, "Antibody stability: A key to performance - Analysis , influences and improvement," *Biochimie*, vol. 177, pp. 213–225, 2020, doi: 10.1016/j.biochi.2020.08.019.
- [322] E. Tamizi and A. Jouyban, "Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 98, no. November, pp. 26–46, 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.10.016.
- [323] C. Nowak *et al.*, "Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide," *MAbs*, vol. 9, no. 8, pp. 1217–1230, 2017, doi: 10.1080/19420862.2017.1368602.
- [324] E. Jaccoulet, T. Daniel, P. Prognon, and E. Caudron, "Forced Degradation of Monoclonal Antibodies After Compounding: Impact on Routine Hospital Quality Control," *J. Pharm. Sci.*, vol. 108, no. 10, pp. 3252–3261, 2019, doi: 10.1016/j.xphs.2019.06.004.
- [325] B. M. Greenwell and B. C. Boehmke, "Variable Importance Plots — An Introduction to the vip Package," *ISSN*, vol. XX, no. 2006, pp. 1–24, 2019.
- [326] R. Bujak, E. Daghir-Wojtkowiak, R. Kaliszan, and M. J. Markuszewski, "PLS-based and regularization-based methods for the selection of relevant variables in non-targeted metabolomics data," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 3, no. JUL, pp. 1–10, 2016, doi: 10.3389/fmolb.2016.00035.
- [327] R. M. Pabari, B. Ryan, W. Ahmad, and Z. Ramtoola, "Physical and Structural Stability of the Monoclonal Antibody, Trastuzumab (Herceptin®), Intravenous Solutions," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 220–225, 2013, doi: 10.2174/138920113805219322.
- [328] D. M. Rogers, S. B. Jasim, N. T. Dyer, M. Re, and J. D. Hirst, "Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins," *Chem. Eng.*, vol. 5, pp. 2751–2774, 2019.
- [329] A. Janda and A. Casadevall, "Circular Dichroism Reveals Evidence of Coupling Between Immunoglobulin Constant and Variable Region Secondary Structure," *Mol. Immunol.*, vol. 47, pp. 1421–1425., 2010.

- [330] Y. Yan, T. Xing, S. Wang, T. J. Daly, and N. Li, "Coupling Mixed-Mode Size Exclusion Chromatography with Native Mass Spectrometry for Sensitive Detection and Quantitation of Homodimer Impurities in Bispecific IgG," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 17, pp. 11417–11424, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02793.
- [331] J. N. Dodds and E. S. Baker, "Ion Mobility Spectrometry: Fundamental Concepts, Instrumentation, Applications, and the Road Ahead," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 30, no. 11, pp. 2185–2195, 2019, doi: 10.1007/s13361-019-02288-2.
- [332] G. Van der Rest, H. Rezaei, and F. Halgand, "Monitoring Conformational Landscape of Ovine Prion Protein Monomer Using Ion Mobility Coupled to Mass Spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 28, no. 2, pp. 303–314, 2017, doi: 10.1007/s13361-016-1522-x.
- [333] V. Le-minh, F. Halgand, G. Van Der Rest, M. Taverna, and C. Smadja, "Conformation assessment of therapeutic monoclonal antibodies by SEC-MS: Unravelling analytical biases for application to quality control," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 185, pp. 1–8, 2020.
- [334] I. K. Ventouri *et al.*, "Probing Protein Denaturation during Size-Exclusion Chromatography Using Native Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 92, no. 6, pp. 4292–4300, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b04961.
- [335] L. A. Dailey, "Considerations for the Design of Antibody-based Therapeutics," *J. Pharm. Sci.*, vol. 109, no. 1, pp. 267–283, 2020, doi: 10.1016/j.xphs.2019.05.031.Considerations.
- [336] T. Jain *et al.*, "Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape," *PNAS*, vol. 114, no. 5, pp. 944–949, 2017, doi: 10.1073/pnas.1616408114.
- [337] L. A. Rabia, A. A. Desai, H. S. Jhajj, and P. M. Tessier, "Understanding and overcoming trade-offs between antibody affinity, specificity, stability and solubility," *Biochem. Eng. J.*, vol. 137, pp. 365–374, 2018.
- [338] H. Ma, C. Ó'Fágáin, and R. O'Kennedy, "Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement," *Biochimie*, vol. 177, pp. 213–225, 2020, doi: 10.1016/j.biochi.2020.08.019.
- [339] L. Heinrich, N. Tissot, D. Jean, and R. Cohen, "Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity," *J. Immunol. Methods*, vol. 352, no. 1–2, pp. 13–22, 2010, doi: 10.1016/j.jim.2009.10.002.
- [340] P. M. Neri, Dario; Montigiani, Silvia; Kirkham, "Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities," *Trends Biotechnol.*, vol. 14, no. 12, pp. 465–470, 1996.

- [341] E. Goldberg and L. Djavadi-ohaniance, "Methods for measurement of antibody / antigen affinity based on ELISA and RIA," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 5, pp. 278–281, 1993.
- [342] G. Zhuang, Y. Katakura, T. Omasa, M. Kishimoto, and K. I. Suga, "Measurement of association rate constant of antibody-antigen interaction in solution based on enzyme-linked immunosorbent assay," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 92, no. 4, pp. 330–336, 2001, doi: 10.1016/S1389-1723(01)80235-8.
- [343] and A. T. W. Margaret Lin, Denise Krawitz, Matthew D. Callahan, Galahad Deperalta, "Characterization of ELISA Antibody-Antigen Interaction using Footprinting-Mass Spectrometry and Negative Staining Transmission Electron Microscopy," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 29, no. 5, pp. 961–971, 2018.
- [344] A. Suleyman, "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA," *Peptides*, vol. 72, pp. 4–15, 2015.
- [345] M. Alhaji, M. Zubair, and A. Farhana, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. 2023.
- [346] M. E. Koivunen and R. L. Krogsrud, "Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories," *Labmedicine*, vol. 37, pp. 490–497, 2016, doi: 10.1309/MV9RM1FDLWAUWQ3F.
- [347] M. Malmqvist, "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 5, no. 2, pp. 282–286, 1993.
- [348] S. Hearty, R. O'Kennedy, and P. Leonard, "Measuring Antibody–Antigen Binding Kinetics Using Surface Plasmon Resonance," in *Antibody Engineering: Methods in Molecular Biology (Vol .907)*, 2012, pp. 411–442.
- [349] T. Rispens, H. Velthuis, P. Hemker, H. Speijer, W. Hermens, and L. Aarden, "Label-free assessment of high-affinity antibody–antigen binding constants. Comparison of bioassay, SPR, and PEIA-ellipsometry," *J. Immunol. Methods*, vol. 365, no. 1, pp. 50–57, 211AD.
- [350] O. Lisec and P. Hugo, "Frontal analysis method to determine competitive adsorption isotherms," *J. Chromatogr. A*, vol. 908, pp. 19–34, 2001.
- [351] H. Stutz, "Advances and applications of capillary electromigration methods in the analysis of therapeutic and diagnostic recombinant proteins – A Review," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 222, no. October 2022, p. 115089, 2023, doi: 10.1016/j.jpba.2022.115089.
- [352] V. I. Muronetz and T. Korpela, "Isolation of antigens and antibodies by affinity

- chromatography," *J. Chromatogr. B*, vol. 790, no. 1, pp. 53–66, 2003.
- [353] M. A. Nelson, A. Moser, and D. S. Hage, "Biointeraction analysis by high-performance affinity chromatography: Kinetic studies of immobilized antibodies," *J. Chromatogr. B*, vol. 878, no. 2, pp. 165–171, 2010.
- [354] D. J. Wang *et al.*, "Frontal Affinity Chromatography Coupled to Mass Spectrometry: An Effective Method for K_d Determination and Screening of α -Gal Derivatives Binding to Anti-Gal Antibodies (IgG)," *J. carbohydrates Chem.*, vol. 22, no. 6, pp. 347–376, 2003.
- [355] K. Kasai, "Frontal affinity chromatography: A champion method to study informational glycans," *Glycoforum*, vol. 23, 2020.
- [356] J. Øtergaard and N. H. H. Heegaard, "Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding," *Electrophoresis*, vol. 24, no. 17, pp. 2903–2913, 2003, doi: 10.1002/elps.200305526.
- [357] A. C. Moser, S. Trenhaile, and K. Frankenberg, "Studies of antibody-antigen interactions by capillary electrophoresis: A review," *Methods*, vol. 146, no. 2018, pp. 66–75, 2018, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.03.006.
- [358] C. Malburet, L. Leclercq, J. F. Cotte, J. Thiebaud, and H. Cottet, "Study of Interactions between Antigens and Polymeric Adjuvants in Vaccines by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis," *Biomacromolecules*, vol. 21, no. 8, pp. 3364–3373, 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00782.
- [359] M. Andr, "A comparative study of capillary electrophoresis and isothermal titration calorimetry for the determination of binding constant of human serum albumin to monoclonal antibody," *Electrophoresis*, vol. 36, pp. 1274–1281, 2015, doi: 10.1002/elps.201400513.
- [360] J. D. Beatty, B. G. Beatty, and W. G. Vlahos, "Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay," *J. Immunol. Methods*, vol. 100, pp. 173–179, 1987.
- [361] M. Y. Song *et al.*, "Characterization of a novel anti-human TNF- α murine monoclonal antibody with high binding affinity and neutralizing activity," *Exp. Mol. Med.*, vol. 40, no. 1, pp. 35–42, 2008, doi: 10.3858/emm.2008.40.1.35.
- [362] R. Melsheimer, A. Geldhof, I. Apaolaza, and T. Schaible, "Remicade® (Infliximab): 20 years of contributions to science and medicine," *Biol. Targets Ther.*, vol. 13, pp. 139–178, 2019, doi: 10.2147/BTT.S207246.
- [363] Ulrich Klotz, A. Teml, and M. Schwab, "Clinical Pharmacokinetics and Use of

- Infliximab," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 46, pp. 645–660, 2007.
- [364] Z. Kaymakcalan *et al.*, "Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor," *Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 2, pp. 308–316, 2009, doi: 10.1016/j.clim.2009.01.002.
- [365] Genya Gorshtein, "Antibody Affinity and Avidity – The Strength of a Single Interaction Versus a Multivalent Interaction," *rapid novor*, 2023. <https://www.rapidnovor.com/antibody-affinity-and-avidity-single-interaction-vs-multivalent-interaction/>.
- [366] B. Scallon, A. N. N. Cai, N. Solowski, A. M. Y. Rosenberg, X. Song, and D. Shealy, "Binding and Functional Comparisons of Two Types of Tumor Necrosis Factor Antagonists," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 301, no. 2, pp. 418–426, 2002.
- [367] E. Krayukhina, M. Noda, K. Ishii, T. Maruno, H. Wakabayashi, and M. Tada, "Analytical ultracentrifugation with fluorescence detection system reveals differences in complex formation between recombinant human TNF and different biological TNF antagonists in various environments," *MAbs*, vol. 9, no. 4, pp. 664–679, 2017, doi: 10.1080/19420862.2017.1297909.
- [368] B. N. Tran *et al.*, "Higher order structures of Adalimumab, Infliximab and their complexes with TNF α revealed by electron microscopy," *Protein Sci.*, vol. 26, no. 12, pp. 2392–2398, 2017, doi: 10.1002/pro.3306.
- [369] T. Bo and J. Pawliszyn, "Characterization of bovine serum albumin-tryptophan interaction by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 1105, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 25–32, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2005.08.092.
- [370] T. Bo and J. Pawliszyn, "Dynamic process of phospholipid-protein interaction studied by capillary isoelectric focusing with whole-column imaging detection," *Electrophoresis*, vol. 27, no. 4, pp. 852–858, 2006, doi: 10.1002/elps.200500670.
- [371] C. L. Anderson, Y. Wang, and R. R. Rustandi, "Applications of imaged capillary isoelectric focussing technique in development of biopharmaceutical glycoprotein-based products," *Electrophoresis*, vol. 33, no. 11, pp. 1538–1544, 2012, doi: 10.1002/elps.201100611.
- [372] G. Wu, C. Yu, W. Wang, and L. Wang, "Interlaboratory method validation of icIEF methodology fo[1] G. Wu, C. Yu, W. Wang, and L. Wang, 'Interlaboratory method validation of icIEF methodology for analysis of monoclonal antibodies,' *Electrophoresis*, vol. 39, no. 16, pp. 2091–2098, 2018, doi: 10.1002/elps.201800118.

- [373] A. Sreedhara *et al.*, "Effect of ambient light on IgG1 monoclonal antibodies during drug product processing and development," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 100, pp. 38–46, 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.12.003.
- [374] J. P. Mahieu, B. Sebile, C. Craescu, M. D. Rhoda, and Y. Beuzard, "Determination of the dissociation constant of oligomeric proteins by size-exclusion high-performance liquid chromatography: application to human haemoglobin," *J. Chromatogr. A*, vol. 327, pp. 313–325, 1985.
- [375] J. Bao *et al.*, "Kinetic size-exclusion chromatography with mass spectrometry detection: an approach for solution-based label-free kinetic analysis of protein-small molecule interactions," *Anal. Chem.*, vol. 86, pp. 10016–10020, 2014, doi: 10.1039/c4an02232g.
- [376] L. C. Santora, Z. Kaymakcalan, P. Sakorafas, I. S. Krull, and K. Grant, "Characterization of Noncovalent Complexes of Recombinant Human Monoclonal Antibody and Antigen Using Cation Exchange , Size Exclusion Chromatography , and BIAcore," *Anal. Biochem.*, vol. 299, pp. 119–129, 2001, doi: 10.1006/abio.2001.5380.