



**HAL**  
open science

**Approches analytiques pour l'analyse et la  
caractérisation d'anticorps thérapeutiques dégradés :  
intérêt de la spectrométrie de masse en mode  
non-dénaturant**

Minh Thang Le

► **To cite this version:**

Minh Thang Le. Approches analytiques pour l'analyse et la caractérisation d'anticorps thérapeutiques dégradés : intérêt de la spectrométrie de masse en mode non-dénaturant. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS567 . tel-03362691

**HAL Id: tel-03362691**

**<https://theses.hal.science/tel-03362691>**

Submitted on 2 Oct 2021

**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.

# Approches analytiques pour l'analyse et la caractérisation d'anticorps thérapeutiques dégradés : intérêt de la spectrométrie de masse en mode non-dénaturant

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°571 Sciences Chimiques :  
Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 18 décembre 2019, par

**Minh Thang Le**

Composition du Jury :

Patrice PROGNON Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay	Président
Davy GUILLARME Associate Professor, Université de Genève	Rapporteur
Yannis-Nicolas FRANCOIS Maître de conférences, Université de Strasbourg	Rapporteur
François BECHER Ingénieur-Chercheur, CEA Saclay, Université Paris-Saclay	Examineur
Joëlle VINH Directrice de Recherche, ESPCI Paris	Examinatrice
Claire SMADJA Professeur des Universités, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay	Directrice de thèse

# Approches analytiques pour l'analyse et la caractérisation d'anticorps thérapeutiques dégradés : intérêt de la spectrométrie de masse en mode non-dénaturant

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°571 Sciences Chimiques :  
Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 18 décembre 2019, par

**Minh Thang Le**

Composition du Jury :

Patrice PROGNON Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris Sud, Université Paris Saclay	Président
Davy GUILLARME Associate Professor, Université de Genève	Rapporteur
Yannis-Nicolas FRANCOIS Maître de conférences, Université de Strasbourg	Rapporteur
François BECHER Ingénieur-Chercheur, CEA Saclay, Université Paris Saclay	Examineur
Joëlle VINH Directrice de Recherches, ESPCI de Paris	Examinatrice
Claire SMADJA Professeur des Universités, Université Paris Sud, Université Paris Saclay	Directrice de thèse

## REMERCIEMENTS

Cette thèse s'est réalisée au sein de l'UMR CNRS 8612, Institut Galien Paris Sud à la Faculté de Pharmacie Paris Sud, Châtenay-Malabry. Je remercie le Professeur Elias FATTAL, directeur de l'UMR, de m'avoir accueilli dans son Institut. Je remercie également Mme le Professeur Myriam TAVERNA de m'avoir accueilli dans son équipe de Protéines et Nanotechnologies en Science Analytique et de m'avoir donné des conseils précieux lors de mes présentations aux réunions de laboratoire.

Je souhaite particulièrement exprimer mes remerciements et témoigner toute ma reconnaissance à Mme le Professeur Claire SMADJA, ma directrice de thèse, pour sa confiance, son encadrement, son accompagnement et sa disponibilité dans le suivi de mes travaux. J'ai beaucoup apprécié travailler sous sa direction pendant 3 ans d'enrichissement professionnel et personnel.

Je tiens à remercier les membres de jury ; le Docteur Yannis-Nicolas FRANCOIS et le Docteur Davy GUILLARME d'avoir accepté d'être rapporteurs ; le Professeur Patrice PROGNON, le Docteur François BECHER et le Docteur Joëlle VINH d'avoir accepté d'examiner cette thèse. Je remercie le Professeur Angelo PACI d'avoir accepté d'être membre du comité de suivi de ma thèse.

Je voudrais adresser toute ma respectueuse gratitude à le Professeur Jean-Claude TABET pour ses conseils au tout début de la thèse. Grâce à vous, je me suis intéressée à l'approche « native-MS » et j'ai pu développer de « belles » méthodes avec cette approche pour l'analyse d'anticorps.

Mes reconnaissances vont aussi à Docteur Emmanuel JACCOULET pour m'avoir inspiré par sa passion pour la recherche et d'avoir participé à une grande partie de mon projet doctoral. Les discussions avec toi était toujours intéressantes et inspirantes.

Je remercie sincèrement le Docteur Thuy TRAN-MAIGNAN et Docteur Thanh Duc MAI pour vos gentillesse et vos supports scientifiques sur la spectrométrie de masse (Thuy !) et l'électrophorèse

capillaire (Duc !) ; le Docteur Ali Maki pour m'avoir aidé dans les expériences AFM ; le Docteur Frédéric HALGAND et le Professeur Guillaume VAN DER REST pour votre aide et votre accueil lorsque je suis venu au LCP faire mes expériences en IMS-MS ; et le Docteur François Xavier LEGRAND pour les instructions sur la DLS.

J'ai eu l'opportunité d'encadrer les stagiaires Aurélie Champouillon, Amandine Gendron et Baptiste Manzotti. C'était un plaisir de travailler avec vous. Je vous remercie.

Merci infiniment à mes supers cool collègues de l'équipe PNAS, Emilie Rossie, Marco Morani, Théo Lienard-Mayor, Sylvie Liu, Etienne Laborie, Grégory Rouby, Seray Ural, Cédric Crosnier de Lassischère, Coralie Ruel, Corentin Beradet, Bin Yang. Merci Marie Claude Amella pour tes délicieux gâteaux !

Je remercie ma famille et mes amis pour votre soutiens sans faille qui m'a permis de mener à bien ce projet doctoral.

## TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABREVIATION</b> .....	<b>vii</b>
<b>PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>PARTIE II : RAPPEL BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>5</b>
<b>II.1 Anticorps monoclonaux thérapeutiques</b> .....	<b>5</b>
II.1.1. Introduction générale.....	5
II.1.2. Développement et production .....	8
II.1.2.1. Développement et évolution des Acms thérapeutiques .....	8
II.1.2.2. Anticorps chimériques, humanisés et humains.....	10
II.1.2.3. Production des Acms thérapeutiques.....	12
<b>II.2. Anticorps monoclonaux thérapeutiques dans le contexte hospitalier</b> .....	<b>16</b>
II.2.1. Préparation et contrôle des Acms en milieu hospitalier .....	16
II.2.2. Stabilité des anticorps monoclonaux et les facteurs d'influence.....	17
II.2.2.1. Dégradation chimique.....	17
II.2.2.2. Dégradation physique .....	20
<b>II.2.3. Immunogénicité.</b> .....	<b>23</b>
II.2.3.1. Anti-drug antibodies .....	23
II.2.3.2. Facteurs influençant l'immunogénicité .....	25
II.2.3.3. L'immunogénicité des agrégats de protéines thérapeutiques et mécanismes de production des ADA .....	26
<b>II.3. Caractérisation des agrégats et des Acms dénaturés</b> .....	<b>29</b>
II.3.1. Détection et caractérisation de particules subvisibles et visibles .....	31
II.3.2. Méthodes séparatives pour la détection et la caractérisation d'agrégats solubles.....	33
II.3.3. Spectrométrie de masse en mode natif .....	36
<b>II.4. Electrophorèse capillaire</b> .....	<b>39</b>
II.4.1. Electrophorèse capillaire de zone pour l'analyse de protéines.....	39
II.4.2. Phénomène d'adsorption .....	41
II.4.3. Les différents types de revêtements utilisés pour prévenir l'adsorption des protéines en EC .....	44
II.4.3.1. Le revêtement dynamique .....	44
II.4.3.2. Les revêtements statiques .....	44

<b>II.5.</b>	<b>Chromatographie d'exclusion stérique.....</b>	<b>49</b>
II.5.1.	Chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse de Acms.....	49
II.5.1.1.	Importance de la composition de la phase mobile.....	51
II.5.1.2.	Phases stationnaires .....	54
II.5.1.3.	Détection.....	57
II.5.2.	Couplage SEC-MS et SEC-IMS-MS .....	59
	<b>Références de la partie bibliographique .....</b>	<b>63</b>
<b>PARTIE III:</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>75</b>
<b>III.1</b>	<b>Intérêt de la CZE-native MS pour l'analyse et la caractérisation d'Acms thérapeutiques .....</b>	<b>75</b>
	<b>Article 1: Capillary zone electrophoresis-native mass spectrometry for the quality control of therapeutic intact mAbs .....</b>	<b>78</b>
	Abstract: .....	78
III.1.1.	Introduction .....	80
III.1.2.	Materials and methods.....	83
III.1.2.1.	Materials .....	83
III.1.2.2.	Apparatus.....	83
III.1.2.2.1.	CZE-MS.....	83
III.1.2.2.2.	AFM.....	84
III.1.2.3.	Methods .....	84
III.1.2.3.1.	Preparation of native and stressed Infliximab.....	84
III.1.2.3.2.	Capillary coating procedure.....	84
III.1.2.3.3.	CZE-MS .....	85
III.1.2.3.4.	AFM measurements .....	85
III.1.3.	Results and discussion.....	87
III.1.3.1.	Method development .....	87
III.1.3.2.	Stressed infliximab analysis .....	92
III.1.3.3.	AFM experiments .....	96
III.1.4.	Conclusion.....	99
III.1.5.	Supporting information .....	101
	References of Article 1 .....	105
	<b>Conclusion du chapitre III.1 .....</b>	<b>109</b>

<b>III.2.</b>	<b>Revêtements statiques pour l'analyse d'Acms thérapeutiques par CZE-native MS....</b>	<b>110</b>
	<b>Article 2: Covalent-coating capillaries enabling to the analysis of therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis coupled to non-denaturing mass spectrometry</b>	<b>112</b>
	Abstract	112
III.2.1.	Introduction	114
III.2.2.	Materials and methods	118
III.2.2.1.	Chemicals	118
III.2.2.2.	Monoclonal antibodies	118
III.2.2.3.	Instrumentations	119
III.2.2.3.1.	CE – UV instrumentation	119
III.2.2.3.2.	CE-MS instrument	119
III.2.2.4.	Coating preparation	120
III.2.2.5.	mAb preparation	120
III.2.2.6.	EOF measurement	121
III.2.2.7.	Optimization of BGE conditions	122
III.2.2.8.	Multivariate analysis	122
III.2.3.	Results and discussion	123
III.2.3.1.	Coated capillaries: EOF measurements	123
III.2.3.2.	Optimization of the CE conditions	124
III.2.3.2.1.	Preliminary study	124
III.2.3.2.2.	Optimization by a Design of Experiments	126
III.2.3.3.	Capillaries stability	127
III.2.3.4.	Application to the analysis of different mAbs	128
III.2.3.5.	Antibody analysis by CE-MS	130
III.2.4.	Conclusion	132
III.2.5.	Supporting Information	134
	References of Article 2	137
	<b>Conclusion du chapitre III.2</b>	<b>140</b>
<b>III.3.</b>	<b>Analyse et caractérisation d'Acms thérapeutiques ; couplage simultané de la SEC à une double détection par fluorescence et spectrométrie de masse.</b>	<b>141</b>
	<b>Article 3: Conformation assessment of therapeutic monoclonal antibodies by SEC-MS: unravelling analytical bias for quality control application</b>	<b>142</b>
	Abstract:	142



III.3.1.	Introduction .....	144
III.3.2.	Experimental section .....	147
III.3.2.1.	Chemicals, Reagents, and Samples. ....	147
III.3.2.2.	Sample preparation. ....	147
III.3.2.3.	TNF $\alpha$ -mAb incubation .....	147
III.3.2.4.	Fluorescence spectroscopy .....	148
III.3.2.5.	SEC-FLD/MS .....	148
III.3.2.6.	SEC-IMS/MS.....	148
III.3.3.	Results and discussion.....	150
III.3.3.1.	Optimization of mobile phase buffer for nondenaturing SEC-FLD/MS .....	150
III.3.3.1.1.	Influence of mobile phase buffer electrolytes.....	150
III.3.3.1.2.	Influence of organic solvents on FLD and MS signal .....	153
III.3.3.1.3.	Influence of mobile phase ionic strength, pH and temperature .....	155
III.3.3.2.	Optimization of MS parameters .....	156
III.3.3.3.	Interaction TNF $\alpha$ and INF .....	157
III.3.3.4.	Analysis of Trastuzumab stressed samples .....	160
III.3.4.	Conclusion.....	164
	References of Article 3.....	166
	<b>Conclusion du chapitre III.3 .....</b>	<b>168</b>
<b>III.3.5.</b>	<b>Influence of light to degradation and aggregation to multi therapeutic monoclonal antibodies .....</b>	<b>169</b>
<b>PARTIE IV :</b>	<b>CONCLUSION et PERSPECTIVES.....</b>	<b>176</b>

## ABREVIATION

Acms	Anticorps monoclonaux
ACN	Acétonitrile / Acetonitrile
ADA	Antidrug Antibody
ADC	Antibody Drug Conjugates
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps / Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AF4	Fractionnement par couplage Flux-Force à Flux asymétrique / Asymmetric Flow Field Flow Fractionation
AFM	Microscopie à Force Atomique / Atomic force microscopy
AUC	Ultracentrifugation Analytique / Analytical Ultracentrifugation
BABs	Binding Antibodies
BEH	Ethylene Bridged Hybrid
BGE	Background Electrolyte
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Cytotoxicité Dépendante du Complément / Complement-Dependent Cytotoxicity
CDR	Complementarity Determining Regions
CE	Capillary Electrophoresis
CH	Domaine Constant de chaîne lourde / Constant region of Heavy chain
CL	Domaine Constant de chaîne légère / Constant region of Light chain
CSD	Distribution de Charge / Charge State Distribution
CPA	Antigen Presenting Cell
CZE	Electrophorèse Capillaire de Zone / Capillary Zone Electrophoresis
DLS	Diffusion dynamique de lumière / Dynamic Light Scattering
DMA	N,N-Dimethylacrylamide
EC	Electrophorèse Capillaire
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicine Agency
ESI-QTOF	Ionisation Electrospray-Quadripôle-Temps de vol / Electrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight
FDA	Food and Drug Administration
FLD	Fluorescence Detector

GMA	Glycidyl Methacrylate
HAMA	Human Anti-Mouse Antibody
HAT	Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine / Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine
HC	Chaîne lourde / Heavy Chain
HEPT	Hauteur Equivalente en Plateau Théorique
HGPRT	Hypoxanthine Guanosine Phosphoribosyl Transférase / Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase
HMWS	High Molecular Weight Species
ICH	Conférence Internationale sur l'Harmonisation / International Conference on Harmonization
IL	Interleukin
IMS	Spectrométrie de Mobilité Ionique / Ion Mobility Spectrometry
IPA	Isopropanol
IS	Force ionique / Ionic Strength
LC	Chaîne légère /Light Chain
LMWS	Low Molecular Weight Species
mAbs	Monoclonal antibodies
MALS	Multi Angle Light Scattering
MAPS	Methacryloyl-oxy-propyl]trimethoxy-silane
MeOH	Méthanol / Methanol
MS	Spectrométrie de Masse / Mass Spectrometry
MZ-B cell	Zone Marginal de la rate (MZ-B Cell)
Nabs	Neutralizing Antibodies
NTA	Analyse du suivi individuel de particules / Nanoparticle Tracking Analysis
PAA	Polyacrylamide
PAGE	Électrophorèse sur gel en présence de dodécylsulfate de sodium / Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PB-DS-PB	Polybrene-Dextran Sulfate-Polybrene
PD-1	Programmed cell Death protein-1
PDL-1	Programmed Death Ligand-1
PEI	Polyethyleneimine
Phr. Eur.	Pharmacopée européenne / European Pharmacopoeia
PVA	Poly (vinyl alcohol)

RANK	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B
SDS	Dodécylsulfate de sodium / Sodium Dodecyl Sulfate
SEC	Chromatographie d'Exclusion Stérique / Size Exclusion Chromatography
SMIL	Successive Multiple Ionic-polymer Layer
TCR	Récepteur des Cellules T
Td	Voie dépendant des Lymphocytes T
TFA	Acide trifluoroacétique / Trifluoroacetic acid
Th2	Lymphocytes T helper de type 2
Ti	Voie indépendante des Lymphocytes T
TLR	Les récepteurs de type TollV
TNF	Tumor Necrosis Factor
USP	United States Pharmacopeia
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire / Vascular Endothelial Growth Factor
VL	Domaine variable de chaîne légère / Variable region of Light chain

## **PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE**

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques (Acms) sont en plein essor. De nombreux Acms sont des « blockbuster » ces dernières années. A l'heure actuelle, plus de 80 ont été approuvés par la FDA ou l'EMA et une centaine de molécules sont en dernière phase d'essais cliniques. Ces Acms ont un haut potentiel thérapeutique. Ils présentent également l'avantage d'une grande spécificité pour leurs cibles thérapeutiques. Cependant, ils sont susceptibles de provoquer des réactions immunogènes importantes du fait de leur dénaturation ou leur agrégation lors des différentes étapes de production et de formulation avant administration aux patients. En effet, lors du stockage et de la reconstitution, de nombreuses études ont démontré que les protéines dépliées et les agrégats, quelle que soit leur taille, pouvaient provoquer une réponse immunitaire. Cette immunogénicité des Acms est un risque majeur qui peut menacer la sécurité des patients lors du traitement clinique.

C'est pourquoi, il est primordial de contrôler la présence des Acms dénaturés et / ou des agrégats dans les poches d'anticorps reconstitués. La dénaturation pouvant conduire à la formation d'agrégats présentant un risque immunogène avec une diminution de l'efficacité thérapeutique peut être considéré comme un « attribut qualité » jugé critique (CQA) qui doit être contrôlé lors de la production et le stockage d'Acm thérapeutique. La caractérisation de ces agrégats reste un défi majeur en chimie analytique. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au développement de méthode séparatives couplées à la spectrométrie de masse pour l'analyse des Acms. En effet, la spectrométrie de masse en mode native est une méthode performante réalisée en conditions « presque » physiologiques. Elle permet la conservation des structures quaternaires et tertiaires des protéines ainsi que des interactions non-covalentes conduisant à la formation des petits agrégats (dimères, trimères). Cependant, cette méthode est encore peu exploitée pour les Acms en raison de la complexité inhérente à leur taille et leur hétérogénéité.

La première partie de ce manuscrit constitue la partie bibliographique.

1. La première partie bibliographique porte sur la présentation des anticorps thérapeutiques, leur évolution et développement. Les méthodes de production industrielle d'Acms sont également présentées.

2. Le deuxième chapitre bibliographique porte sur la préparation d'Acms dans le contexte hospitalier, les dégradations (chimique et physique) et les facteurs d'influence sur la stabilité d'anticorps. L'immunogénicité des anticorps thérapeutiques liée à la production des « anti-drug antibodies » contre l'anticorps et l'agrégat est discutée dans ce chapitre.

3. Le troisième chapitre s'intéresse aux méthodes analytiques pour la caractérisation des agrégats et des anticorps dénaturés. La nécessité d'employer plusieurs méthodes orthogonales pour pouvoir détecter tous les types d'agrégats d'anticorps sera abordée. Les avantages de la spectrométrie de masse en mode non-dénaturant concernant la détection et la caractérisation de molécules dénaturées seront également présentés.

4. Dans les deux derniers chapitres, nous nous sommes focalisés sur deux méthodes séparatives compatibles avec la MS, l'électrophorèse capillaire (EC) et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC). L'intérêt de ces deux méthodes pour l'analyse des protéines thérapeutiques sera présenté. Les difficultés et les avantages de chaque technique seront également discutés.

La seconde partie de ce manuscrit est composé de trois chapitres expérimentaux.

Dans la partie expérimentale de cette thèse, nous avons dans un premier temps développée une méthode de CZE couplée à un spectromètre composé d'une source ESI relié à un analyseur quadripolaires à temps de vol (ESI-QTOF) utilisant une interface avec un liquide d'appoint (« sheath liquid »). Les deux défis majeurs de cette méthode pour l'analyse des Acms sont ; (i) la faible sensibilité et (ii) l'adsorption de la protéine sur la surface du capillaire de silice. Nous avons ainsi développé et optimisé une méthode permettant ; (i) l'analyse d'un Acm thérapeutique l'Infliximab,

(ii) la mise en évidence de modifications conformationnelles. Pour cela, un capillaire avec un revêtement composé de multicouches de polymères ioniques (SMIL - successive multiple ionic-polymer layer) a été employé pour éviter l'adsorption de la protéine sur la surface. Cette méthode a été appliquée à l'analyse de deux échantillons d'inflximab intact et soumis à un stress. Pour la première fois, plusieurs conformations d'anticorps, natifs, dénaturés ou dimères, présents dans l'échantillon « stressé », ont été détectées en une seule analyse par CZE-MS. Les résultats obtenus ont été confirmés par microscopie à force atomique (AFM). L'échantillon stressé analysé après digestion par l'IdeS suggère que la formation de dimères provient de l'interaction des fragments Fab-Fab dénaturés. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Chromatography A* en 2019.

Ces résultats ont montré le potentiel de la méthode CZE-native MS pour l'analyse et la caractérisation des Acms thérapeutiques. Néanmoins, l'utilisation de la triple couche de polymères n'a pas totalement prévenu l'adsorption de la protéine à la surface du capillaire. C'est pourquoi dans la deuxième partie de ce doctorat, je me suis intéressé aux revêtements polymériques de surface pour l'électrophorèse capillaire. Six revêtements covalents, dont 2 capillaires commerciaux neutres (PAA et PVA), 1 revêtement positif (PEI), et 3 revêtements à base de DMA-GMA-MAPS (positif, neutre, ou zwitterionique), ont été étudiés. Les résultats obtenus ont montré que le revêtement DMA-GMA-MAPS neutre présente la meilleure performance en termes de stabilité pour l'analyse d'Acm par CZE. Nous avons ensuite démontré que le couplage d'un capillaire utilisant un revêtement à base de DMA-GMA-MAPS neutre avec la MS en conditions non dénaturantes était possible et robuste pour l'analyse d'Acm thérapeutique.

Une deuxième approche reposant sur la SEC-MS en conditions « non-dénaturantes » a été évaluée. La SEC étant considérée comme une méthode de référence pour la caractérisation des agrégats en phase précoce (dimère, trimère, oligomère soluble, etc.), elle est largement employée pour la séparation, la purification et le contrôle de qualité en routine des protéines et des Acms. Le

couplage de SEC à la MS est de plus en plus utilisé afin d'obtenir des informations structurales sur les agrégats. Cependant, la SEC-native MS est encore peu appliquée pour caractériser des Acms en raison de l'adsorption des agrégats sur la phase stationnaire et l'éventuel dégradation artificielle des Acms (oligomérisation ou dénaturation) pouvant se produire pendant la phase d'ionisation. L'influence de chaque paramètre (pH, tampon, température d'ionisation, etc.) sur les comportements des Acms pendant l'ionisation a ainsi été étudiée. Ainsi, nous avons développé une méthode de SEC couplée à une double détection, par MS et par fluorescence, permettant ; (i) de limiter le plus possible l'interaction des Acms avec la phase stationnaire, (ii) d'obtenir la plus grande sensibilité possible en spectrométrie de masse. Cette méthode nous a permis de distinguer les dimères artificiels formées au cours de l'analyse MS des espèces présentes à l'origine dans un échantillon de trastuzumab soumis à un stress. Ces résultats ont été confirmés par une étude complémentaire de la SEC couplée à la mobilité ionique-native MS. Cette méthode SEC-FLD/MS a été employée pour étudier l'interaction non covalente entre l'Infliximab et sa cible biologique le TNF $\alpha$ . Une étude de la stabilité de cinq Acms thérapeutiques, soumis au stress (UV 365nm) a également été menée en utilisant la méthode SEC-FLD/MS ainsi développée.



## **PARTIE II : RAPPEL BIBLIOGRAPHIE**

### **II.1 Anticorps monoclonaux thérapeutiques**

#### **II.1.1. Introduction générale**

Les anticorps monoclonaux constituent actuellement une classe thérapeutique importante pour le traitement de différentes pathologies telles que le cancer, les maladies infectieuses, les maladies inflammatoires, les maladies auto-immunes ainsi que pour la réduction du rejet de greffe. A ce jour, 84 anticorps monoclonaux thérapeutiques (Acms) ont été approuvés par la FDA et/ou l'EMA (sans compter les biosimilaires) et plusieurs Acms sont en cours d'essais ("Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US," 2019). 590 Acms seront bientôt accessibles sur le marché (Kaplon and Reichert, 2018) et 62 Acms sont en dernière phase d'études cliniques (Kaplon and Reichert, 2019). Sur le marché, en 2018, 8 des 15 médicaments du top blockbuster sont des Acms thérapeutiques ("Top 15 Best-Selling Drugs of 2018," 2019). Les Acms thérapeutiques proposés actuellement dans le marché sont dirigés contre des cibles biologiques telles que : la molécule pro-inflammatoire Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (e.g. infliximab, adalimumab) ; le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (e.g. bevacizumab) ; le facteur de croissance (EGF-R) (e.g. cétuximab, panitumumab), ou l'interleukine-2 (IL-2) (e.g. daclizumab, basiliximab). Certains Acms sont susceptible de déclencher le programme de mort cellulaire après fixation sur le récepteur CD20 présent à la surface de la plupart des cellules B (e.g. rituximab) ; d'autres vont activer les mécanismes effecteurs conduisant à la lyse des cellules cibles dont la surface présente des récepteurs CD33 (Teillaud, 2009).

L'anticorps est une glycoprotéine ou une immunoglobuline d'environ 150 kDa qui est répartie en plusieurs classes avec des activités biologiques spécialisées. Ce sont hétérodimères qui sont constitués de deux chaînes lourdes (heavy chain, HV) à 50 kDa et de deux chaînes légères d'environ (light chain, LC) 25 kDa, qui sont liées par les ponts disulfures S-S. Les chaînes légères sont



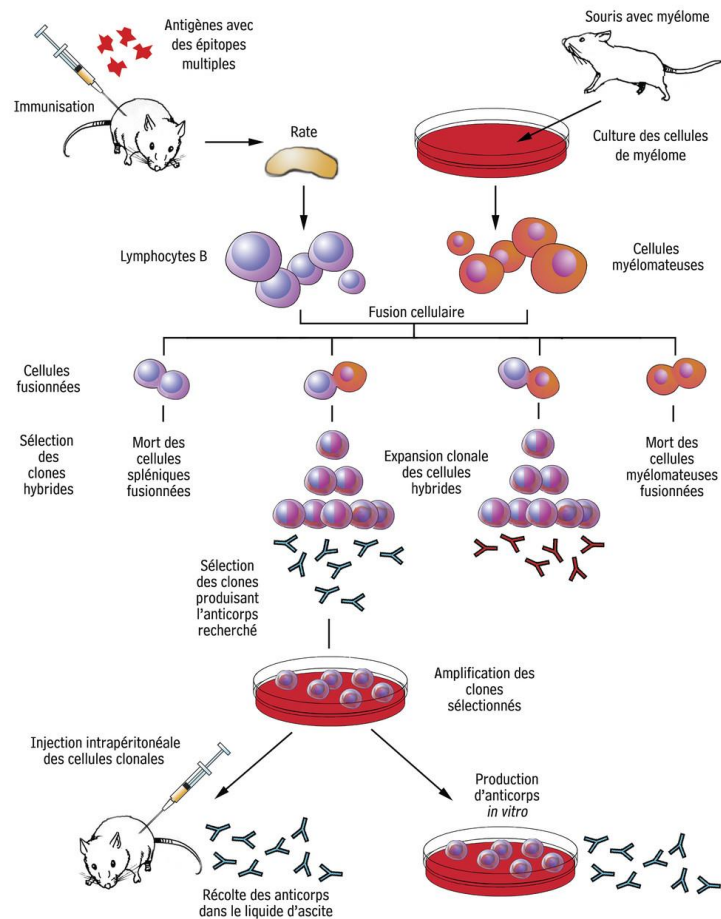
proposée conduisant les Acn et leurs dérivés à devenir une catégorie de produits majeure sur le marché des biopharmaceutiques.

Les anticorps bispécifiques sont capables de lier et neutraliser simultanément deux épitopes différents sur le même antigène (e.g. blinatumomab). Ils peuvent servir de médiateurs pour rediriger les effecteurs immunitaires et les agents cytotoxiques tels que les lymphocytes T vers des tumeurs. La protéine de fusion Fc est créée en joignant la séquence codante de la région Fc d'un Acn à la séquence codante d'une autre protéine (e.g. Etanercept). Actuellement, dix protéines de fusion Fc sont approuvées et commercialisées, et d'autres sont en cours de développement (Sifniotis et al., 2019). En ce qui concerne l'ADC, un agent cytotoxique est lié de manière covalente à un Acn pour fournir une charge hautement ciblée (e.g. Trastuzumab-emtansine). C'est un grand avantage pour les traitements oncologiques dans lesquels l'Acn se lie sélectivement à un antigène associé aux cellules cancéreuses pour administrer l'agent cytotoxique aux cellules cibles. En d'autres termes, les charges anticancérigènes hautement toxiques sont acheminées vers les cellules cancéreuses tout en réduisant considérablement les effets négatifs sur les cellules saines et donc les effets secondaires (Birrner et al., 2019).

## II.1.2. Développement et production

### II.1.2.1. Développement et évolution des Acms thérapeutiques

Les Acms, d'origine murine, ont été produits pour la première fois par Köhler et Milstein en 1975 en utilisant la technologie des hybridomes (Köhler and Milstein, 1975). Les lymphocytes B de souris immunisées par un antigène d'intérêt, sont ensuite fusionnés avec des cellules de myélome lymphoïdes qui ont préalablement subi une double mutation conduisant à une perte de leur capacité à produire des IgG et l'enzyme hypoxanthine guanosine phosphoribosyl transférase (HGPRT) (Figure 2.1.2). La culture *in vitro* de ce mélange cellulaire est ensuite réalisée dans un milieu de culture sélectif de l'hypoxanthine, l'aminoptérine et thymidine (HAT). Celui-ci va permettre de sélectionner des cellules fusionnées (hybridomes) d'intérêt et d'éliminer les cellules de myélomes qui sont déficitaires en HGPRT. En effet, en présence d'aminoptérine la synthèse endogène des bases puriques et pyrimidiques est bloquée, et en l'absence de HGPRT les cellules de myélomes sont dans l'incapacité d'utiliser l'hypoxanthine exogène pour synthétiser les purines ce qui conduit à leur mort. En revanche, les cellules fusionnées (hybridomes), qui expriment l'enzyme HGPRT peuvent utiliser l'hypoxanthine et la thymidine ajoutées dans le milieu de culture ce qui permet aux hybridomes de synthétiser l'ADN et l'ARN et donc de se multiplier. Les clones hybrides ainsi isolés produiront ainsi un seul type d'anticorps et pourront être utilisés pour la production d'anticorps à grande échelle *in vitro* ou *in vivo* (par injection à la souris) (Cochet and Chartrain, 2009). Lorsqu'un hybridome est cultivé *in vitro*, l'anticorps est sécrété à de très faibles concentrations, e.g. 1-20 µg/mL. La production de Acms *in vivo*, est réalisée à l'aide d'une injection de l'hybridome à la souris par voie intrapéritonéale. Ceci va provoquer un développement de la tumeur au niveau péritonéal avec un processus de multiplication qui va conduire à une production importante d'anticorps monoclonaux par ces cellules. Ceci va permettre de cultiver et de sécréter les Acms dans le liquide d'ascite à des concentrations beaucoup plus élevées, e.g. 1-10 mg/mL.

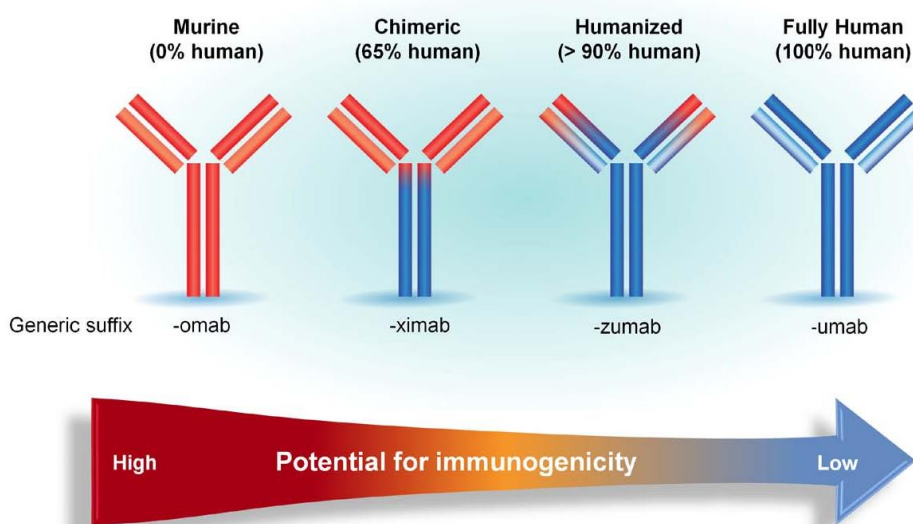


**Figure 2.1.2 :** Représentation schématique de la production des Acms murins selon la technique des hybridomes de G. Kohler et C. Milstein (Roselyne L’Italien et Benoit Leblanc, 2008)

Cependant, la grande majorité des essais cliniques concernant ces premiers anticorps monoclonaux se sont révélés décevants. Le premier Acm murin commercial, suffixe « -omab », approuvé par la FDA et l’EMA en 1986 était le Muromonab-CD3 (Orthoclone Okt3) indiqué dans la prévention du rejet de greffe de rein. Par la suite, 5 autres « omab » ont fait l’objet d’une autorisation de mise sur le marché. Cependant, ces Acms murins présentaient des effets secondaires importants lors du traitement tels que ; (i) une immunogénicité fréquente, liée à la production importante d’anticorps humains dirigés contre les anticorps murins (HAMA, human anti-mouse antibody) chez les patients (Yamashita et al., 2007), (ii) un manque de spécificité vis à vis de l’antigène, (iii), une demi-vie courte liée à une élimination rapide au niveau hépatique et rénal, (iv) l’impossibilité d’avoir une fonction effectrice due à l’absence de reconnaissance du fragment Fc par les cellules effectrices

### II.1.2.2. Anticorps chimériques, humanisés et humains

Afin de s'affranchir des effets délétères des Acms murins, les Acms chimériques, désignés par le suffixe « -ximab », dérivés de Acms murins ont été développés. Dans ces Acms, les régions constantes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines murines sont remplacées par des régions constantes humaines, en utilisant la technique d'ADN recombinant (Boulianne et al., 1984; Morrison et al., 1984). Le premier Acm chimérique commercial, le Rituximab (Rituxan®) a été approuvé en 1997 par la FDA pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et la polyarthrite rhumatoïde. D'autres Acms ont ensuite été mis sur le marché, comme l'Infliximab (Remicade®) qui fait partie des top-blockbusters de ces dernières années utilisé dans le traitement de la maladie de Crohn, du psoriasis, de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes. Par comparaison avec les anticorps murins, il a été observé que le caractère immunogène des ximabs a diminué. Cependant, des HAMA dirigés contre les Acms chimériques ont encore été détectés chez 40 % des patients (Hwang and Foote, 2005).



**Figure 2.1.3 :** Les différentes classes d'anticorps monoclonaux thérapeutiques (Foltz et al., 2013)

L'étape suivante a consisté au développement d'anticorps humanisés. Cette troisième génération de Acms est constituée d'IgG humaine dont seules les parties hypervariables (CDR) sont d'origine murine (Jones et al., 1986). Ainsi, pour ces Acms humanisés, désignés par le suffixe

« -zumab », 5 à 10% de leur séquences primaires sont d'origine murine contre 30% pour les Acms chimériques (Gonzales et al., 2005). Finalement, la production d'Acms 100% humains, désignés par le suffixe « -mumab » a été rendu possible avec l'utilisation de souris transgéniques ou en utilisant la technique de phage display (Figure 2.1.3). Avec l'approche des souris transgéniques, les gènes d'anticorps humains ont été introduits à la place du matériel génétique immunitaire de la souris, ce qui, par conséquent, a permis de générer des anticorps humaines de très haute affinité (Ruuls et al., 2008).

Dans la technique du phage display, sont intégrés dans le génome des phages, des séquences issues de banques d'ADNc combinatoires codants pour des fragments variable d'anticorps e.g. scFv (single chain Fragment variable) (Hoogenboom, 2005). Des bactéries (e.g. E. Coli) seront infectées par ces phages, celles-ci vont produire des phages en plusieurs millions d'exemplaires qui exprimeront à leur surface les fragments d'anticorps. A partir de la banque de phase produite, les phages d'intérêt seront sélectionnés à l'aide de plusieurs étapes de sélections (capture par liaison à l'antigène cible), élimination par lavage des phages non retenus et élution des phages retenus. Ceux-ci seront ensuite amplifiés par infection des bactéries. Les séquences désirées seront fusionnées avec celles de Fc humain afin d'obtenir une séquence d'anticorps 100% humain.

### II.1.2.3. Production des Acms thérapeutiques

La fabrication des Acms peut être divisé en deux process : « upstream » et « downstream » ; qui correspondent à la production et la purification des anticorps, respectivement.

#### *Processus « upstream »*

Le processus « upstream » comprend toutes les étapes de la mise en culture du clone producteur des Acm jusqu'à sa production en bioréacteur. Les critères les plus important sont : (1) des lignées cellulaires capables de synthétiser les Acm à des productivités élevées et à faible coût d'exploitation ; (2) un milieu de culture et des conditions de culture en bioréacteur qui permettent d'atteindre une productivité satisfaisante correspondant aux critères de qualités requis ; (3) le contrôle du processus de développement ; (4) une bonne compréhension de la performance de la culture aux différentes échelles de production. Les anticorps sont secrétés par les cellules productrices dans le milieu de culture. Une fois la production terminée, les cellules sont éliminées par centrifugation et le surnageant de culture est traité pour la purification de l'anticorps.

- **Systèmes cellulaires (1) :** L'une des étapes les plus critiques dans la production d'Acm consiste à choisir la lignée cellulaire. Les cellules doivent être stables et sécréter la protéine souhaitée sans altération conformationnelle à un niveau élevé (Carvalho et al., 2017). De nombreuses lignées cellulaires immortalisées pourraient potentiellement être utilisées dans la production des Acms. Actuellement, les lignées de hamster chinois (lignée CHO issue d'ovaire) et de souris (NS0 et SP2/0, deux lignées de myélome murin) sont les plus utilisées pour produire les Acms commerciaux et des Acms en cours d'essais cliniques (Dhara et al., 2018; Dumont et al., 2016). Les modifications génétiques de ces cellules permettent de produire une grande quantité de Acm humanisés, e.g. environ 100 pg/cellule/jour pour les lignées CHO et entre 20 à 50 pg/cellule/jour pour les lignées NS0. Il est important de noter que d'autres lignées cellulaires de mammifères (e.g. cellules humaines, Per.C6\*, cellules de myélomes de rat YB2/0) sont à l'étude.



D'autres modèles cellulaires tels que des cellules de plantes, de levures, génétiquement modifiées, ont également été utilisés dans la production de Acms dans l'industrie biopharmaceutique (Chon and Zarbis-Papastoitsis, 2011).

- Milieu de culture (2) : des milieux de culture complexes sont employés afin d'obtenir une production d'Acm à grande échelle. Leur composition est constituée d'ingrédients tels que les acides aminés, des vitamines, des oligo-éléments, des éléments inorganiques à très faible taux, des lipides, de l'insuline ou de « l'insulin-like growth factors ». Si c'est possible un milieu artificiel sans composants d'origine animale sera privilégié pour des raisons de sécurité liées aux problèmes de transmission de l'encéphalopathie spongiforme. Ainsi des nutriments à base de soja, blé et levures pourront également être employés. Cette approche apporte un meilleur contrôle de la production et une haute pureté des produits finis (Chartrain and Chu, 2008). Cependant, il est important de noter que la composition du milieu de culture est dépendant de la lignée cellulaire employée.

- Conditions de culture (3) : Les conditions de la culture peuvent influencer directement sur la croissance cellulaire et la production de molécules d'intérêt. Généralement, les cultures de cellules mammifères sont réalisées à 37 °C, pH 7,15 et O<sub>2</sub> dissous (O.D.) à 30–60%. Le niveau de CO<sub>2</sub> est contrôlé afin de mimer l'environnement physiologique standard à une pression comprise entre 31 et 54 mmHg. De plus, l'application des bioprocédés permet de suivre des changements au niveau cellulaire afin d'optimiser le rendement de la production et de réduire certains composés métaboliques toxiques pour les cellules tout en permettant une plus grande viabilité cellulaire (Carvalho et al., 2017).

- Plateforme de production (4) : La culture cellulaire peut être réalisée en utilisant trois processus différents à savoir « batch » (discontinue), « feed-batch » (semi-continue) et « perfusion » (continue). Bien que la plupart des Acms actuels soient produits par un processus « feed-batch », de nombreux bioprocédés seront exploités sur des plates-formes en mode continu à l'avenir pour la production de produits biopharmaceutiques.

### *Processus « Downstream »*

Le processus « downstream » a pour l'objectif de réaliser une purification complète des anticorps à partir d'un milieu de culture exempt de cellule ; avec le plus haut rendement et la meilleure productivité, à un coût minimum tout en préservant l'activité biologique et la sécurité, pour obtenir un très haut degré de pureté (99,9 % pour une préparation injectable). Ce processus est constitué de plusieurs étapes ; (i) chromatographiques (e.g. affinité sur la protéine A, échanges d'ion et interaction hydrophobe), (ii) inactivation de virus, (iii) filtrations en séries (e.g. filtration de virus, diafiltration, filtration stérilisante), etc. Généralement, ces opérations sont effectuées dans une zone de production distincte, avec des opérateurs parfois différents. Cette organisation dépend de la stratégie de chaque entreprise (Shukla et al., 2017).

Ce processus de « downstream » de plate-forme débute presque toujours par une chromatographie d'affinité sur protéine A qui permet un taux de purification allant jusqu'à 90 %. Il s'agit d'une méthode chromatographique où la protéine est retenue sur le support, tandis que les impuretés sont éluées. Des procédures sans protéine A ont été développées et utilisées pour la fabrication à grande échelle comme pour toute protéine thérapeutique, mais n'ont pas été conservées en raison de l'absence d'une approche générique et des problèmes de robustesse des processus (Shukla et al., 2017). Une étape d'incubation à faible pH est placée immédiatement après la chromatographie sur protéine A pour l'inactivation virale. Cette inactivation virale à faible pH suivie d'une purification par la chromatographie à l'échange d'ion puis d'une filtration virale à travers un filtre grade parvovirus (< 20 nm) sont largement utilisées (Shukla et al., 2017).

Les étapes de purification par chromatographie d'échange d'ions (cationique et anionique) et chromatographie d'interaction hydrophobe sont généralement utilisées afin d'éliminer des protéines non recherchées, agrégats, ADN, des sels ou d'éventuels résidus. Cette dernière étape de purification est appelée « polissage ». Les principales différences entre les approches de plate-forme résident

dans l'ordre des étapes chromatographiques de polissage (Shukla et al., 2017). Pour finir, une filtration stérilisante permet l'obtention d'un produit dont la pureté est proche de 100%, ce qui permet ensuite sa formulation en vue d'une utilisation en clinique.

## II.2. Anticorps monoclonaux thérapeutiques dans le contexte hospitalier

### II.2.1. Préparation et contrôle des Acms en milieu hospitalier

Les anticorps thérapeutiques administrés aux patients sont disponibles sous forme lyophilisée ou forme de solution concentrée. Ceci requiert une reconstitution utilisant des solutions isotoniques glucosées (glucose 5%) ou salines (NaCl 0,9%) suivant les recommandations du fabricant, en conformité avec les bonnes pratiques de fabrication et préparation (*Décision du 5 novembre 2007 relative aux bonnes pratiques de préparation*). Un contrôle qualité est donc obligatoire pendant la reconstitution (*in process*) ou avant l'administration, des anticorps thérapeutiques, pour vérifier la teneur et l'AcM (Jaccoulet, 2017). Actuellement, il y a deux méthodes de contrôle qualité appliquées aux Acms dans l'hôpital, le contrôle non-analytique et contrôle analytique.

En pharmacie hospitalière, Le contrôle non-analytique est effectué pendant la préparation par ;(i) le double contrôle visuel et (ii) le contrôle par vidéosurveillance. Le contrôle visuel consiste au suivi de la préparation par un préparateur. Cette méthode est appliquée dans les hôpitaux en France pour les Acms thérapeutiques. Cependant, ce mode ne fournit pas d'informations quantitatives ni qualitatives sur la préparation. Un risque d'erreur humaine est possible et pose un problème majeur en termes de sécurité. Le contrôle par vidéosurveillance a été proposé comme une méthode *in process* en utilisant un appareil photographique qui permet de contrôler chaque étape de la préparation. Ce mode permet de réduire les besoins en personnel, mais requiert néanmoins l'installation et l'entretien des caméras ce qui constitue une contrainte (Jaccoulet, 2017).

Le contrôle analytique repose sur le contrôle gravimétrique et les spectroscopies UV/IR, UV/Raman afin de vérifier les Acms après la reconstitution. Avec la méthode gravimétrique, la masse de la poche reconstituée est comparée avec une masse théorique en employant une balance de précision. Cependant, le principe actif n'est ni quantifié, ni qualifié par cette méthode. Par ailleurs, la quantification et l'identification peut être réalisées par les outils spectroscopiques UV/IR

ou UV/Raman. Le spectre d'un échantillon Acms est comparé avec un spectre existant dans une base de données avec un coefficient de corrélation fixé par la pharmacie hospitalière. Actuellement, quelques automates (e.g. Multispec, QC prep+, etc.) sont utilisés pour le contrôle d'Acms reconstitués dans l'hôpital. Néanmoins, leurs performances sont encore limitées en termes de spécificité et sensibilité dans la discrimination entre lots et Acms (Bazin et al., 2015; Jaccoulet, 2017).

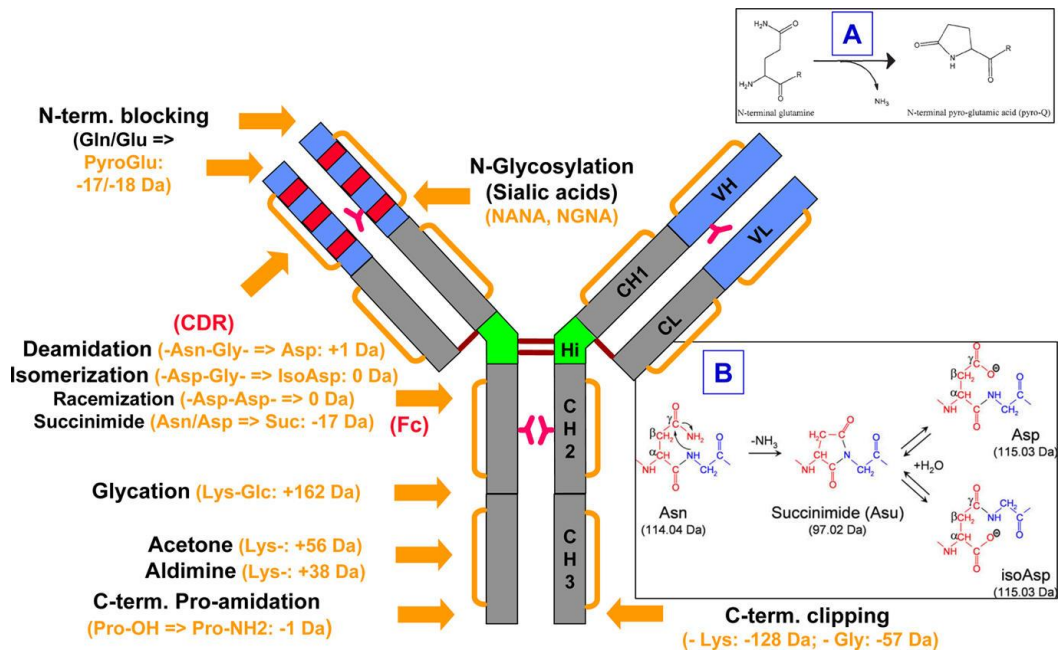
## **II.2.2. Stabilité des anticorps monoclonaux et les facteurs d'influence**

La Conférence Internationale sur l'Harmonisation (ICH) relative à l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage humain a classé dans la directive Q6B les impuretés des protéines thérapeutiques recombinantes (produits biopharmaceutiques incluant également des Acms) liées aux dégradations physiques et/ou chimiques. En effet, au cours de leur biosynthèse, extraction, purification, formulation ou pendant leur conservation, les Acms peuvent subir une grande variété de modifications chimiques, e.g. oxydation, déamidation, fragmentation, glycation, et formation de pont disulfures (Figure 2.2.1) (Beck et al., 2013a) ou physiques, e.g. altérations conformationnelles, agrégation (DeFelippis et al., 2016; Wang et al., 2007).

### **II.2.2.1. Dégradation chimique**

En ce qui concerne la dégradation chimique, les principales voies sont la formation de ponts disulfures, la déamidation, l'isomérisation, l'oxydation et la fragmentation.

*Les ponts disulfures* : La formation de ponts disulfure Cys-Cys est probablement la voie de dégradation la plus fréquente. Cette dégradation peut se produire facilement durant les étapes de production ou stockage. Par exemple, un anticorps IgG1 lyophilisé sans excipient (contenant 12 intra et 4 inter-chaînes disulfures) sera dégradé après 1 an de stockage à 30°C conduisant à la formation de dimères et trimères liés à des ponts disulfures intermoléculaires (Andya et al., 2003).



**Figure 2.2.1** : Représentation schématique des dégradations chimiques après modifications post-traductionnelles (Beck et al., 2013b)

*Déamidation* : La déamidation est également une voie de dégradation fréquemment observée. Cette dégradation n'est pas liée à un processus enzymatique. Elle implique deux acides aminés l'Asn et la Gln. La déamidation de Asn30 (converti en acide aspartique) sur le LC et déamidation de Asn55 (converti en iso-aspartate) sur les chaînes lourdes (HC) ont été mises en évidence sur Herceptin (trastuzumab) (Harris et al., 2001). D'autres travaux ont montré que 90% de Asn H386 était déamidé après une incubation de OKT3 pendant 2 mois à 37 °C (Kroon et al., 1992). La déamidation de la Gln conduit à la formation d'acide glutamique. Néanmoins, la probabilité d'observer cette réaction est très faible par rapport à une déamidation d'Asn. Aussi, la déamidation de la Gln est rarement détectée dans les protéines recombinantes (Jenkins et al., 2008).

*Isomérisation* : l'isomérisation est très répandue et difficile à contrôler. Le mécanisme d'isomérisation est similaire à celui de la déamidation. Elle est basée sur la formation d'un intermédiaire cyclique succinimide conduisant à la formation d'acide iso-aspartique à partir de d'une isomérisation directe d'Asp et Asn. En outre, cette dégradation peut se produire non seulement dans la solution mais aussi à l'état solide (e.g. forme lyophilisée) (Wang et al., 2007). Par conséquent,

l'isomérisation d'Asp est une des voies majeures de dégradations des Acms lyophilisé, en particulier si la température et le taux d'humidité de stockage est important (Breen et al., 2001). La formulation peut constituer un facteur important pour limiter la vitesse du phénomène d'isomérisation. Par exemple, il a été montré que le sel de magnésium améliorait la stabilité des Asp de Acms humanisés (Wakankar and Borchardt, 2006).

*Oxydation* : l'oxydation des protéines au niveau d'acide aminé comme la Met, la Tyr, le Trp, l'His et la Cys peut se produire facilement pendant le stockage (Wang et al., 2007). Cette dégradation est catalysée notamment par la lumière. Une augmentation d'oxydation d'un anticorps humanisé recombinant HER2 a été observé après son exposition à la lumière à 20 000 lumen pendant 2 semaines (Lam et al., 1997). D'autres travaux ont montré que la conservation d'anticorps thérapeutiques entre 2 et 8 °C pendant 3 ans ou leur incubation à des températures élevés entraînaient une oxydation de la met sur les anticorps (Kroon et al., 1992).

*Fragmentation* : Ce phénomène correspond à la rupture d'une liaison covalente dans une protéine. Cette rupture est observée au niveau des séquences de Asp-Gly, Asp-Pro et Asn-Ser. Cette dégradation est fonction de la séquence primaire, de la flexibilité de la structure locale, des conditions de conservation des anticorps (pH, température) et de la présence de métaux ou de radicaux (Vlasak and Ionescu, 2011). Cette fragmentation peut conduire à une perte de LC, à une séparation des fragments Fc et Fab ou à une séparation de HC et LC, etc. Plusieurs facteurs peuvent provoquer une fragmentation tels que le stress en solution à pH acide ou basique (e.g. pH 3,5 ou 8,1), température (e.g. 60°C - 75°C) (Vermeer and Norde, 2000), la congélation et / ou décongélation (Wang et al., 2007).

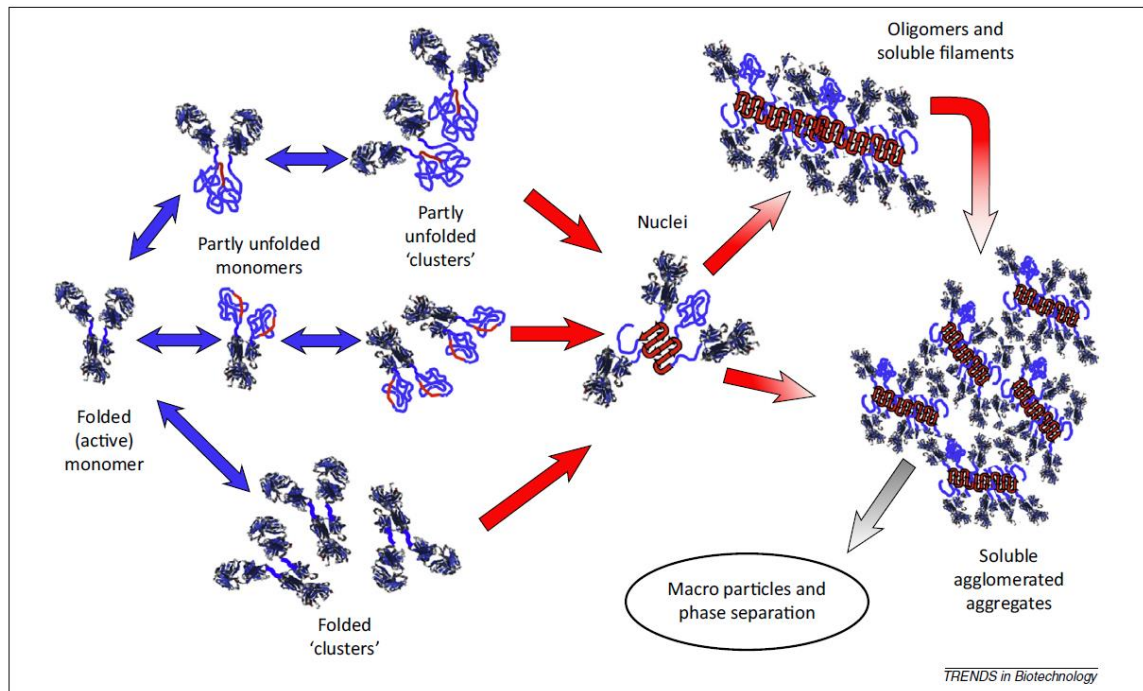
### II.2.2.2. Dégradation physique

Les Acms peuvent subir des modifications structurelles sans modification de leur composition chimique. Ces modifications incluent la dénaturation, les modifications conformationnelles, et les phénomènes d'agrégation. Ces instabilités physiques, qui modifient la structure tridimensionnelle d'un anticorps thérapeutique, peuvent avoir un impact sur leur activité biologique.

*Dénaturation* : Dans un état natif, les anticorps ont une structure quaternaire formée par des repliements spécifiques liée à des liaisons faibles intramoléculaires (liaison chimique, répulsion électrostatique, interactions électrostatiques, interactions de van der Waals, liaison hydrogène ou interaction hydrophobe), ce qui confère à la protéine une forme compacte et repliée. Lorsque l'anticorps est dénaturé, il perd sa structure quaternaire avec un dépliement partiel ou total. Ceci conduit souvent à leur agrégation dont le mécanisme est décrit par Roberts et al. (Roberts, 2014). Cette altération de la conformation de l'anticorps est observée au niveau du fragment Fc ou Fab. Ces fragments ainsi dénaturés ont tendance à interagir entre eux pour former des dimères d'anticorps (partiellement dénaturés), puis des oligomères avec des filaments solubles ; pour ensuite constituer des agrégats solubles et non solubles (Figure 2.2.2).

*Agrégation* : l'agrégation est également une voie majeure de la dégradation physique des Acms. La présence d'agrégats dans une préparation d'anticorps formulée est un point critique car ils peuvent provoquer des réactions immunogènes chez les patients. Il a été démontré que les agrégats d'IgG peuvent provoquer une insuffisance rénale grave et des réactions anaphylactiques pouvant conduire à des maux de tête, fièvre, etc. (Hansel et al., 2010). Aussi, l'agrégation des Acms thérapeutiques doit être strictement contrôlé pendant le processus de production et lors de l'utilisation clinique.





**Figure 2.2.2** : Représentation schématique des différentes voies d'agrégation (Roberts, 2014)

Les agrégats d'anticorps se forment non seulement en solution mais aussi dans l'état solide. Généralement, plusieurs classifications d'agrégats sont proposées (Joubert et al., 2011; Mahler et al., 2009; Narhi et al., 2012; Wei Wang and Christopher J. Roberts, 2010), dont les 4 caractères les plus employées sont la conformation, la liaison, la réversibilité et la taille :

- Conformation : repliée (agrégats de protéines natives) ou dépliée (agrégats de protéines dénaturés)
- Liaison : covalente (e.g. liaison disulfure) ou non-covalente (faible liaison comme électrostatique, hydrophobique, hydrogène)
- Réversibilité : réversible ou irréversible
- Taille : soluble (e.g. oligomères comme dimère, trimère, etc. à < 100 nm), subvisible (100 nm – 10 µm) ou visible (> 10 µm)

Ainsi, un agrégat est toujours défini par les 4 paramètres ci-après : conformation, liaison, réversibilité et taille. Néanmoins, la caractérisation d'agrégats reste toujours compliquée et requiert le recours à plusieurs techniques analytiques différentes.

Les agrégats ne résultent pas uniquement de la dégradation physique mais peuvent provenir également de la dégradation chimique. En effet, les protéines dans leurs états natifs (non dénaturés) peuvent également s'associer pour former des agrégats par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques ou hydrophobes (Liu et al., 2005). Ce type d'agrégats est souvent réversible mais il peut également être considéré comme un état précurseur d'une agrégation irréversible pouvant conduire à une précipitation. Quand la protéine est chimiquement ou physiquement modifiée (dénaturée ou dépliée), cela peut également être à l'origine de la production d'agrégats. Par conséquent, l'agrégation peut être considéré comme une étape finale survenant à la suite de différents types de dégradation.

L'agrégation peut être induite par des facteurs externes mais aussi interne. (i) Les facteurs externes sont la température, l'agitation, la congélation et / ou décongélation, la lumière, la lyophilisation, etc. (ii) Les facteurs internes concernent la formulation comme pH, force ionique, excipients, concentration, etc. (Ishikawa et al., 2010; Kiese et al., 2008; Liu et al., 2013; Paul et al., 2012).

### **II.2.3. Immunogénicité.**

L'immunogénicité reste l'un des principaux défis à relever dans l'utilisation des Acms thérapeutiques. L'immunogénicité est définie comme étant la production d'ADA (antidrug antibodies) par les patients en réponse à l'administration d'Acms thérapeutiques pouvant s'accompagner de réponses immunitaires responsable d'effets indésirables (De Groot and Scott, 2007; Hwang and Foote, 2005, Kuriakose et al., 2016, Stas et al., 2009). L'immunogénicité peut poser des problèmes cruciaux à la fois pour l'efficacité des protéines thérapeutiques et pour la sécurité des patients avec des réactions pouvant être fatales liées à des réactions allergiques pouvant conduire à des chocs anaphylactiques (Kessler et al., 2006). Par conséquent, les agences de régulation européenne (European Medicines Agency) ([Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins](#)) et nord-américaine (Food and Drug Administration) ([Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products](#)) ont édité des recommandations et proposées des programmes de gestion des risques pour répondre à ce problème.

#### **II.2.3.1. Anti-drug antibodies**

Actuellement, l'effet d'immunogénicité lors de traitement clinique a été observé pour de nombreux Acms thérapeutiques (Tableau 2.2.1). L'humanisation des anticorps thérapeutiques a permis de diminuer considérablement les réponses immunitaires. Néanmoins, les observations cliniques effectuées montrent clairement que l'humanisation de la séquence primaire ne garantit pas l'absence de réponse immunitaire (Maillère et al., 2012). Les protéines thérapeutiques entraînent des réponses immunitaires qui se manifestent par le développement d'une réponse adaptative du système immunitaire via les lymphocytes B, les macrophages ou les cellules dendritiques qui conduira à la présentation d'un antigène au complexe majeur d'histocompatibilité de type II et donc à l'activation des lymphocytes T. Le deuxième type de réponse est liée à la production d'anticorps dirigées contre les protéines thérapeutiques, les ADA. Les ADA produits sont classés comme Acm

liants (Binding Antibodies, BAbs) ou Acm neutralisant (Neutralizing Antibodies, NAb). Les BAbs se lient à la protéine thérapeutique mais ils ne la neutralisent pas, c'est à dire que son efficacité thérapeutique n'est pas supprimée. En revanche, ceci peut conduire à une modification des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la protéine. Les BAbs peuvent augmenter la clairance ou prolonger l'exposition systémique. Ils peuvent également être précurseur ou initiateurs de NAb. Les NAb se lient à la molécule thérapeutique et vont perturber son affinité envers la cible et ainsi neutraliser la fonction thérapeutique de la protéine. Lorsque les NAb sont présents à une concentration élevée, l'efficacité des protéines thérapeutiques peut être affecté (Singh, 2011).

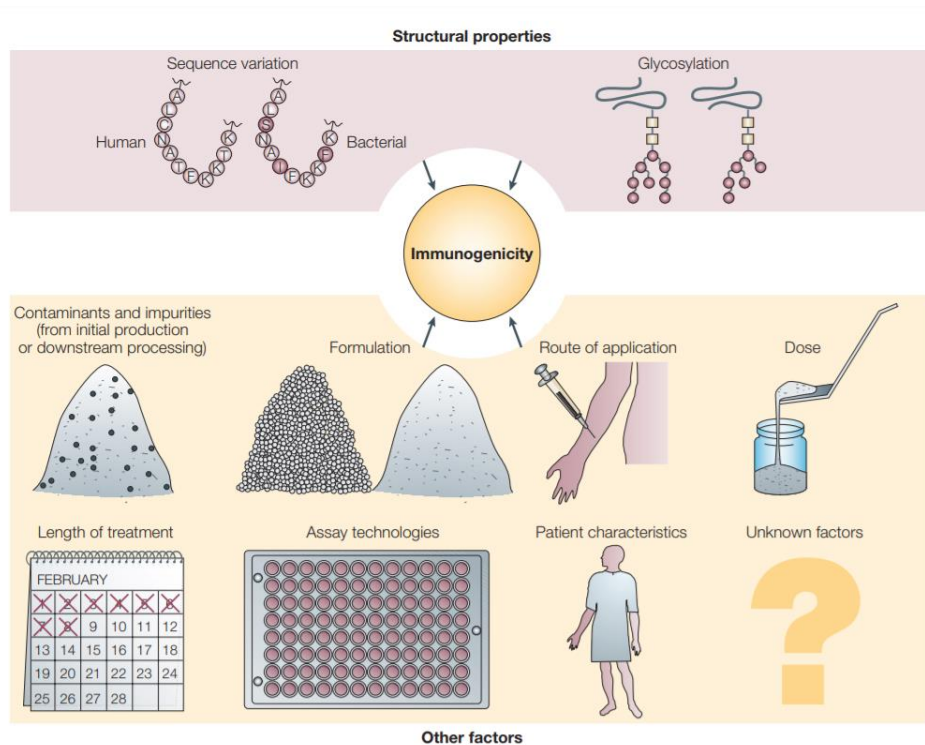
**Tableau 2.2.1** : Immunogénicité des Acms thérapeutiques (Kuriakose et al., 2016b)

Acms	Type/Cible	Immunogénicité (% patients)	
		BAbs	NAb
Adalimumab	Humain Acm/anti-TNF $\alpha$	5%–89%	5%–89%
Alemtuzumab	Humanisé Acm/anti-CD52	30%–70%	30%–70%
Belimumab	Humain Acm/B cell survival factor	4,80%	03/11
Canakinumab	Humain Acm/anti-IL-1 $\beta$	0	0
Cetuximab	Chimérique Acm/anti-EGFR	5%	-
Denosumab	Humain Acm/ anti-RANK	<1%	0
Golimumab	Humain Acm/anti-TNF $\alpha$	4%	-
Infliximab	Chimérique Acm/anti-TNF $\alpha$	Maladie de Crohn : 10%, psoriasis : 36–51%	-
Ipilimumab	Humain Acm/anti-CTLA4	1,1% (1024 patients)	0
Natalizumab	Humain Acm /anti- $\alpha$ 4-integrin	9%	9%
Nivolumab	Humain Acm/anti-PD1, PDL1	8,50%	0,70%
Ofatumumab	Humain Acm/anti-CD20	0	0
Panitumumab	Humain Acm/anti-EGFR	1–4,6%	0,8–1,6%
Pembrolizumab	Humain Acm/anti-PD1	0,30%	0,30%
Ramucirumab	Humain Acm/anti-EGFR 2	6%	1%
Rituximab	Chimérique Acm/anti-CD20	11%	-
Secukinumab	Humain Acm/anti-IL-17A	0,40%	03/10
Siltuximab	Chimérique Acm/anti-IL-6	0,20%	0
Ustekinumab	Humain Acm/anti-p40 d'IL-12, IL-23	6.6%	-
Vedolizumab	Humanisé Acm/anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 intégrine	4%	33/56

### II.2.3.2. Facteurs influençant l'immunogénicité

De nombreux facteurs peuvent influencer le développement de la réponse immune notamment ;

(i) le patient, (ii) le traitement, et (iii) l'anticorps thérapeutique lui-même (Figure 2.2.3) (Schellekens, 2002).



**Figure 2.2.3 :** Les facteurs influencent sur l'immunogénicité de protéines thérapeutiques (Schellekens, 2002)

- (i) L'immunogénicité peut être influencée par les facteurs inhérents au patient tels que sa susceptibilité génétique, la nature de sa pathologie ou le traitement administré. Par exemple, il a été observé par de nombreux auteurs que les réactions immunitaires étaient moins importantes lors d'un traitement anticancéreux par rapport à un traitement administré pour une maladie inflammatoire ou auto-immune par la même protéine thérapeutique (e.g. Infliximab) (Stas et al., 2009; Wagner et al., 2003). Par exemple, des doses équivalentes d'infliximab ne provoquent pas des mêmes conséquences d'immunogénicité chez les patients ayant une polyarthrite rhumatoïde ou une arthrite juvénile (Stas et al., 2009).

- (ii) Le mode d'administration, la dose administrée, la fréquence, la durée du traitement peuvent également influencer la réponse immunogène à une protéine thérapeutique. Il est généralement admis que le traitement à court terme est moins susceptible d'être immunogène que le traitement à long terme. En revanche, il a été montré que le traitement intermittent était plus susceptible de provoquer une réponse immunogène qu'un traitement continu (Strand et al., 2017; Vincent et al., 2013).

- (iii) D'autres facteurs concernant le produit tels que l'origine (e.g. murine ou humain), la nature de la substance active (protéine endogène, protéine post-traductionnelle), les modifications physico-chimiques de la protéine thérapeutique (e.g. produits dégradés, impurifiés, agrégats) ou le mode de formulation (excipients) peuvent influencer la réponse immunogène. En effet, tous les variants d'Acms thérapeutiques sont potentiellement immunogènes (Hwang and Foote, 2005; Maas et al., 2007; Moussa et al., 2016; Ratanji et al., 2014). De nombreux travaux ont montré que les agrégats de protéines thérapeutiques peuvent être de puissants inducteurs de la production d'ADA, car ils sont facilement captés par les cellules présentatrices d'antigènes (Moussa et al., 2016b; Stas et al., 2009). De plus, il a été montré que les agrégats sub-visibles de taille comprise entre 0,1-10 microns ont un fort potentiel immunogène. Cependant, la présence de ces agrégats reste difficile à contrôler par les techniques actuelles utilisées (Hawe et al., 2012).

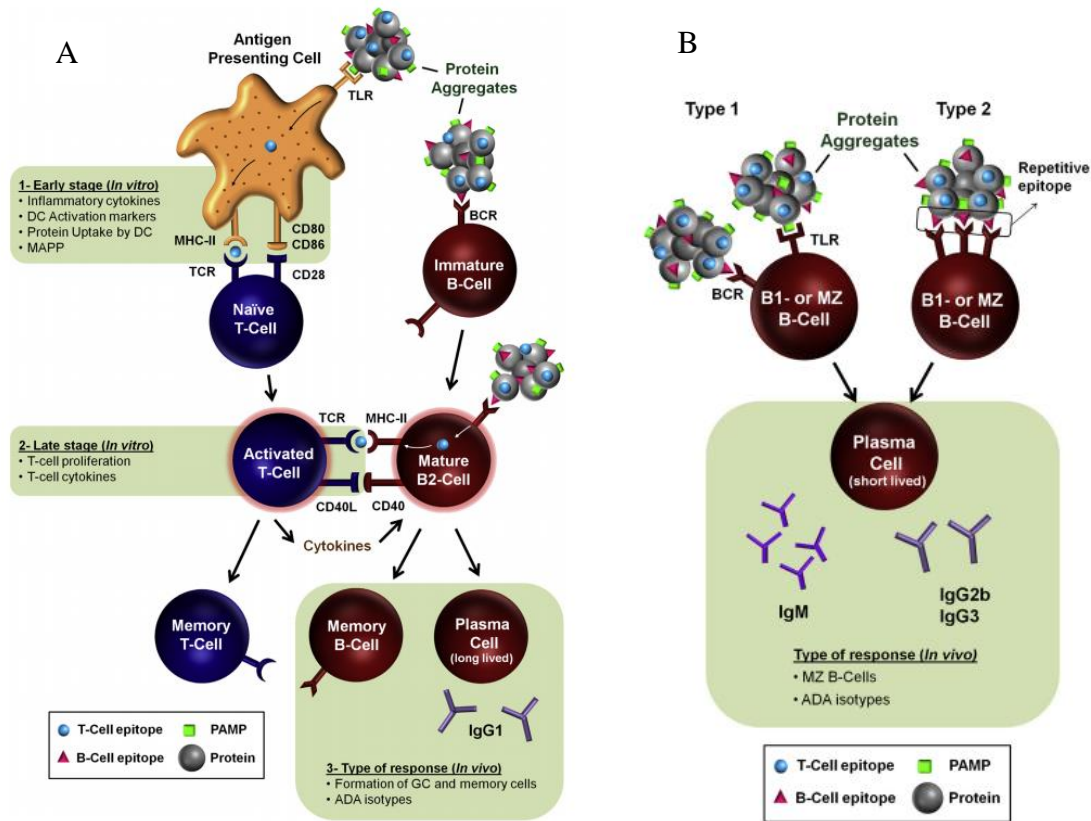
### **II.2.3.3. L'immunogénicité des agrégats de protéines thérapeutiques et mécanismes de production des ADA**

Les réponses immunitaires des agrégats de protéines thérapeutiques en général, et d'Acms en particulier, dépendent à la fois du type d'agrégats et de la souche de souris sur laquelle les études ont été réalisées. Freitag et al. a réalisé une étude sur les réponses immunitaires par les agrégats de IgG générés par la lumière, l'agitation ou les températures élevées (Freitag et al., 2015). Les agrégats les plus immunogènes semblent ceux insolubles avec des structures modifiées (Freitag et al., 2015). Cependant, peu d'études permettent d'établir un lien entre le type d'agrégats, la nature des stress et

les réponses immunitaires. Aussi, il est nécessaire de développer des méthodes analytiques permettant une caractérisation fine et rigoureuse des agrégats en fonction des stress appliqués.

Les agrégats de protéines thérapeutiques peuvent induire la production d'ADA par les lymphocytes B activés selon deux voies ; une voie dépendante des Lymphocytes T (Td), et une voie indépendante des Lymphocytes T (Ti) (De Groot and Scott, 2007).

En ce qui concerne le mécanisme Td (Figure 2.2.4 A), l'activation des cellules B est constituée de deux phases (précoce et tardive). En phase précoce, les cellules présentatrices d'antigène (Antigen presenting Cell, CPA) activées par les agrégats, stimulent les cellules T naïve (Naïve T-Cell) par l'intermédiaire d'interactions entre le CMH-II ainsi que des molécules co-stimulatrices (présentes sur la surface des cellule présentant l'antigène activé) et le récepteur des cellules T (TCR) et le CD 28 respectivement (présents à la surface des Cellules T naïves). Dans la phase tardive ou adaptative, les cellules T ainsi activées vont se différencier en lymphocytes T auxiliaires (lymphocytes T helper) pour activer à leur tour les lymphocytes B. Les cellules B sont ensuite transformées en lymphocytes B matures grâce à une co-stimulation par les agrégats et les T auxiliaires. Finalement, les cellules B vont proliférer et se différencier en lymphocytes B mémoires (Memory cell) et en cellules plasmocytaires qui vont produire des ADA de haute affinité (de type IgG).



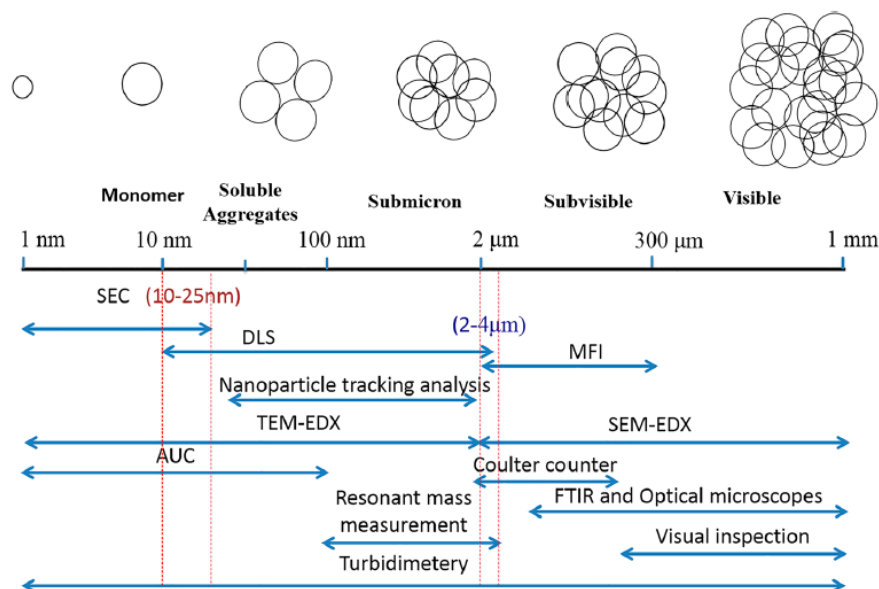
**Figure 2.2.4 :** Hypothèses de formation des ADA via les mécanismes ; Td (A) et Ti (B) (Moussa et al., 2016b).

En ce qui concerne le mécanisme Ti (Figure 2.2.4 B), deux mécanismes de production des ADA concomittants sont proposés, mettant directement en jeu des lymphocytes B. D'une part, les agrégats peuvent être captés par des récepteurs BCR (IgM et IGD membranaires) ou TLR (récepteurs de type Toll) et provoquer la production d'ADA en activant directement les cellules B de la zone marginale de la rate (MZ-B Cell). D'autre part, une activation des cellules B polyclonales peut également se produire via une séquence répétitive d'épitotes d'agrégats qui relie les récepteurs BCR de type IgM ou IgD membranaires et conduire au développement de cellule B mémoires. Les ADA sécrétés présentent les isotypes suivant : IgG2b, IgG3 et IgM.



### II.3. Caractérisation des agrégats et des Acms dénaturés

Le contrôle d'agrégats dans la solution d'injection d'Acms thérapeutiques est indispensable pour la qualité, l'efficacité du produit ainsi que la sécurité des patients. Par conséquent, la Pharmacopée américain (USP <788>, *Particulate matter in injection*) et la Pharmacopée européenne (Ph. Eur. 2.9.19, *Particulate contamination : sub-visible particles*) exigent un contrôle de la présence des particules > 10 µm et >25 µm dans la solution d'injection. Par exemple, pour la pharmacopée les particules de taille supérieure à 10 µm doivent avoir un taux inférieur ou égale à 6000 particules/conteneur supérieur à 100mL et que les particules de plus de 25 µm sont limitées à une valeur inférieure ou égales à 600 particules/conteneur supérieur à 100mL. De plus, les directives de la FDA pour l'industrie pharmaceutique (*FDA Guidance for industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products*) préconisent un contrôle des particules sub-visibles d'une taille comprise entre 2 et 10 µm et des agrégats solubles d'une taille de 0,1 à 2 µm. Le contrôle doit surtout être effectué avant la libération de lots ou pendant l'étude de stabilité des Acms thérapeutiques (EMEA, 2007).



**Figure 2.3.1** : Exemple de méthodes analytiques pour la caractérisation d'agrégats de 1nm à 1 mm (Bansal et al., 2019).

Comme décrit dans le chapitre II.2.2, il y a plusieurs types d'agrégats classés selon leur taille, le type de liaisons, leur conformation et leur réversibilité. L'analyse des agrégats est un vrai défi pour la chimie analytique. En effet, de nombreuses méthodes ont été développées pour étudier et détecter les agrégats selon leurs tailles. Néanmoins, aucune méthode analytique ne peut seule couvrir toute la gamme de taille ou le type d'agrégats. Un autre défi concerne la limite de détection ainsi que les agrégats artéfactuels générés pendant les étapes de préparation d'échantillon et d'analyse ce qui peut entraîner une sur ou sous-estimation du taux d'agrégat dans un échantillon (Mahler et al., 2009). Il est donc nécessaire d'utiliser un ensemble de méthodes différentes pour une caractérisation complète des agrégats de petites tailles (dimère, trimère, agrégats solubles) ou de grandes tailles (particules subvisibles et visibles) (Figure 2.3.1) (Bansal et al., 2019; den Engelsman et al., 2011; Mahler et al., 2009)

### II.3.1. Détection et caractérisation de particules subvisibles et visibles

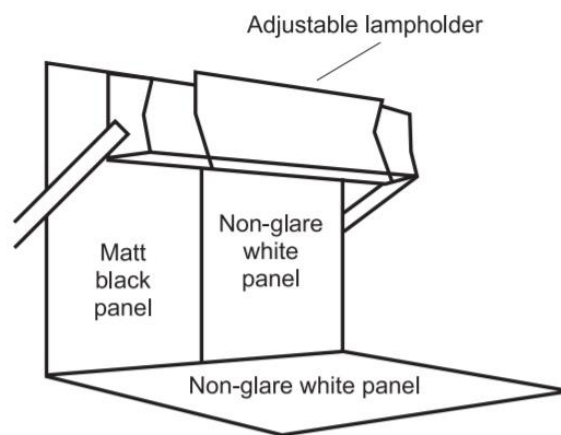
De nombreuses méthodes pour l'analyse des particules visibles ou subvisibles sont actuellement utilisées dans l'industrie biopharmaceutique ou à l'hôpital. Généralement, ces méthodes permettent de caractériser les agrégats en termes de concentration, tailles, rayon hydrodynamique, masse moléculaire, morphologie, etc. (Tableau 2.3.1). Ces méthodes sont normalement rapides, faciles à utiliser ou installer dans un laboratoire de contrôle.

**Tableau 2.3.1** : Méthodes employées pour la détection et la caractérisation d'agrégats visibles et sub-visibles (den Engelsman et al., 2011)

Méthode	Détection	Gamme de taille
Inspection visuelle	Opalescence, particules	>50 $\mu\text{m}$ – mm
Microscopie optique	Taille et morphologie	>1 $\mu\text{m}$ – mm
Diffraction laser	Taille de particule	20 nm – 2 mm
Microscopie de fluorescence	Particule, protéine amyloïde	>1 $\mu\text{m}$ – mm
Compteur de particules basé sur la conductivité (Coulter method)	Concentration et taille	0,4 $\mu\text{m}$ –1,2 mm
Imagerie de flux	Concentration, taille et morphologie	1–400 $\mu\text{m}$
Obscurcissement de la lumière (Light obscuration)	Concentration et tailles	2–100 $\mu\text{m}$
Diffusion dynamique de lumière (DLS)	Rayon hydrodynamique	1 nm – 5 $\mu\text{m}$
L'analyse du suivi individuel de particules (NTA)	Rayon hydrodynamique	20 nm – 1 $\mu\text{m}$

L'inspection visuelle est la méthode plus simple pour la détection des agrégats visibles de 50  $\mu\text{m}$  à quelques millimètres. Elle est effectuée à l'aide d'un appareil constitué d'une boîte composée de deux panneaux en noir et blanc (Ph. Eur. 2.9.20) (Figure 2.3.2). Cette méthode est simple mais subjective. Pour ces gammes de tailles, d'autres méthodes sont disponibles telles que la microscopie optique, la diffraction laser, la microscopie de fluorescence, le compteur de particules, l'imagerie

en flux et l'obscurcissement de lumière sont plus précises, notamment en ce qui concerne les agrégats visibles et subvisibles de quelques micromètres. Par exemple, le compteur de particules, la microscopie et l'obscurcissement de la lumière donnent des informations quantitatives d'agrégats (e.g. nombre de particules). Parmi ces techniques, la microscopie et l'obscurcissement de lumière sont décrites dans les différentes pharmacopées (européenne et américaine) appliquées au contrôle de particules subvisibles. Avec la méthode d'obscurcissement à la lumière, la taille des particules est estimée grâce à la quantité de lumière bloquée par les particules. En ce qui concerne la microscopie optique, l'échantillon est filtré à travers une membrane puis est placé sous le microscope pour compter et mesurer la taille (Mahler et al., 2009).



**Figure 2.3.2 :** Appareil pour l'inspection visuelle (Ph. Eur. 2.9.20)

Les techniques de diffusion dynamique de lumière (DLS), et de l'analyse du suivi individuel de particules (NTA) sont aussi largement appliquées pour détecter les particules subvisibles dans la solution. Ces méthodes sont basées sur le mouvement brownien de particules dans la solution afin de mesurer leurs tailles hydrodynamiques. Le mouvement brownien des particules engendre la diffusion de la lumière. L'analyse des fluctuations d'intensité de la diffusion de la lumière (DLS) ou la visualisation spectroscopique (NTA) permettent déterminer le rayon hydrodynamique et la distribution de particules à l'aide de la relation de Stokes-Einstein. De plus, ces techniques peuvent être également appliquées pour les agrégats solubles car leur limite de détection sont de 1 nm et 20 nm pour DLS et NTA, respectivement.

### II.3.2. Méthodes séparatives pour la détection et la caractérisation d'agrégats solubles

Les méthodes les plus couramment utilisées pour la détection et la caractérisation des agrégats solubles sont la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la séparation par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE), l'électrophorèse capillaire (CE-SDS), l'ultracentrifugation analytique (AUC) et le fractionnement par couplage flux-force à flux asymétrique (AF4) comme dans le tableau ci-dessous (Tableau 2.3.2) :

**Tableau 2.3.2** : Méthodes employées pour la détection et caractérisation d'agrégats solubles (den Engelsman et al., 2011)

Méthode	Détection	Gamme de taille
(i) Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	Rayon hydrodynamique, quantification	1-50 nm
(ii) SDS-PAGE, CE-SDS	Masse moléculaire, liaison covalente vs noncovalent	kDa – MDa
(iii) Ultracentrifugation analytique (AUC)	Masse moléculaire, forme, quantification	1-100 nm
(iv) Fractionnement par couplage flux-force à flux asymétrique (AF4)	Taille hydrodynamique, quantification	1 nm - $\mu\text{m}$

- (i) La SEC est considérée comme une méthode de référence pour la détection d'agrégats solubles pour les protéines thérapeutiques dans l'industrie biopharmaceutique. Une présentation détaillée de cette méthode est effectuée dans le chapitre II.5 de cette thèse.

- (ii) SDS-PAGE ou CE-SDS permet d'estimer la taille des protéines, de déterminer la pureté et d'évaluer la présence de liaisons disulfures de protéine. La préparation consiste à dénaturer les protéines à l'aide un détergent anionique dodécylsulfate de sodium (SDS) avec une température élevée. Les zones hydrophobes des protéines interagissent avec la partie hydrophobe du SDS, celles-ci sont ainsi une charge globale négatives, avec un rapport charge sur masse pouvant être considéré comme similaire pour toutes les protéines. Ainsi, lorsque le courant sera appliqué, les protéines

migreront avec la même mobilité vers la cathode. Le gel de polyacrylamide formant un tamis, les molécules les plus petites migreront plus rapidement que les protéines de plus grandes tailles dans un gel (SDS-PAGE) ou dans un capillaire (CE-SDS) vers l'anode en fonction de leurs tailles. Les fragments et les agrégats sont estimés en utilisant des standards de masse molaires connus. Néanmoins, cette méthode ne permet pas de détecter des agrégats covalents et des protéines de masse molaire supérieures à 500 kDa.

- (iii) Le principe de l'AUC repose sur la sédimentation des anticorps qui sont soumises à une force centrifuge. Les molécules sont séparées en fonction de leurs masses moléculaires, tailles et formes. Par couplage avec des détecteurs UV ou à fluorescence par exemple cette méthode permet d'obtenir des informations sur la détection et la quantification d'agrégats. Par conséquent, elle devient actuellement un outil largement utilisé dans la caractérisation des produits biopharmaceutiques. L'AUC est de plus en plus utilisée comme la méthode orthogonale de la SEC dans l'industrie pharmaceutique pour l'étude des agrégats.

- (iv) Par apport aux méthodes séparatives présentées ci-dessus, l'A4F peut séparer les molécules selon une large gamme de taille. Cette technique vise à séparer des molécules par l'application d'un flux laminaire de liquide sur la longueur d'un canal, associé à une force latérale générée par la sortie de liquide à travers un fritté recouvert de la membrane d'ultrafiltration (Bria and Williams, 2016). Cette technique est également de plus en plus appliquée pour la caractérisation de protéine et d'agrégat. Cependant, cette méthode reste difficile à valider et il est donc difficile à l'heure actuelle d'utiliser cette méthode en routine dans le contexte d'un contrôle analytique.

Par ailleurs, d'autres techniques telles que la turbidimétrie, la microscopie à force atomique (AFM), la diffusion des rayons X aux petits angles, la spectrométrie de masse peuvent également être utilisées pour obtenir plus d'informations pour caractériser des agrégats en termes de taille, de charge, de morphologie, de masse moléculaire, de forme, etc. De plus, des méthodes spectroscopiques (IR, Raman, UV-Vis dérivé secondaire, fluorescence, dichroïsme circulaire) sont

également employées pour évaluer la dénaturation de protéine qui est également un autre critère de qualité de protéine thérapeutique.

**Tableau 2.3.3 :** Techniques analytique employées dans l'industrie pour l'analyse d'agrégats de protéines (den Engelsman et al., 2011)

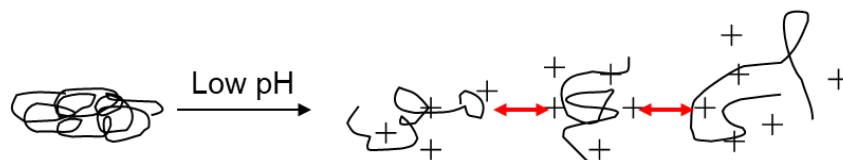
Méthode	Validation	Quantification	Robustesse	Contrôle qualité
Inspection visuelle	Oui	Non	Moyen	Oui
Microscopie optique	Non	Possible	Moyen	Non
Microscopie fluorescence	Non	Non	Faible	Non
Microscopie électronique	Non	Non	Faible	Non
Imagerie de flux	Non	Oui	Faible	Oui
AFM	Non	Non	Moyen	Non
Turbidimétrie	Oui	Non	Elevée	Oui
DLS	Non	Non	Moyen	Non
Obscurcissement de lumière	Oui	Oui	Moyen	Oui
Spectrométrie de masse « native »	Non	Non	Faible	Non
Macro-IMS	Non	Non	Faible	Non
AUC	Non	Oui	Faible	Non
SEC	Oui	Oui	Elevée	Oui
AF4	Oui	Oui	Moyen	Non
SDS-PAGE	Oui	Possible	Moyen	Oui
CE-SDS	Oui	Oui	Moyen	Oui
Spectroscopie UV-Vis	Non	Non	Moyen	Oui
Spectroscopie infrarouge	Non	Non	Moyen	Oui
Spectroscopie Raman	Non	Non	Moyen	Oui
Spectroscopie Fluorescence	Non	Non	Moyen	Non
Spectroscopie de dichroïsme circulaire	Non	Non	Moyen	Non
Spectroscopie RMN	Non	Non	Moyen	Non

En résumé, des méthodes variées sont utilisées pour la détection des agrégats et chaque méthode présente des avantages et inconvénients. Par conséquent, les agrégats de protéines présents dans l'échantillon doivent être caractérisés par un ensemble de méthodes orthogonales. Cependant, toutes ces techniques ne peuvent pas à être appliquées à toutes étapes de développement de la protéine thérapeutique. Stratégiquement, deux niveaux d'analyse sont proposés : (i) analyse initiale avec des méthodes relativement simples, robustes et rapides (telles que SEC, SDS-PAGE / CE-SDS, obscurcissement de la lumière, etc.) ; (b) une analyse plus approfondie, en utilisant des méthodes

moins robustes mais fournissant des informations complémentaires (telles que AUC, AF4, DLS, méthodes de microscopie, etc.) (Tableau 2.3.3) (Den Engelsman et al., 2011). En fonction des objectifs analytiques, un ensemble de méthodes orthogonales peuvent être utilisées pour une caractérisation fine d'agrégats d'Acm thérapeutique (Bansal et al., 2019).

### II.3.3. Spectrométrie de masse en mode natif

La spectrométrie de masse en mode non-dénaturant (native MS) permet d'étudier la structure des protéines dans leur état natif ainsi que les interactions non covalentes protéines-protéines et protéines-ligands (Boeri Erba and Petosa, 2015; Gülbakan et al., 2018; Ishii et al., 2018). Cette technique est basée sur l'ionisation par électronébuliseur dans laquelle les analytes sont pulvérisés à partir d'un solvant non dénaturant (proche de condition physiologique) (Leney and Heck, 2017). Une protéine native a une structure tertiaire / quaternaire compacte, ce qui conduit à une distribution de charge étroite par comparaison à une protéine dénaturée dépliée (unfolded) dont la distribution de charge sera plus importante (Figure 2.3.3).

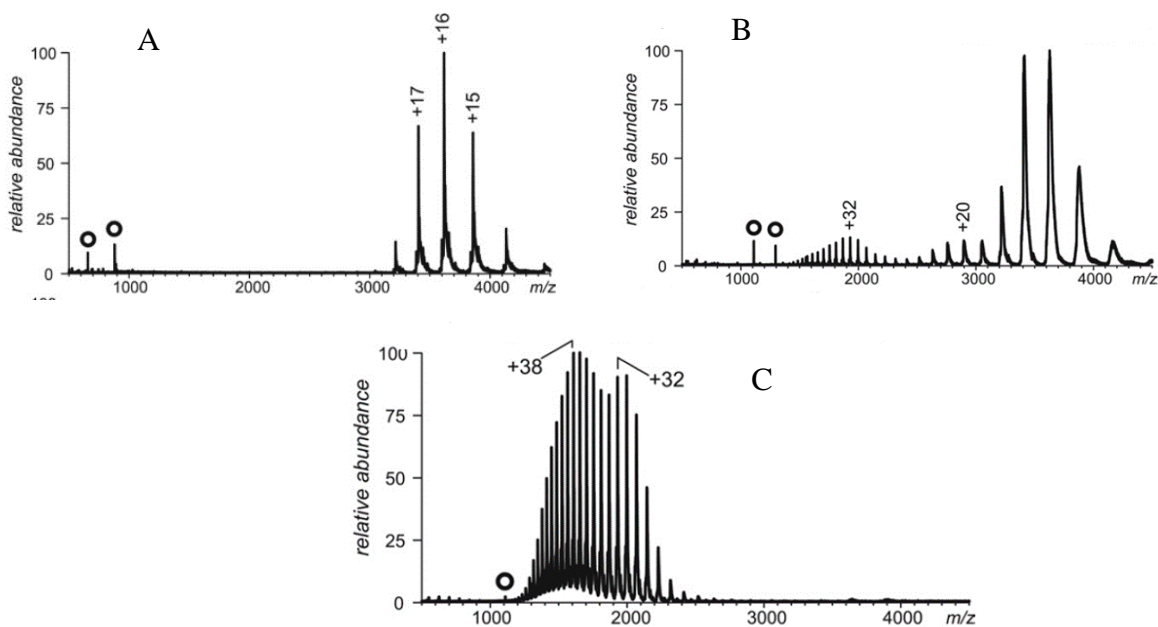


**Figure 2.3.3 :** Représentation schématique des états de charges des protéines à différentes conformations

Aussi, la conformation des protéines peut être déterminée en étudiant ses états de charges par native MS (Heck, 2008). Par exemple, une étude menée par Kaltashov *et al.*, a montré une modification de la distribution de charges de l'antithrombine selon les conditions de solution (58 kDa). Dans un tampon d'acétate d'ammonium (20mM), la structure de l'antithrombine est conservée, conduisant à un spectre de masse avec une enveloppe à faibles charges (14+ à 18+, 3200-4200  $m/z$ ) (Figure 2.3.4 A). Lorsque l'antithrombine est en condition dénaturante (e.g. 20 mM Acétate d'ammonium/méthanol/acide acétique, 49/50/1, v/v/v), plusieurs enveloppes avec des états

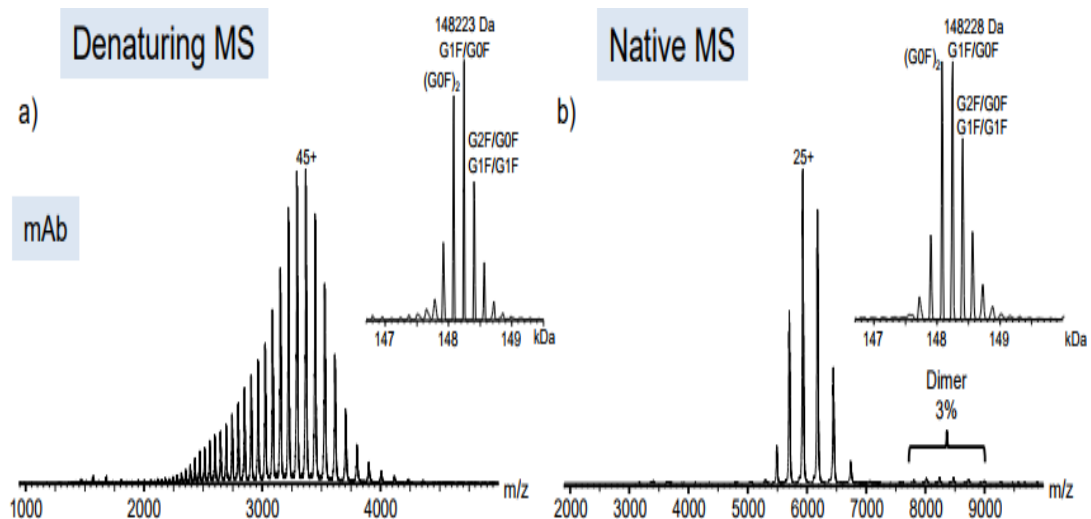


de charges différents sont observées en spectrométrie de masse (Figure 2.3.4 B). Celles-ci correspondent probablement pour la protéine à plusieurs états de dénaturation ( $1500-2500 m/z$  ;  $2500-3200 m/z$ ) et à l'état natif ( $3200-4200 m/z$ ). Avec un plus grand pourcentage d'acide acétique (e.g. 20 mM Acétate d'ammonium/méthanol/acide acétique, 45/50/5, v/v/v), une seule enveloppe avec des charges très élevée ainsi qu'une large distribution à  $2000-3500 m/z$  sont obtenues ce qui probablement correspond à une antithrombine entièrement dépliée (fully unfolded) (Figure 2.3.4 C).



**Figure 2.3.4 :** Spectres de masse d'antithrombine en solution dans ; (A) 20 mM Acétate d'ammonium, (B) 20 mM Acétate d'ammonium/méthanol/acide acétique (49/50/1, v/v/v), (C) 20 mM Acétate d'ammonium/méthanol/acide acétique (45/50/5, v/v/v) (Kaltashov and Abzalimov, 2008)

Dans un autre exemple, le Trastuzumab est analysé dans deux conditions différentes (Figure 2.3.5). Le monomère dans un environnement dénaturant présente une enveloppe avec des charges élevées et de faible rapports masse sur charges ( $2000 - 4000 m/z$ ). En revanche, lorsque l'Acm est analysé en condition native, de faibles états de charges sont observés avec une enveloppe de  $5500$  à  $7000 m/z$ .



**Figure 2.3.5** : Spectre de masse d'un Acm sous différentes conditions ; (A) dénaturantes (20 à 80% ACN) et (B) native utilisant le tampon d'ammonium acétate (Terral et al., 2016)

Plusieurs protocoles ont été proposés pour analyser l'hétérogénéité structurale d'anticorps à l'aide de la native MS (Haberger et al., 2015b; Rosati et al., 2014; Terral et al., 2016). Il est possible d'étudier l'état d'oxydation d'Acm, comme cela a été récemment montré par Haberger *et al.* afin d'évaluer l'effet du stress oxydatif sur la stabilité d'anticorps (Haberger et al., 2015a). La native MS a également été utilisée pour étudier le ratio anticorps-médicaments d'ADC (Chen et al., 2013; Debaene et al., 2014) et pour caractériser la conformation des anticorps (Thompson et al., 2014a). En effet, la spectrométrie de masse en mode native montre un grand potentiel non seulement pour la caractérisation des protéines mais aussi pour le contrôle qualité en permettant la détection de protéines dénaturées. Parmi les méthodes séparatives utilisés en bioanalyse, la CZE et SEC sont les deux techniques compatibles avec un couplage masse en mode natif. De nombreuses études ont été menées pour la détection d'agrégats de protéines (Marie et al., 2016; Muneeruddin et al., 2014), pour la détection des variants de charge (Füssl et al., 2018; Leblanc et al., 2017) ou de taille (Ehkirch et al., 2018a). L'intérêt de la CZE-native MS et SEC-native MS sera discuté plus en détail dans les chapitres suivants de cette thèse.

## II.4. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique séparative de très grande efficacité qui permet de séparer des biomolécules d'un mélange complexe avec une haute résolution. L'EC présente plusieurs avantages tels que : la simplicité d'utilisation, la rapidité d'analyse, la faible consommation de solvant organique, un très faible volume d'échantillon à analyser (nL). L'analyse par EC est appliquée à une large gamme de biomolécules telles que les nucléotides, les peptides et les protéines. Cette méthode séparative couplée à la spectrométrie de masse peut être utilisée dans le contrôle de qualité des produits pharmaceutiques et biotechnologiques (Wenz et al., 2015). Une étude récente effectuée simultanément dans 13 laboratoires indépendants a été réalisée afin d'évaluer la robustesse d'une méthode EC couplée à la spectrométrie de masse dédiée à l'établissement d'une carte peptidique issue d'une digestion tryptique de la BSA. Les résultats obtenus ont montré que l'EC-couplée à la spectrométrie de masse est suffisamment robuste pour permettre l'application de cette méthode dans différents laboratoires.

Selon les types de capillaire et la nature de l'électrolyte utilisé, l'EC peut être divisée en plusieurs techniques comme l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), la focalisation isoélectrique capillaire (cIEF), la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), et l'isotachophorèse (ITP). Dans ce chapitre sera présenté la technique de CZE pour l'analyse de protéines, puis la problématique de l'analyse des protéines et des risques d'adsorption sur la paroi du capillaire sera abordée. Nous présenterons ensuite les stratégies utilisées pour prévenir ces adsorptions dans un contexte de couplage avec la spectrométrie de masse.

### II.4.1. Electrophorèse capillaire de zone pour l'analyse de protéines

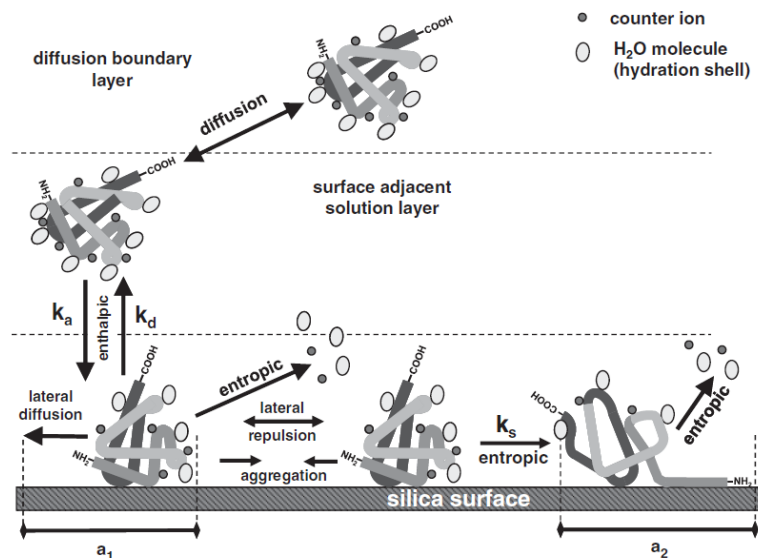
La CZE est la méthode la plus utilisée pour l'analyse des protéines thérapeutiques. La séparation des molécules est basée sur ; (i) le flux électroosmotique (EOF), qui dépend de capillaire et de nature de tampon d'électrolytes (background électrolyte, BGE), et (ii) sur la mobilité électrophorétique

$\mu_{ep}$ , qui dépend du rapport charge sur la taille hydrodynamique de l'analyte. L'EOF est le mouvement de l'électrolyte à travers de capillaire sous un champ électrique. L'EOF est lié à la présence de charges à la surface du capillaire et à leur interaction électrostatique avec les ions de l'électrolyte. Afin d'assurer l'électroneutralité, les cations présents dans l'électrolyte forment une double couche électrique à la surface du capillaire appelée couche d'Helmholtz ou potentiel zêta ( $\zeta$ ). Une part des cations va établir des interactions électrostatiques fortes avec les silanols pour former une couche compacte et immobile, appelée « couche de Stern ». Les autres cations n'interagissant pas directement avec la surface forment une couche diffuse appelée « couche de Gouy-Chapman ». Lors de l'application d'un champ électrique aux extrémités du système, les cations de la couche diffuse Gouy-Chapman migrent vers la cathode. La mobilité électrophorétique ( $\mu_{ep}$ ) est due au déplacement des ions dans le capillaire lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique. Ceux-ci se déplacent vers les électrodes de charges opposées à une vitesse qui dépend de leurs charges et leur rayon hydrodynamique.

De nombreux travaux montrent que son couplage à la MS permet d'obtenir des informations structurales et massiques des protéines analysées. En effet, la CZE couplée à la MS a permis de caractériser la structure de protéines intacts e.g. l'interféron- $\beta$ 1, des Acms intacts (Bush et al., 2016; Han et al., 2016), d'étudier l'hétérogénéité de conformations de protéines intacts (Bertoletti et al., 2016), la séparation et l'identification d'un mélange d'Acms thérapeutiques intactes (Giorgetti et al., 2018), l'étude de glycosylations des protéines (Gennaro and Salas-Solano, 2008; Haselberg et al., 2013), ou l'étude protéomique des anticorps (Belov et al., 2018; Faserl et al., 2017).

#### II.4.2. Phénomène d'adsorption

Un des problèmes majeurs de l'EC est l'adsorption des protéines telles que les anticorps monoclonaux thérapeutiques, sur les parois du capillaire ce qui aura des conséquences sur les performances de séparation. Ceci va conduire à une modification de l'EOF, une asymétrie et un élargissement des pics et donc à une faible reproductibilité ainsi qu'une altération de la résolution (Stutz, 2009). Le phénomène d'adsorption est constitué de deux étapes ; (i) le transport de la protéine à la surface, (ii) l'interaction avec la surface, ce qui va provoquer un réarrangement de la structure de protéine (Figure 2.4.1) (Lucy et al., 2008). Cette adsorption peut être réversible ou irréversible. Elle est liée à plusieurs types d'interactions, telles que ; la liaison d'hydrogène, les forces de Van der Waals, les interactions électrostatiques et hydrophobes (Razunguzwa et al., 2006). Les interactions électrostatiques et hydrophobes sont les principales forces responsables de l'adsorption de la protéine à la surface silice (Attwood et al., 2019; Graf et al., 2005). Les Acms sont des protéines à haut poids moléculaire et multichargées, et tendent d'autant plus à interagir avec les silanols par interactions électrostatiques. Ainsi, une analyse utilisant un tampon à pH neutre ou acide sera préférable pour l'analyse de protéine par CZE et plus particulièrement par CZE-MS. Dans ces conditions, la surface du capillaire sera neutre lorsque le pH du BGE est inférieur au pKa des silanols (pK ~3,0 – 4,0), ou chargée négativement si le pH est supérieur au pKa, des silanols alors que les charges globales des Acms seront positives. C'est pourquoi, les Acms interagissent de manière importante avec les groupes SiO<sup>-</sup> à pH supérieur au pKa silanols mais inférieur au pI des Acms. Cependant, ce phénomène d'adsorption a été observé en utilisant un tampon d'analyse à pH acide ~3,0 – 4,0, et même très acide à base d'acide formique 100 mM (pH~1,7).



**Figure 2.4.1** : Représentation schématique du phénomène d’adsorption de la protéine à une surface (Stutz et al., 2009)

Afin d’éviter l’adsorption des protéines, de nombreuses stratégies ont été utilisées :

- (i) L’utilisation de BGE à très faible pH. Ainsi, les silanols présents à la surface du capillaire seront protonés (donc neutre) et les possibilités pour les protéines d’établir des interactions électrostatiques avec la surface du capillaire seront réduites. A pH élevé, la charge globale de la protéine sera négative. Ainsi, l’adsorption des protéines sur la paroi du capillaire sera diminuée grâce au phénomène de répulsion électrostatique (Huhn et al., 2011). Cependant, il est important de noter que les protéines sont dénaturées aux pH extrêmes.

- (ii) L’utilisation d’un tampon d’analyse à force ionique élevée. Ceci peut permettre de diminuer les interactions des protéines avec la paroi du capillaire, par interactions des co-ions avec la protéine, ce qui va conduire à un phénomène de compétition avec les sites de liaisons présents à la surface du capillaire. Cependant, une augmentation du taux de sels dans le tampon d’analyse peut entraîner une perte de sensibilité de la détection par MS et entraîner un effet Joule, dû à l’augmentation du courant conduisant à une distribution des pics et à une ligne de base instable (Huhn et al., 2010). Il est également possible d’ajouter un agent formant des paires d’ions (e.g. acide trifluoroacétique) avec

les protéines ce qui va réduire le phénomène d'interaction protéines/surfaces en diminuant la charge nette de la protéine par diminution des interactions électrostatiques.

- (iii) L'utilisation de revêtements (coating) pour modifier la surface du capillaire qui est l'approche la plus utilisée à l'heure actuelle. Ceci permet d'éviter efficacement l'adsorption et de moduler le flux électroosmotique du capillaire. (Haselberg et al., 2007; Huhn et al., 2010). Les revêtements diffèrent principalement par leur charge, qui peut être : neutre, cationique ou anionique. De nombreux revêtements ont été développés et ils peuvent être classés en deux catégories (Huhn et al., 2010; Pattky and Huhn, 2013) : le revêtement dynamique, le revêtement statique (covalent et non-covalent ). Un autre avantage du traitement de capillaire est lié au contrôle du flux électroosmotique qui est essentiel pour la répétabilité des analyses. Ainsi, le couplage EC-MS nécessite un EOF qui migre en direction de l'interface EC-MS avec un liquide additionnel « sheath liquid ». En absence d'EOF ou dans le cas où l'EOF migre dans la direction opposée à l'interface, le « sheath liquid » et le gaz de nébulisation peuvent être aspirés dans le capillaire, ce qui va perturber l'analyse (Mokaddem Meriem et al., 2008). Par conséquent, les revêtements chargés permettent de contrôler la direction ou l'intensité de l'EOF, ce qui est primordial en EC-MS. Dans certains cas, par exemple l'analyse d'anions dans un capillaire présentant un revêtement cationique, l'analyse doit être effectuée en utilisant la polarité inverse pour que l'écoulement soit dirigé vers le détecteur. D'autre part, lors d'une analyse avec un capillaire à revêtement neutre tel que PVA, PAA, la EOF est très faible ou nulle, une pression additionnelle est souvent réalisée pour améliorer la séparation et le temps d'analyse.

Aussi dans le chapitre suivant une présentation détaillée des différents types de revêtement va être présentée.

### **II.4.3. Les différents types de revêtements utilisés pour prévenir l'adsorption des protéines en EC**

Comme nous l'avons évoqué précédemment, de nombreux types de revêtements peuvent être utilisés pour prévenir l'adsorption des protéines. Un revêtement doit idéalement satisfaire les critères suivants ;

- Former une couche homogène pour permettre une couverture complète de la surface de la silice.
- Le revêtement doit être le plus stable possible.
- L'adsorption de la protéine doit être minimisée de manière significative.

#### **II.4.3.1. Le revêtement dynamique**

Les revêtements dynamiques sont présents dans le tampon d'analyse. Une grande diversité de composés peut être utilisée, tels que les polyamines, tensioactifs ou des polysaccharides comme la cellulose, etc. (Lucy et al., 2008; Rodriguez and Li, 1999). Les revêtements dynamiques sont faciles d'utilisation et peu coûteux. La régénération de la surface peut être effectuée efficacement après chaque analyse ce qui permet d'avoir une bonne reproductibilité. Toutefois, ces additifs peuvent interagir avec les analytes et impacter la performance de séparation en EC. De plus, cette approche n'est pas compatible avec la MS car une suppression d'ions et une contamination de la source d'ionisation peut se produire.

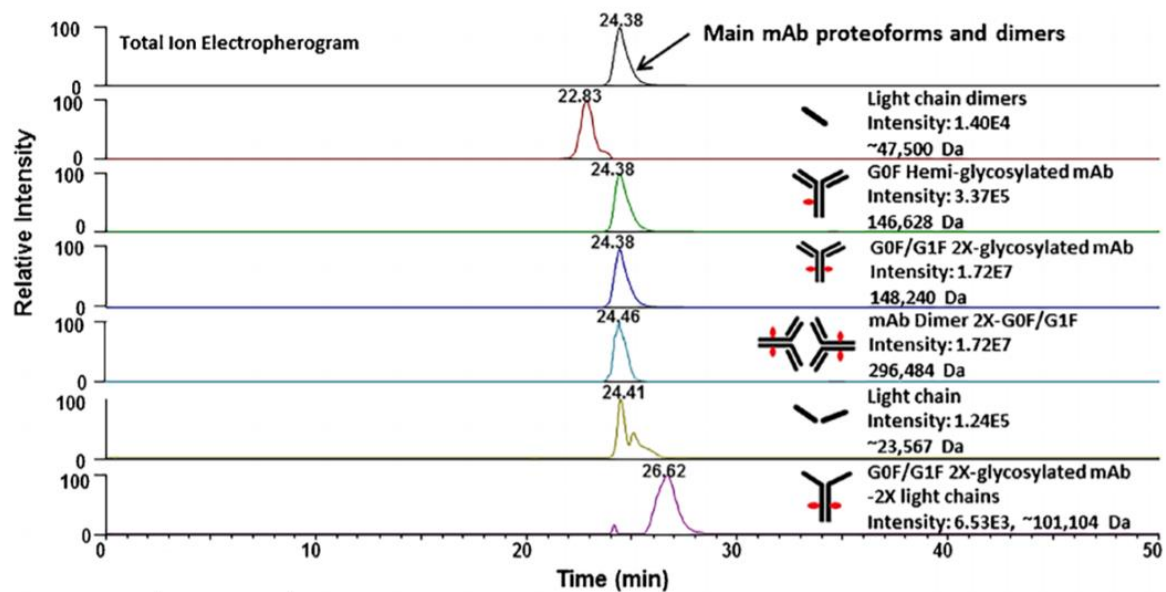
#### **II.4.3.2. Les revêtements statiques**

- *Revêtements statiques covalents*

Ces revêtements sont constitués de polymères liés de manière covalente aux groupements silanes. Bien que la préparation de ce type de revêtement soit longue (e.g. 35h), et nécessite un grand nombre d'étapes, ceux-ci présentent l'avantage d'être très stables, de pouvoir être utilisés pour un



grand nombre d'analyse et d'être compatible avec la spectrométrie de masse. Ceux-ci ne présentent que très peu de risque de contaminations pour les analyses EC-MS. Ces revêtements covalents sont pour la plupart neutres (e.g. Poly vinyl alcohol (PVA), PAA). Ceux-ci ont été utilisés avec succès pour l'analyse par EC-MS des Acms ; le trastuzumab (Belov et al., 2017) (Figure 2.4.2) et l'ustekinumab (Haselberg et al., 2018). Cependant, Bush *et al.*, ont utilisé un revêtement PEI greffé de manière covalente au capillaire pour analyser par EC-MS l'interféron  $\beta$ 1 (Bush et al., 2016).

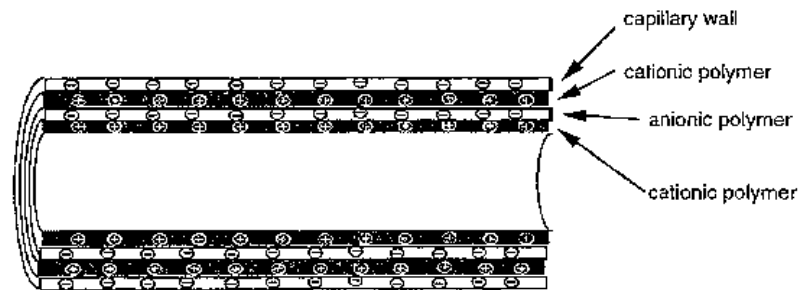


**Figure 2.4.2 :** Electrophérogrammes d'une analyse de Trastuzumab par CE-MS utilisant un capillaire avec un revêtement PAA (Belov et al., 2017)

- *Revêtement statique non-covalent*

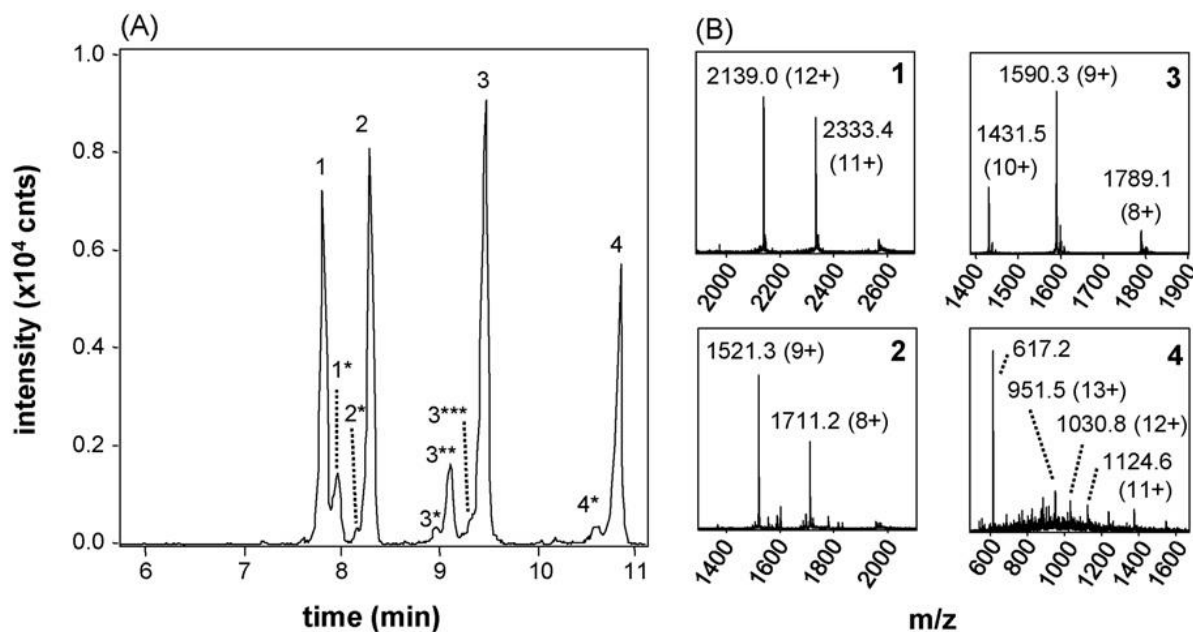
Ces revêtements sont adsorbés de manière statique sur la paroi du capillaire. Ils constituent un compromis entre le revêtement dynamique et le revêtement statique covalent. Ceux-ci sont incorporés dans le capillaire durant l'étape de rinçage. Ils sont constitués de polymères de hauts poids moléculaires composés d'un squelette à base de polyacrylamide ou de polymères comportant des groupements amines cationiques (e.g. polybrene) permettant l'établissement d'interactions électrostatique avec les silanols. Les avantages de ces revêtements sont qu'ils sont faciles d'utilisation, et peuvent être régénérés rapidement. Le polybrene a permis notamment d'analyser un mélange de 4 anticorps thérapeutiques par EC (Bevacizumab, Trastuzumab, Rituximab et

Cetuximab) (Jaccoulet et al., 2015). La stabilité de ce type de revêtement peut être considérablement augmentée en réalisant une superposition de couches de polymères de charges opposées (SMIL, Successive Multiple Ionic-polymer Layers) (Katayama et al., 1998) (Figure 2.4.3).



**Figure 2.4.3** : Représentation schématique d'un capillaire SMIL (Katayama et al., 1998)

Ainsi, un SMIL à base de Polybrene (+), Dextran Sulfate (-) et Polybrene (+) (PB-DS-PB) a été développé par Katayama et été employé pour la séparation des acides aminées et l'analyse de protéines acides comme l' $\alpha$ -lactalbumine, ou la serine protéase inhibitrice de trypsine (trypsine inhibitor). Ce SMIL a démontré plusieurs avantages par rapport aux monocouches telles que : l'amélioration de la stabilité et de l'efficacité de séparation. Ces capillaires de type SMIL ont permis une séparation et une analyse efficace des protéines basiques (e.g.  $\alpha$ -chymotrypsinogène, cytochrome c, ribonucléase A et lysozyme) par EC et CZE-MS (Graul and Schlenoff, 1999; Haselberg et al., 2010, 2009) (Figure 2.4.4).



**Figure 2.4.4 :** (A) L'analyse d'un mélange de (1)  $\alpha$ -chymotrypsinogène A, (2) de ribonucléase A, (3) de lysozyme et de (4) cytochrome C par CE-MS en utilisant un capillaire SMIL de PB-DS-PB, (B) Spectres de masse obtenus pour les pics 1, 2, 3 et 4, respectivement (Haselberg et al., 2010)

Récemment, un SMIL innovant à 5 couches a été appliqué avec succès pour l'analyse de protéines par EC (Bekri et al., 2015; Leclercq et al., 2019). La capacité de plusieurs types de SMIL composés de 5 couches de polyanions (e.g. poly (acide l-glutamique), poly (acide acrylique), acide hyaluronique, sulfate de dextran, etc.) et de polycations ((e.g. poly (l-lysine), polybrenne, diéthylaminoéthyle dextrane, polyallylamine, polyéthylèneimine, etc.) avec des combinaisons différentes, à séparer un mélange de protéines (lysozyme,  $\beta$ -lactoglobuline, RNase A, inhibiteur de la myoglobine et inhibiteur de la trypsine) a été évalué. Les auteurs ont montré que le choix du polycation et du polyanion constituant respectivement la dernière et l'avant dernière couche jouent un rôle prépondérant dans les performances de séparation de ce mélange de 5 protéines. La compatibilité de ces SMILs à 5 couches avec la SM a été très récemment démontrée (Leclercq et al., 2019).

En conclusion, l'EC est une méthode séparative à haute résolution qui est largement utilisé pour l'analyse et la caractérisation de protéines et d'Acms (Fekete et al., 2016). Cependant, l'adsorption des Acms sur la paroi du capillaire reste un problème majeur pour leur analyse. C'est pourquoi de

nombreux revêtements sont proposés pour limiter ce phénomène d'adsorption. Pour les Acms, par exemple, les revêtements cationiques tels que le PEI ou le polybrene sont particulièrement intéressants car ils minimisent efficacement leur adsorption par répulsion électrostatique quand leur charge globale est positive (Gassner et al., 2013; Jaccoulet et al., 2015). Des protéines thérapeutiques comme l'interféron- $\beta$ 1 et les Acms, ont été analysés à par EC-MS en utilisant un revêtement cationique PEI (Bush et al., 2016; Giorgetti et al., 2018). D'autres travaux font état de l'utilisation de capillaires polymériques neutres (e.g. l'hydroxypropylcellulose, PVA) pour l'analyse de protéines par CZE (Gassner et al., 2013; Lucy et al., 2008; Stutz, 2009). Plus récemment les analyses d'Acms par EC-MS ont été réalisées en utilisant un revêtement neutre de polyacrylamide (PAA) (Belov et al., 2017; Haselberg et al., 2018). Donc, dans le contexte d'un couplage de l'EC avec la MS, des revêtements statiques, SMILs ou covalents, sont les plus adaptés. Récemment des revêtements à base de copolymères ont également été proposés (Sola and Chiari, 2012). Nous reviendrons dans la partie expérimentale sur ces nouveaux revêtements. Une approche alternative basée sur l'ECxEC bidimensionnelle couplée à la MS a récemment été proposée pour caractériser les variants de charge d'Acm (Jooß et al., 2017). Cette approche permet d'obtenir à la fois une meilleure séparation électrophorétique avec la première séparation EC et permet d'améliorer avec la seconde dimension des informations caractéristiques avec la MS. Ceci pourrait élargir l'application de la méthode CE-MS dans l'analyse et caractérisation de protéines.

## II.5. Chromatographie d'exclusion stérique

### II.5.1. Chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse de Acms

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une méthode de référence pour la caractérisation des Acms qui permet notamment la détection de la présence d'éventuels agrégats de petites tailles (Fekete et al., 2014; Hong et al., 2012). La SEC permet également une analyse des protéines dans des conditions non-dénaturantes limitant ainsi l'impact sur la conformation de la protéine. Actuellement, la SEC est largement utilisée pour la purification des Acms et pour leur séparation en trois espèces majeures, les espèces de haut poids moléculaire (High molecular weight species, HMWS) (e.g. petits agrégats tels que les dimères et trimère), la protéine sous sa forme monomérique, et des espèces de faibles poids moléculaire (Low molecular weight species, LMWS) tels que les fragments. Ceci permet d'utiliser la SEC pour analyser des échantillons stressés contenant potentiellement des petits agrégats (Ahrrer et al., 2003; Diederich et al., 2011, Goyon et al., 2017d, 2017c, Hernandez-Jimenez 2018, Duivelshof et al., 2019). La SEC est également employée pour réaliser des études de stabilité d'Acms comme d'autres méthodes chromatographiques (RP, EIC, HIC) (Hernández-Jiménez et al., 2018; Telikepalli et al., 2015; Vieillard et al., 2017). La caractérisation des Acms ainsi que des ADC est de plus en plus réalisée par SEC couplée à spectrométrie de masse native (native-MS) qui est considérée comme un mode non dénaturant (Thompson et al., 2014b; Tassi et al., 2018; Ehkirch et al., 2018b; Woodard et al., 2013a). Celle-ci a également été employée pour étudier les interactions de protéine-antigène (Ren et al., 2018) ainsi que la stabilité des Acms (Woodard et al., 2013b).

La SEC sépare les protéines en fonction de leur rayon hydrodynamique (rayon Stokes) dans la solution. Dans le mécanisme de SEC, la partition est régie, idéalement, par processus entropique sans phénomène adsorption entre les molécules et la phase stationnaire. Ce processus chromatographique peut être décrit par l'équation suivant :

$$\ln K_D = -\frac{\Delta S^0}{R}$$

$K_D$  est le facteur de rétention thermodynamique,  $\Delta S^0$  est la variation de l'entropie et  $R$  est la constante des gaz parfaits.

Le volume total  $V_0$  de phase mobile dans la colonne peut être décomposé en deux parties : le volume interstitiel  $V_i$  (porosité interstitielle) et le volume  $V_p$  des pores (porosité des particules).  $V_i$  représente le volume de phase mobile nécessaire pour transporter une grosse molécule supposée exclue des pores ;  $V_0$  ( $V_i + V_p$ ) correspond au volume nécessaire pour exclure une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores. Les volumes d'élution  $V_e$  sont donc compris entre  $V_i$  et  $V_m$ . Pour cela,

$$V_e = K_D \times V_i + V_p$$

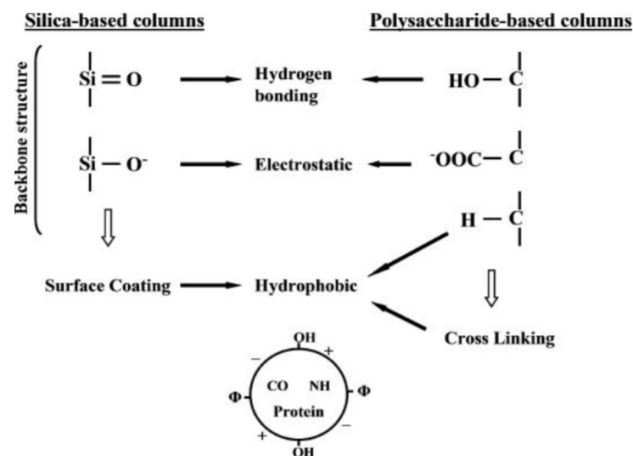
Lorsque  $V_e/V_0$  dépasse 1, le comportement des molécules ne suit plus non seulement le mécanisme d'exclusion stérique, mais il y a également des interactions physicochimiques avec la phase stationnaire

La séparation des analytes de masses moléculaires différentes permet d'établir une courbe de calibration qui permettra d'estimer la masse moléculaire de la protéine à caractériser. Dans la région linéaire de la courbe de  $\log MW$  en fonction du  $V_e$ , on obtient une meilleure résolution et une masse exacte. La pente de la courbe dans la partie linéaire est une mesure de la sélectivité de la phase stationnaire, qui est définie par la relation suivante :

$$\log M = m K_D + b$$

Cependant, lors de l'analyse des protéines par SEC, la protéine a tendance à interagir avec la phase stationnaire principalement selon deux types d'interactions : électrostatiques et hydrophobes (Figure 2.5.1). Ces interactions entraînent une modification du temps d'élution et peuvent altérer la conformation de la protéine et conduire à une asymétrie de pic très importante. Les interactions

électrostatiques sont responsables de deux phénomènes ; une élution plus rapide lorsqu'il y a répulsion électrostatique empêchant l'Acm de diffuser dans le pore, ou une augmentation du temps de rétention lorsque la protéine établit avec la phase stationnaire des interactions électrostatiques. Pour prévenir ces phénomènes d'adsorption des protéines ou des agrégats de protéines sur la phase stationnaire, l'optimisation de la phase mobile est primordiale.



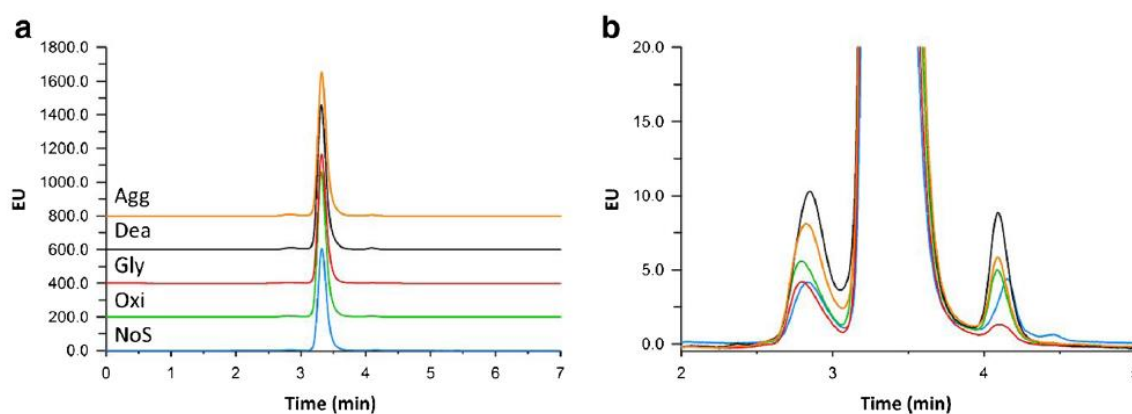
**Figure 2.5.1 :** Groupes chimiques présents à la surface des phases stationnaires responsables du phénomène d'adsorption des protéines (Arakawa et al., 2010).

### II.5.1.1. Importance de la composition de la phase mobile

L'approche la plus utilisée pour réduire les interactions électrostatiques, est d'augmenter la force ionique de la phase mobile ou la concentration de sels. Idéalement, le pH de la phase mobile doit être proche du pI de la protéine, avec une force ionique de 50 à 200 mM, dans laquelle la protéine est soluble et stable (Fekete et al., 2014). La phase mobile la plus utilisée est composée de tampon phosphate de 10 à 200 mM avec un pH compris entre 6,0 et 7,2. Le NaCl (e.g.  $\geq 100$  mM) peut-être rajouté dans la phase mobile pour réduire les interactions électrostatiques des protéines avec la phase stationnaire (Arakawa et al., 2010, Kamberi et al., 2004). Cette approche a été employé avec succès pour l'analyse d'Acm utilisant différents types de colonnes à base de silice telles que la TSKgel UP-SW3000 (Tosoh), l'acquity BEH 200 (Waters), et l'AdvanceBio SEC (Agilent). Néanmoins, une augmentation importante de phosphate ou de NaCl peut entrainer un effet de

« salting-out » ce qui favorise l'adsorption de protéine à la surface stationnaire par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes (Arakawa et al., 2010). Ainsi, dans une étude réalisée par Kamberi *et al.* portant sur la détection des agrégats d'hormone parathyroïdienne, un recouvrement de 78,2% des agrégats a été obtenu lorsque le NaCl à la concentration de 100 mM a été ajouté (phase mobile 0,1% TFA). En revanche, à la concentration de 600mM de NaCl aucun agrégat n'a été détecté (Kamberi et al., 2004). L'hypothèse d'une augmentation des interactions hydrophobes entre les agrégats et la phase stationnaire a été proposée pour expliquer ce phénomène. Récemment, Goyon *et al.* a démontré qu'une phase mobile utilisant le sel de potassium (e.g. KCl) était plus efficace que le sel de sodium pour réduire les interactions secondaires possibles entre les dimères d'anticorps-phase stationnaire ainsi que pour réduire les interactions protéines-sels (Goyon et al., 2017b). Ceci a été démontré en utilisant 1 ADC (Trstuzumab-emasine) et 3 Acms (le rituximab, le panitumab et l'ipilimumab)

Plus récemment, le daratumumab (intact et stressé) a été analysé à l'aide d'une colonne à base de particule de silice (advance BioSEC, 300 A, dp 2.7 µm, 4,6 x 150 mm) en utilisant une phase mobile composée de 50 mM de phosphate de potassium et de 250 mM de KCl (pH 6.8) (Figure 2.5.2) (Duivelshof et al., 2019).

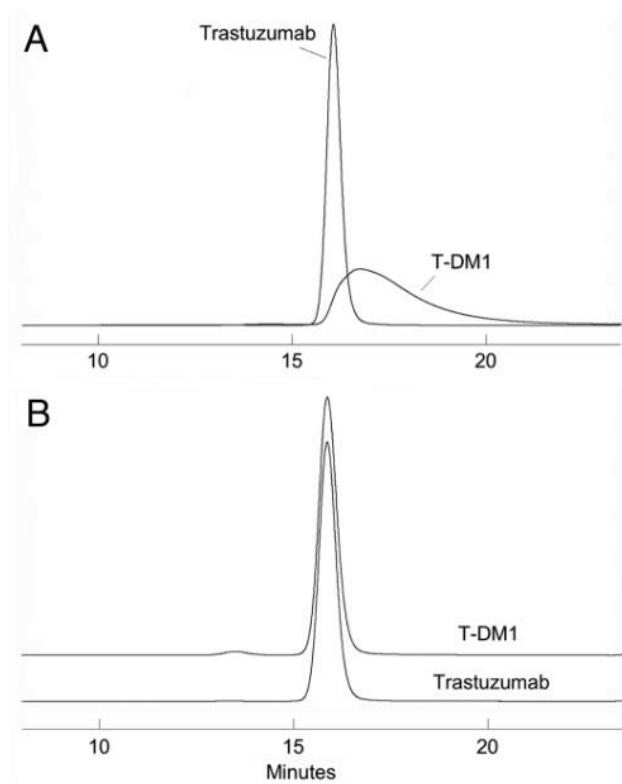


**Figure 2.5.2 :** Analyse SEC-UV ( $\lambda = 280$  nm) de daratumumab, (a) intact (bleu), oxydé (vert), glycosylé (rouge) deamidés (noir) et agrégés (orange). (b) zoom du chromatogramme. (Duivelshof et al., 2019)



Les interactions secondaires indésirables en SEC, peuvent également être réduites en ajoutant dans la phase mobile des additifs tels que l'arginine. L'arginine se lie à la protéine et par conséquent, réduit les interactions de la protéine avec la phase stationnaire ce qui entraîne une amélioration de la forme des pics des agrégats de protéines. Ceci a été démontré lors de l'analyse de protéines telles que des Acm murins, l'activine humaine recombinante ou l'IL-6 (Ejima et al., 2005; Yumioka et al., 2010). D'autres acides aminés, la glycine ou l'alanine peuvent également être utilisés pour limiter ces interactions (Goyon et al., 2018).

Pour prévenir les interactions hydrophobes, des solvants organiques tels que l'isopropanol (IPA), le méthanol (MeOH) ou l'acétonitrile (ACN) peuvent être ajoutés dans la phase mobile. Le pourcentage de solvants organiques dans la phase mobile varie généralement entre 5-10% (Fekete et al., 2014). Ainsi, l'ACN à 10% a été utilisé pour augmenter la performance de la SEC pour la détection des agrégats d'hormone parathyroïde (Kamberi et al., 2004). Dans l'exemple présenté ci-après, une phase mobile (0.2 KPI/0.25 M KCl, pH 6,95) à laquelle est ajouté 15 % de 2-propanol a permis d'améliorer l'efficacité du pic d'un anticorps conjugué, le trastuzumab-emtansine (T-DM1) (Figure 2.5.3) (Wakankar et al., 2011).



**Figure 2.5.3** : Analyse du trastuzumab et du trastuzumab-émétasine par SEC-UV ( $\lambda = 280$  nm) : (A) Phase mobile (0.2 M KPi/0.25 M KCl, pH 6.95), (B) 15% 2-propanol (Wakankar et al., 2011)

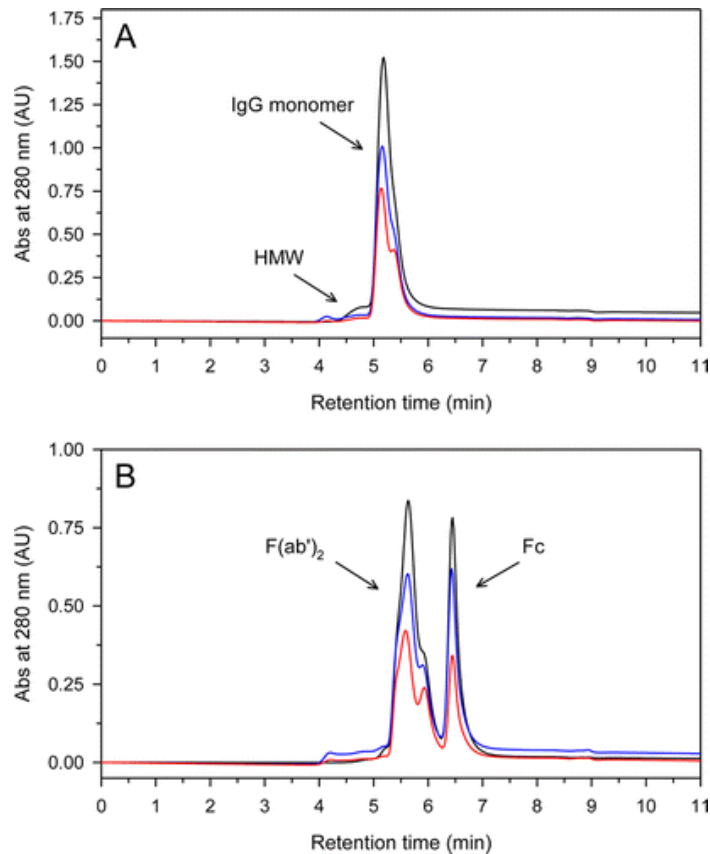
Cependant, une augmentation importante de la proportion de solvant organique dans la phase mobile peut provoquer une altération structurale de la protéine ainsi qu'une dissociation des interactions non covalente pouvant conduire à une sous-estimation du taux d'oligomères dans l'échantillon analysé. De plus, une contrepression plus importante à cause de l'augmentation de la viscosité de la phase mobile peut également être observée (Goyon et al., 2017a).

### II.5.1.2. Phases stationnaires

Les premières phases stationnaires proposées pour la SEC étaient auparavant à base de particules de dextran, de gels de polyacrylamide ou de polystyrène-divinylbenzène (Bouvier and Koza, 2014). Cependant, ce type de phases stationnaires présentait une faible stabilité mécanique. C'est pourquoi, des phases stationnaires à base de silice ont ensuite été préférées. Celles-ci permettent des séparations sous plus haute pression et peuvent être employées avec une plus grande variété de phases mobiles. En ce qui concerne les protéines, les phases stationnaires à base de

particules de gel de silices poreuses sont les plus adaptées. Cependant, les protéines sont susceptibles d'établir des interactions électrostatiques avec les silanols. Aussi, les silanols peuvent être substitués notamment par des silanes (Engelhardt and Ahr, 1981). Les plus fréquents sont des groupements silanols substitués par les groupes 1,2-propanediol qui rendent la surface plus hydrophile. Ce sont les colonnes SEC les plus utilisées pour l'analyse de protéines et de leurs agrégats (Brusotti et al., 2017). Les colonnes à base de silice non substituées peuvent également être employées. Cependant, leur utilisation n'est pas recommandée lors que des phases mobiles aqueuses sont utilisées pour l'analyse comme c'est le cas pour les Acms.

Plus récemment des colonnes à ponts d'éthylène hybride organique – inorganique (BEH) ont été proposées. Celles-ci sont constituées de silice et d'organosiloxanes qui forment des polymers poly-ethoxyoligosilane. Celles-ci présentent une meilleure stabilité chimique ainsi qu'une réduction de l'activité des silanols résiduels (Fekete et al., 2014; Howard G. Barth, 2012). Cette colonne a permis l'analyse par SEC-UV d'un mélange d'IgG (IgG 1 et IgG 2) modèles, intacts, soumises à un stress (agitation), ou digérées par l'IdeS (Figure 2.5.4) (Woodard et al., 2013b).



**Figure 2.5.4** : Analyse par SEC-UV d'un mélange d'anticorps (A) intacts (noir), et après 1h (bleu), 4h (rouge) d'agitation et après digestion par IdeS. Conditions d'analyse : BEH200 SEC (1.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm). Phase mobile 25 mM acétate d'ammonium, 5 % ACN, pH 5,2 (Woodard et al., 2013b)

Un autre paramètre important pour améliorer l'efficacité des séparations est la porosité des colonnes qui, à l'heure actuelle, peut-être augmentée jusqu'à (80-90%). La taille des pores dans les particules est également importante en SEC. Pour la caractérisation des protéines le diamètre des pores doit être compris, entre 150 – 500 Å, ce qui permet d'analyser des biomolécules de quelques kDa à plus de 1000 kDa donc la séparation des monomères des petits agrégats aux stades précoces. Par exemple, une colonne BioSec Agilent 3 – 300 Å peut être utilisée pour analyser des protéines de masses molaires allant de 5 à 1250 kDa. Ainsi, une colonne BEH SEC dont les particules présentent des pores de 450 Å a la capacité d'analyser des protéines de 100 kDa à 1500 kDa, ce qui rend la colonne adaptée pour séparer des agrégats et de la forme monomérique d'une protéine.

Concernant le diamètre des particules, des colonnes constituées de particules de 5 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre ont très longtemps été utilisées en SEC jusque dans les années 2000. Actuellement, pour la plupart, les fournisseurs proposent des particules de 2.7 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre (e.g. BioSec 3 $\mu\text{m}$ , Agilent) ou même inférieurs à 2  $\mu\text{m}$  (e.g. BEH200 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters ; TSKgel UP-SW3000 2,0  $\mu\text{m}$ , TOSOH, Yarra X-150 1,8  $\mu\text{m}$ , Phenomenex). Ces nouvelles générations de colonne SEC permettent de réduire la hauteur équivalente en plateau théorique (HEPT), et par conséquent, d'améliorer significativement la performance de séparation et de réduire le temps d'analyse (Goyon et al., 2017a). Néanmoins, la contrepression est également plus importante, pouvant provoquer la production d'artéfacts lors de l'analyse des agrégats de protéines (Fekete et al., 2013). Ces colonnes dont le diamètre des particules est inférieur à 3  $\mu\text{m}$ , sont également de dimensions réduites (4.6 mm x 150 mm) par comparaison avec des colonnes de SEC conventionnelles (7.8 mm x 300 mm). Il a été montré qu'elles permettent en UHPLC une analyse plus efficace d'Acms.

### **II.5.1.3. Détection**

Le mode de détection couplé à la SEC pour l'analyse des protéines le plus utilisé est la détection UV. Les longueurs d'onde de 210, 214 ou 220 nm sont utilisées pour mesurer l'absorbance des liaisons peptidiques, tandis que celles de 270, 275 et 280 nm mesurent spécifiquement l'absorbance des acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine). Concernant la détection des protéines, notamment les Acms, la longueur d'onde la plus couramment utilisées est 280 nm (Figure 2.5.3)

La détection par fluorescence, permet d'améliorer la sensibilité et la sélectivité en utilisant la fluorescence intrinsèque de la protéine (Diress et al., 2010). La fluorescence des protéines est généralement observée à une longueur d'onde d'excitation de 280 nm à 295 nm avec une émission maximale entre 300 et 370 nm. Elle est principalement liée au tryptophane. L'émission maximum va dépendre de la conformation de la protéine et des propriétés physico-chimiques de la phase

mobile. La protéine peut être également marquée par un fluorophore, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse (Fekete et al., 2014).

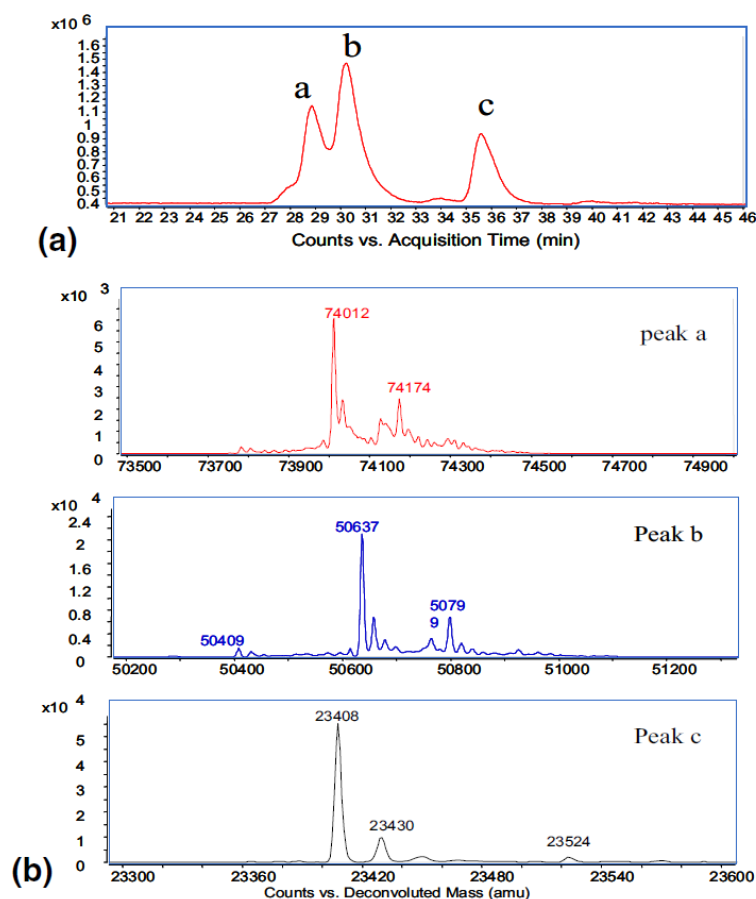
D'autres travaux ont montré l'intérêt du couplage de la SEC avec une détection basée sur la diffusion de la lumière émise par un laser (Multi angle light scattering ou MALS) pour la caractérisation de protéines ou de petits agrégats. La détection de type MALS est largement utilisée pour déterminer l'homogénéité, la stœchiométrie et la masse moléculaire de complexes protéiques. Un couplage de la SEC avec une détection MALS peut fournir des informations sur la forme, la taille et la polydispersité des protéines après leur séparation dans la colonne (Wen et al., 1996; Ye, 2006). De plus, la mesure de la masse moléculaire par MALS est indépendante du temps d'élution ce qui permet d'éviter des erreurs d'interprétation quand par exemple les protéines sont glycosylées. Ce couplage, SEC-MALS a été employé pour identifier et quantifier des protéines (e.g.  $\beta$ -lactoglobuline,  $\alpha$ -lactalbumine, BSA) (Wang and Lucey, 2003). Cette méthode a également été utilisée pour caractériser un anticorps thérapeutique le bevacizumab soumis à un stress (agitation). (Hartmann et al., 2004a; Oliva et al., 2014). D'autres expériences, ont montré que des espèces de haut poids moléculaires constituées de deux IgG4 (2 isoformes, mAb A et mAb B) ont ainsi été isolées par une SEC semi-préparative après concentration par ultra filtration. Le couplage avec une détection MALS a permis de montrer la formation d'isoformes de hauts poids moléculaires, i.e. dimère et 1,7mers pour le mAbA et dimère et tétramère pour le mAbB (Doss et al., 2019).

D'autres auteurs ont montré que la SEC-MALS pouvait être combinée avec autres détecteurs ; à réfractomètre, mesurant l'indice de réfraction (IR), ultraviolet (UV) et viscosimètre (IV) permettant ainsi une caractérisation précise et complète des IgGs (e.g. la concentration, la masse moléculaire, la taille hydrodynamique, etc.) (Hartmann et al., 2004b).

## II.5.2. Couplage SEC-MS et SEC-IMS-MS

La spectrométrie de masse (MS) présente un grand intérêt car elle permet d'obtenir des informations sur la masse moléculaire de la protéine ainsi que sur la conformation tridimensionnelle de la protéine notamment en mode « natif » (Leney and Heck, 2017). Cependant, il est difficile de coupler la SEC avec ESI-MS en utilisant des phases mobiles conventionnelles en raison de leurs concentrations élevées en sels non-volatils (e.g. phosphate, sodium, potassium, etc.). Celles-ci vont entraîner une suppression d'ions et contaminer la source d'ionisation ESI. C'est pourquoi, une phase mobile à pH acide utilisant l'acide formique ou l'acide acétique qui sont volatils doit être utilisée pour l'analyse d'anticorps monoclonaux par spectrométrie de masse. Des travaux ont montré que l'on pouvait analyser des anticorps monoclonaux modèles par approche top-down MS traditionnel en mode dénaturant (Figure 2.5.5) (Lazar et al., 2005; Liu et al., 2009).

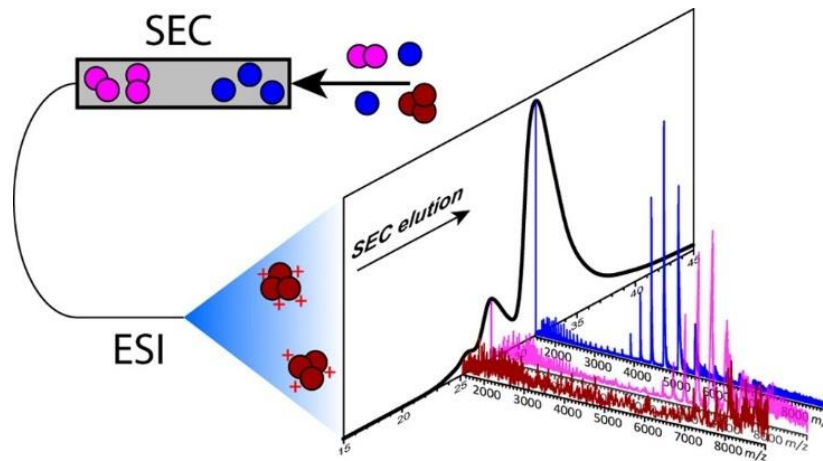
Cependant, la phase mobile à pH très acide va altérer la conformation de l'anticorps ainsi que l'intégrité de la phase stationnaire. C'est pourquoi, l'utilisation d'une phase mobile à pH neutre serait préférable car cela préviendrait la dénaturation des protéines analysées, notamment pour l'approche native-MS (mode dit non-dénaturant). Or les sels volatils tels que le formiate d'ammonium, l'acétate d'ammonium, le bicarbonate d'ammonium ou la triméthylamine à des forces ioniques compatibles avec la MS exercent difficilement leur pouvoir tampon à pH neutre compte tenu de leur pKa (3,75 ; 4,76 et 11,01 pour l'acide formique, l'acide acétique et triméthylamine, respectivement). Le bicarbonate d'ammonium (pKa 6,35) semble être le composé le plus adapté pour l'obtention d'un tampon à pH neutre, toutefois, il a été montré que le bicarbonate d'ammonium provoquait une dénaturation artificielle des Acms pendant l'ionisation ESI (Hedges et al., 2013).



**Figure 2.5.5 :** Analyse par SEC-MS d'anticorps stressés antibody-A. (a) Total ion current de l'anticorps après une incubation à pH 10, 40 °C pendant 5 jours. (b) spectromètre de masse déconvolué des pics a, b et c. (Liu et al., 2009)

Des travaux ont montré que l'approche SEC-native MS est une technique performante pour étudier les conformations de protéines, non dénaturées ou dénaturées par exemple. La MS couplée à la SEC fournit une 2<sup>e</sup> dimension de séparation qui permet d'obtenir non seulement des informations sur le temps de rétention, mais aussi la distribution de charges (Figure 2.5.6). Cette approche a également permis de montrer la formation d'oligomères. Ainsi, des travaux réalisés par SEC couplée à la native MS ont montré qu'il était possible de détecter dans une solution de BSA la présence de monomères, dimères et trimères ainsi que la présence de monomères partiellement dénaturés (Muneeruddin et al., 2014).





**Figure 2.5.6 :** Représentation schématique du couplage SEC-native MS (Muneeruddin et al., 2014)

La SEC-MS a également été employée pour étudier la cinétique d'interaction entre une protéine et une petite molécule (e.g. anhydrase carbonique et acétazolamide) (Bao et al., 2014) ou l'affinité de protéine-ligand (e.g. Indoleamine 2,3-dioxygénase et ses ligands) (Ren et al., 2018). Cependant, d'une part, la SEC-native MS, du fait notamment de l'utilisation de sels volatils et de l'analyse des protéines à des pH proche de 7,0 présente une sensibilité plus faible par rapport à une méthode conventionnelle ESI-MS en raison de l'ionisation moins importante. D'autre part, Goyon et al. a démontré que la performance de l'analyse (e.g. forme du pic chromatographique) était impactée lors de l'utilisation de la phase mobile volatile d'acétate ammonium 100 mM (Goyon et al., 2017d). En effet, il a observé que le pic principal correspondant à l'anticorps monomérique est asymétrique lorsqu'il est analysé à l'aide d'une phase mobile volatile par rapport à une phase mobile utilisant un tampon phosphate. De plus, il est important de noter que les agrégats d'anticorps ont une tendance plus importante à interagir avec la surface stationnaire par rapport aux monomères. Ceci peut entraîner une sous-estimation de la concentration d'agrégats à cause de l'adsorption d'agrégats à la surface stationnaire.

Différentes approches ont été proposées pour s'affranchir des inconvénients présentés ci-dessus par la SEC-MS. Plusieurs méthodes ont été proposées telles que la SEC couplée hors ligne à la spectrométrie de masse (Haberger et al., 2015b; Kükler et al., 2010) ou la SEC bidimensionnelle

(SEC x SEC) (Ehkirch et al., 2018a). En effet, dans une première dimension, la SEC conventionnelle utilisant une phase mobile non volatile permet d'avoir une bonne performance dans la séparation de protéines. Dans la deuxième dimension, la SEC utilisant une phase mobile volatile permet d'effectuer un dessalage préalable avant l'analyse MS. En conséquence, le couplage bidimensionnel de ces 2 techniques a permis une quantification et une caractérisation d'Acms thérapeutiques soumis à un stress.

En ce qui concerne le couplage de la SEC avec la mobilité ionique (IMS), le potentiel de cette méthode a été montré dans l'analyse des d'Acms intacts (Ehkirch et al., 2018b; Ren et al., 2018). En effet, celle-ci a permis d'obtenir des informations structurales tels que les variants de tailles d'Adalimumab (Ehkirch et al., 2018a).

En conclusion, la méthode SEC est une méthode de choix pour l'analyse des anticorps. Elle a été l'objet de nombreux développements portant sur la phase stationnaire. Le couplage SEC-UHPLC a permis d'augmenter l'efficacité des analyses d'Acms. Cette technique présente l'avantage de pouvoir être couplée à plusieurs mode de détection, UV, fluorescence, MALS, par exemple. Le couplage SEC- « native MS » permet d'apporter des informations quant à la conformation de l'Acm.

## Références de la partie bibliographique

- Ahrer, K., Buchacher, A., Iberer, G., Josic, D., Jungbauer, A., 2003. Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size-exclusion chromatography, static and dynamic light scattering. *Journal of Chromatography A*, 22nd International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides 1009, 89–96. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00433-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00433-3)
- Andya, J.D., Hsu, C.C., Shire, S.J., 2003. Mechanisms of aggregate formation and carbohydrate excipient stabilization of lyophilized humanized monoclonal antibody formulations. *AAPS PharmSci* 5, E10. <https://doi.org/10.1208/ps050210>
- Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US [WWW Document], 2019. . The Antibody Society. URL <https://www.antibodysociety.org/news/approved-antibodies/> (accessed 5.23.19).
- Arakawa, T., Ejima, D., Li, T., Philo, J.S., 2010. The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99, 1674–1692. <https://doi.org/10.1002/jps.21974>
- Attwood, S.J., Kershaw, R., Uddin, S., Bishop, S.M., Welland, M.E., 2019. Understanding how charge and hydrophobicity influence globular protein adsorption to alkanethiol and material surfaces. *J. Mater. Chem. B* 7, 2349–2361. <https://doi.org/10.1039/C9TB00168A>
- Bansal, R., Gupta, S., Rathore, A.S., 2019. Analytical Platform for Monitoring Aggregation of Monoclonal Antibody Therapeutics. *Pharm. Res.* 36, 152. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2690-8>
- Bao, J., Krylova, S.M., Cherney, L.T., LeBlanc, J.C.Y., Pribil, P., Johnson, P.E., Wilson, D.J., Krylov, S.N., 2014. Kinetic Size-Exclusion Chromatography with Mass Spectrometry Detection: An Approach for Solution-Based Label-Free Kinetic Analysis of Protein–Small Molecule Interactions. *Anal. Chem.* 86, 10016–10020. <https://doi.org/10.1021/ac503391c>
- Bazin, C., Cassard, B., Caudron, E., Prognon, P., Havard, L., 2015. Comparative analysis of methods for real-time analytical control of chemotherapies preparations. *Int J Pharm* 494, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.041>
- Beck, A., Wagner-Rousset, E., Ayoub, D., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianféroni, S., 2013a. Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Anal. Chem.* 85, 715–736. <https://doi.org/10.1021/ac3032355>
- Beck, A., Wagner-Rousset, E., Ayoub, D., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianféroni, S., 2013b. Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Anal. Chem.* 85, 715–736. <https://doi.org/10.1021/ac3032355>
- Beck, A., Wagner-Rousset, E., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianféroni, S., 2009. Anticorps thérapeutiques et dérivés : une palette de structures pour une pléthore d'indications. *Med Sci (Paris)* 25, 1024–1032. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121024>
- Bekri, S., Leclercq, L., Cottet, H., 2015. Polyelectrolyte multilayer coatings for the separation of proteins by capillary electrophoresis: Influence of polyelectrolyte nature and multilayer crosslinking. *Journal of Chromatography A* 1399, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.033>
- Belov, A.M., Viner, R., Santos, M.R., Horn, D.M., Bern, M., Karger, B.L., Ivanov, A.R., 2017. Analysis of Proteins, Protein Complexes, and Organellar Proteomes Using Sheathless Capillary Zone Electrophoresis - Native Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1781-1>
- Belov, A.M., Zang, L., Sebastiano, R., Santos, M.R., Bush, D.R., Karger, B.L., Ivanov, A.R., 2018. Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry. *Electrophoresis* 39, 2069–2082. <https://doi.org/10.1002/elps.201800067>

- Bertoletti, L., Schappler, J., Colombo, R., Rudaz, S., Haselberg, R., Domínguez-Vega, E., Raimondi, S., Somsen, G.W., De Lorenzi, E., 2016. Evaluation of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of the conformational heterogeneity of intact proteins using beta2-microglobulin as model compound. *Analytica Chimica Acta* 945, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.010>
- Birrer, M.J., Moore, K.N., Betella, I., Bates, R.C., 2019. Antibody-Drug Conjugate-Based Therapeutics: State of the Science. *J Natl Cancer Inst* 111, 538–549. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz035>
- Boeri Erba, E., Petosa, C., 2015. The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes. *Protein Sci* 24, 1176–1192. <https://doi.org/10.1002/pro.2661>
- Boulianne, G.L., Hozumi, N., Shulman, M.J., 1984. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312, 643–646.
- Bouvier, E.S.P., Koza, S.M., 2014. Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, UHPLC: Where Are We 10 Years After Its Commercial Introduction?* 63, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.002>
- Breen, E.D., Curley, J.G., Overcashier, D.E., Hsu, C.C., Shire, S.J., 2001. Effect of Moisture on the Stability of a Lyophilized Humanized Monoclonal Antibody Formulation. *Pharm Res* 18, 1345–1353. <https://doi.org/10.1023/A:1013054431517>
- Bria, C.R.M., Williams, S.K.R., 2016. Impact of asymmetrical flow field-flow fractionation on protein aggregates stability. *Journal of Chromatography A* 1465, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.037>
- Brusotti, G., Calleri, E., Colombo, R., Massolini, G., Rinaldi, F., Temporini, C., 2017. Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review. *Chromatographia* 1, 3–23. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3380-5>
- Bush, D.R., Zang, L., Belov, A.M., Ivanov, A.R., Karger, B.L., 2016. High Resolution CZE-MS Quantitative Characterization of Intact Biopharmaceutical Proteins: Proteoforms of Interferon- $\beta$ 1. *Anal. Chem.* 88, 1138–1146. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03218>
- Carvalho, L.S., Silva, O.B. da, deAlmeida, G.C., Oliveira, J.D. de, Carmo, N.S.P. and T.S., 2017. Production Processes for Monoclonal Antibodies. *Fermentation Processes*. <https://doi.org/10.5772/64263>
- Chartrain, M., Chu, L., 2008. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Curr Pharm Biotechnol* 9, 447–467.
- Chen, J., Yin, S., Wu, Y., Ouyang, J., 2013. Development of a Native Nanoelectrospray Mass Spectrometry Method for Determination of the Drug-to-Antibody Ratio of Antibody–Drug Conjugates. *Anal. Chem.* 85, 1699–1704. <https://doi.org/10.1021/ac302959p>
- Chon, J.H., Zarbís-Papastóitsis, G., 2011. Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New Biotechnology, Antibodies: From Basics to Therapeutics* 28, 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.015>
- Cochet, O., Chartrain, M., 2009. Du milligramme à la tonne d'anticorps monoclonaux - Outils et perspectives de production. *Med Sci (Paris)* 25, 1078–1084. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121078>
- Cotton, F., Vertongen, F., Gulbis, B., 2006. Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 21, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2005.11.002>
- De Groot, A.S., Scott, D.W., 2007. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology* 28, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.011>

- Debaene, F., Bœuf, A., Wagner-Rousset, E., Colas, O., Ayoub, D., Corvaia, N., Van Dorsselaer, A., Beck, A., Cianféroni, S., 2014. Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment. *Anal. Chem.* 86, 10674–10683. <https://doi.org/10.1021/ac502593n>
- DeFelippis, M.R., Harmon, B.J., Huang, L., Sukumar, and M., 2016. Pharmaceutical Stress Testing. <https://doi.org/10.3109/9781439801802-18>
- Demeule, B., Palais, C., Machaidze, G., Gurny, R., Arvinte, T., 2009. New methods allowing the detection of protein aggregates. *mAbs* 1, 142–150. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.2.7632>
- den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., Jiskoot, W., 2011. Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development. *Pharm Res* 28, 920–933. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0297-1>
- Dhara, V.G., Naik, H.M., Majewska, N.I., Betenbaugh, M.J., 2018. Recombinant Antibody Production in CHO and NS0 Cells: Differences and Similarities. *BioDrugs* 32, 571–584. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0319-9>
- Diederich, P., Hansen, S.K., Oelmeier, S.A., Stolzenberger, B., Hubbuch, J., 2011. A sub-two minutes method for monoclonal antibody-aggregate quantification using parallel interlaced size exclusion high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218, 9010–9018. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.086>
- Diress, A., Lorbetskie, B., Larocque, L., Li, X., Alteen, M., Isbrucker, R., Girard, M., 2010. Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays. *Journal of Chromatography A, 34th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques* 1217, 3297–3306. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.081>
- Doss, H.R., Raman, M., Knihtila, R., Chennamsetty, N., Wang, D., Shupe, A., Mussa, N., 2019. Streamlining the polishing step development process via physicochemical characterization of monoclonal antibody aggregates. *J Chromatogr A* 1598, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.044>
- Duivelshof, B.L., Fekete, S., Guillarme, D., D'Atri, V., 2019. A generic workflow for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies-application to daratumumab. *Anal Bioanal Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1561-1>
- Dumet, C., Pottier, J., Guoilleux, V., Watier, H., 2017. Les nouveaux formats structuraux des anticorps thérapeutiques en rhumatologie. *Revue du Rhumatisme* 84, 385–391. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.rhum.2017.02.007>
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., Kshirsagar, R., 2016. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 36, 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>
- Ecker, D.M., Jones, S.D., Levine, H.L., 2015. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs* 7, 9–14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>
- Ehkirch, A., Goyon, A., Hernandez-Alba, O., Rouviere, F., D'Atri, V., Dreyfus, C., Haeuw, J.-F., Diemer, H., Beck, A., Heinisch, S., Guillarme, D., Cianferani, S., 2018a. A Novel Online Four-Dimensional SEC×SEC-IM×MS Methodology for Characterization of Monoclonal Antibody Size Variants. *Anal. Chem.* 90, 13929–13937. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03333>
- Ehkirch, A., Hernandez-Alba, O., Colas, O., Beck, A., Guillarme, D., Cianféroni, S., 2018b. Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products. *Journal of Chromatography B* 1086, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.010>

- Ejima, D., Yumioka, R., Arakawa, T., Tsumoto, K., 2005. Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography. *J Chromatogr A* 1094, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.086>
- EMA, 2007. Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies and Related Substances., EMA/CHMP/BWP/157653/2007.
- Engelhardt, H., Ahr, G., 1981. Properties of chemically bonded phases. *Chromatographia* 14, 227–233. <https://doi.org/10.1007/BF02260156>
- Faserl, K., Sarg, B., Sola, L., Lindner, H.H., 2017. Enhancing Proteomic Throughput in Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry by Sequential Sample Injection. *Proteomics* 17, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700310>
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.-L., Guillaume, D., 2014. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, JPBA Reviews* 2014 101, 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011>
- Fekete, S., Ganzler, K., Guillaume, D., 2013. Critical evaluation of fast size exclusion chromatographic separations of protein aggregates, applying sub-2 $\mu$ m particles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78–79, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.02.013>
- Fekete, S., Guillaume, D., Sandra, P., Sandra, K., 2016. Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* 88, 480–507. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04561>
- Filipe, V., Poole, R., Oladunjoye, O., Braeckmans, K., Jiskoot, W., 2012. Detection and Characterization of Subvisible Aggregates of Monoclonal IgG in Serum. *Pharm Res* 29, 2202–2212. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0749-x>
- Foltz, I.N., Karow, M., Wasserman, S.M., 2013. Evolution and Emergence of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Circulation* 127, 2222–2230. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002033>
- Freitag, A.J., Shomali, M., Michalakakis, S., Biel, M., Siedler, M., Kaymakcalan, Z., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., Winter, G., Engert, J., 2015. Investigation of the immunogenicity of different types of aggregates of a murine monoclonal antibody in mice. *Pharm. Res.* 32, 430–444. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1472-6>
- Füssl, F., Cook, K., Scheffler, K., Farrell, A., Mittermayr, S., Bones, J., 2018. Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies Using Direct Coupled pH Gradient Cation Exchange Chromatography to High-Resolution Native Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 90, 4669–4676. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05241>
- Gassner, A.-L., Rudaz, S., Schappler, J., 2013. Static coatings for the analysis of intact monoclonal antibody drugs by capillary zone electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* 34, 2718–2724. <https://doi.org/10.1002/elps.201300070>
- Gennaro, L.A., Salas-Solano, O., 2008. On-Line CE–LIF–MS Technology for the Direct Characterization of N-Linked Glycans from Therapeutic Antibodies. *Anal. Chem.* 80, 3838–3845. <https://doi.org/10.1021/ac800152h>
- Giorgetti, J., Lechner, A., Del Nero, E., Beck, A., François, Y.-N., Leize-Wagner, E., 2018. Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 1469066718807798. <https://doi.org/10.1177/1469066718807798>
- Gonzales, N.R., De Pascalis, R., Schlom, J., Kashmiri, S.V.S., 2005. Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application. *Tumour Biol.* 26, 31–43. <https://doi.org/10.1159/000084184>
- Goyon, A., Beck, A., Colas, O., Sandra, K., Guillaume, D., Fekete, S., 2017a. Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 $\mu$ m particles for the analysis of

- biopharmaceutical proteins. *J Chromatogr A* 1498, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.056>
- Goyon, A., Beck, A., Veuthey, J.-L., Guillarme, D., Fekete, S., 2017b. Comprehensive study on the effects of sodium and potassium additives in size exclusion chromatographic separations of protein biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Special Issue in honor of the retirement of Prof. Carlo Bertucci* 144, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.031>
- Goyon, A., D’Atri, V., Bobaly, B., Wagner-Rousset, E., Beck, A., Fekete, S., Guillarme, D., 2017c. Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. I – Non-denaturing chromatographic techniques. *Journal of Chromatography B* 1058, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.010>
- Goyon, A., D’Atri, V., Colas, O., Fekete, S., Beck, A., Guillarme, D., 2017d. Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: Feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation. *Journal of Chromatography B* 1065, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.027>
- Graf, M., García, R.G., Wätzig, H., 2005. Protein adsorption in fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries. *ELECTROPHORESIS* 26, 2409–2417. <https://doi.org/10.1002/elps.200410360>
- Graul, T.W., Schlenoff, J.B., 1999. Capillaries Modified by Polyelectrolyte Multilayers for Electrophoretic Separations. *Anal. Chem.* 71, 4007–4013. <https://doi.org/10.1021/ac9902771>
- Gronemeyer, P., Ditz, R., Strube, J., 2014. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering* 1, 188–212. <https://doi.org/10.3390/bioengineering1040188>
- Gülbakan, B., Barylyuk, K., Schneider, P., Pillong, M., Schneider, G., Zenobi, R., 2018. Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry Reveals Multiple Facets of Aptamer–Ligand Interactions: From Mechanism to Binding Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 7486–7497. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13044>
- Haberger, M., Heidenreich, A.-K., Schlothauer, T., Hook, M., Gassner, J., Bomans, K., Yegres, M., Zwick, A., Zimmermann, B., Wegele, H., Bonnington, L., Reusch, D., Bulau, P., 2015a. Functional assessment of antibody oxidation by native mass spectrometry. *MAbs* 7, 891–900. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1052199>
- Haberger, M., Leiss, M., Heidenreich, A.-K., Pester, O., Hafenmair, G., Hook, M., Bonnington, L., Wegele, H., Haindl, M., Reusch, D., Bulau, P., 2015b. Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry. *MAbs* 8, 331–339. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1122150>
- Han, M., Rock, B.M., Pearson, J.T., Rock, D.A., 2016. Intact mass analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis—Mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 1011, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.045>
- Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A., George, A.J.T., 2010. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrd3003>
- Harris, R.J., Kabakoff, B., Macchi, F.D., Shen, F.J., Kwong, M., Andya, J.D., Shire, S.J., Bjork, N., Totpal, K., Chen, A.B., 2001. Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Protein and Peptide Analysis* 752, 233–245. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00548-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00548-X)
- Hartmann, W.K., Sapharishi, N., Yang, X.Y., Mitra, G., Soman, G., 2004a. Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid

- chromatography with quadruple detection. *Analytical Biochemistry* 325, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.031>
- Hartmann, W.K., Saptharishi, N., Yang, X.Y., Mitra, G., Soman, G., 2004b. Characterization and analysis of thermal denaturation of antibodies by size exclusion high-performance liquid chromatography with quadruple detection. *Analytical Biochemistry* 325, 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.031>
- Haselberg, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W., 2013. Low-Flow Sheathless Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Sensitive Glycoform Profiling of Intact Pharmaceutical Proteins. *Anal. Chem.* 85, 2289–2296. <https://doi.org/10.1021/ac303158f>
- Haselberg, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W., 2010. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of intact basic proteins using Polybrene-dextran sulfate-Polybrene-coated capillaries: system optimization and performance. *Anal. Chim. Acta* 678, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.032>
- Haselberg, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W., 2009. Capillary electrophoresis of intact basic proteins using noncovalently triple-layer coated capillaries. *J. Sep. Science* 32, 2408–2415. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900164>
- Haselberg, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W., 2007. Capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of intact proteins. *Journal of Chromatography A* 1159, 81–109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.048>
- Haselberg, R., De Vijlder, T., Heukers, R., Smit, M.J., Romijn, E.P., Somsen, G.W., Domínguez-Vega, E., 2018. Heterogeneity assessment of antibody-derived therapeutics at the intact and middle-up level by low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 1044, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.024>
- Hawe, A., Wiggenhorn, M., van de Weert, M., Garbe, J.H.O., Mahler, H., Jiskoot, W., 2012. Forced Degradation of Therapeutic Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101, 895–913. <https://doi.org/10.1002/jps.22812>
- Heck, A.J.R., 2008. Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat. Methods* 5, 927–933. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1265>
- Hedges, J.B., Vahidi, S., Yue, X., Konermann, L., 2013. Effects of Ammonium Bicarbonate on the Electrospray Mass Spectra of Proteins: Evidence for Bubble-Induced Unfolding. *Anal. Chem.* 85, 6469–6476. <https://doi.org/10.1021/ac401020s>
- Henk H. Lauer, Gerard P. Rozing, 2010. Performance Capillary Electrophoresis, Agilent Technologies. ed.
- Hernández-Jiménez, J., Martínez-Ortega, A., Salmerón-García, A., Cabeza, J., Prados, J.C., Ortíz, R., Navas, N., 2018. Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles. *International Journal of Biological Macromolecules* 118, 511–524. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.105>
- Hong, P., Koza, S., Bouvier, E.S.P., 2012. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 35, 2923–2950. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>
- Hoogenboom, H.R., 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23, 1105–1116. <https://doi.org/10.1038/nbt1126>
- Howard G. Barth, G.D.S., 2012. The State of the Art and Future Trends of Size-Exclusion Chromatography Packings and Columns [WWW Document]. URL <http://www.chromatographyonline.com/state-art-and-future-trends-size-exclusion-chromatography-packings-and-columns> (accessed 7.24.19).
- Huhn, C., Ramautar, R., Wuhler, M., Somsen, G.W., 2010. Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 396, 297–314. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3193-y>



- Hwang, W.Y.K., Foote, J., 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods, Humanized Antibodies and their Applications* 36, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.01.001>
- Ishii, K., Zhou, M., Uchiyama, S., 2018. Native mass spectrometry for understanding dynamic protein complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Biophysical Exploration of Dynamical Ordering of Biomolecular Systems* 1862, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.09.019>
- Ishikawa, T., Ito, T., Endo, R., Nakagawa, K., Sawa, E., Wakamatsu, K., 2010. Influence of pH on Heat-Induced Aggregation and Degradation of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33, 1413–1417. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1413>
- Jaccoulet, E., 2017. Évaluation analytique d'anticorps monoclonaux thérapeutiques à visée anticancéreuse dans le contexte hospitalier : nouvelles approches (thesis). Paris Saclay.
- Jaccoulet, E., Smadja, C., Prognon, P., Taverna, M., 2015. Capillary electrophoresis for rapid identification of monoclonal antibodies for routine application in hospital. *Electrophoresis* 36, 2050–2056. <https://doi.org/10.1002/elps.201400603>
- Jenkins, N., Murphy, L., Tyther, R., 2008. Post-translational Modifications of Recombinant Proteins: Significance for Biopharmaceuticals. *Mol Biotechnol* 39, 113–118. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9049-4>
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G., 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522–525. <https://doi.org/10.1038/321522a0>
- Jooß, K., Hühner, J., Kiessig, S., Moritz, B., Neusüß, C., 2017. Two-dimensional capillary zone electrophoresis-mass spectrometry for the characterization of intact monoclonal antibody charge variants, including deamidation products. *Anal Bioanal Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0542-0>
- Joubert, M.K., Luo, Q., Nashed-Samuel, Y., Wypych, J., Narhi, L.O., 2011. Classification and Characterization of Therapeutic Antibody Aggregates. *J Biol Chem* 286, 25118–25133. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160457>
- Kaltashov, I.A., Abzalimov, R.R., 2008. Do Ionic Charges in ESI MS Provide Useful Information on Macromolecular Structure? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19, 1239–1246. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.05.018>
- Kamberi, M., Chung, P., DeVas, R., Li, L., Li, Z., Ma, X.S., Fields, S., Riley, C.M., 2004. Analysis of non-covalent aggregation of synthetic hPTH (1-34) by size-exclusion chromatography and the importance of suppression of non-specific interactions for a precise quantitation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 810, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.07.026>
- Kaplon, H., Reichert, J.M., 2019. Antibodies to watch in 2019. *MAbs* 11, 219–238. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1556465>
- Kaplon, H., Reichert, J.M., 2018. Antibodies to watch in 2018. *MAbs* 10, 183–203. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1415671>
- Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., 1998. Stable Cationic Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers for Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 70, 5272–5277. <https://doi.org/10.1021/ac9805221>
- Kessler, M., Goldsmith, D., Schellekens, H., 2006. Immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nephrol Dial Transplant* 21, v9–v12. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl476>
- Kiese, S., Pappengerger, A., Friess, W., Mahler, H.-C., 2008. Shaken, Not Stirred: Mechanical Stress Testing of an IgG1 Antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97, 4347–4366. <https://doi.org/10.1002/jps.21328>
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495. <https://doi.org/10.1038/256495a0>

- Kroon, D.J., Baldwin-Ferro, A., Lalan, P., 1992. Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping. *Pharm. Res.* 9, 1386–1393.
- Kükreer, B., Filipe, V., van Duijn, E., Kasper, P.T., Vreeken, R.J., Heck, A.J.R., Jiskoot, W., 2010. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharm Res* 27, 2197–2204. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0224-5>
- Kuriakose, A., Chirmule, N., Nair, P., 2016a. Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. *J Immunol Res* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1298473>
- Kuriakose, A., Chirmule, N., Nair, P., 2016b. Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. *J Immunol Res* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1298473>
- Lam, X.M., Yang, J.Y., Cleland, J.L., 1997. Antioxidants for Prevention of Methionine Oxidation in Recombinant Monoclonal Antibody HER2. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 1250–1255. <https://doi.org/10.1021/js970143s>
- Lazar, A.C., Wang, L., Blättler, W.A., Amphlett, G., Lambert, J.M., Zhang, W., 2005. Analysis of the composition of immunoconjugates using size-exclusion chromatography coupled to mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 1806–1814. <https://doi.org/10.1002/rcm.1987>
- Leblanc, Y., Ramon, C., Bihoreau, N., Chevreux, G., 2017. Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 °C. *Journal of Chromatography B* 1048, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017>
- Leclercq, L., Morvan, M., Koch, J., Neusüß, C., Cottet, H., 2019. Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.008>
- Leney, A.C., Heck, A.J.R., 2017. Native Mass Spectrometry: What is in the Name? *J Am Soc Mass Spectrom* 28, 5–13. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1545-3>
- Liu, H., Gaza-Bulsecu, G., Chumsae, C., 2009. Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies Using Size Exclusion Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20, 2258–2264. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.08.015>
- Liu, J., Andya, J.D., Shire, S.J., 2006. A critical review of analytical ultracentrifugation and field flow fractionation methods for measuring protein aggregation. *AAPS J* 8, E580–E589. <https://doi.org/10.1208/aapsj080367>
- Liu, J., Nguyen, M.D.H., Andya, J.D., Shire, S.J., 2005. Reversible Self-Association Increases the Viscosity of a Concentrated Monoclonal Antibody in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1928–1940. <https://doi.org/10.1002/jps.20347>
- Liu, L., Qi, W., Schwartz, D.K., Randolph, T.W., Carpenter, J.F., 2013. The Effects of Excipients on Protein Aggregation During Agitation: An Interfacial Shear Rheology Study. *J Pharm Sci* 102, 2460–2470. <https://doi.org/10.1002/jps.23622>
- Lucy, C.A., MacDonald, A.M., Gulcev, M.D., 2008. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A, 50 Years Journal of Chromatography* 1184, 81–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>
- Maas, C., Hermeling, S., Bouma, B., Jiskoot, W., Gebbink, M.F.B.G., 2007. A Role for Protein Misfolding in Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *J. Biol. Chem.* 282, 2229–2236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605984200>
- Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U., Kiese, S., 2009. Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 2909–2934. <https://doi.org/10.1002/jps.21566>

- Mahler, H.-C., Müller, R., Friess, W., Delille, A., Matheus, S., 2005. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 59, 407–417. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.12.004>
- Maillère, B., Delluc, S., Ravot, G., 2012. [The prediction of immunogenicity of therapeutic proteins]. *Med Sci (Paris)* 28, 82–88. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012281021>
- Marie, A.-L., Dominguez-Vega, E., Saller, F., Plantier, J.-L., Urbain, R., Borgel, D., Tran, N.T., Somsen, G.W., Taverna, M., 2016. Characterization of conformers and dimers of antithrombin by capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 947, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.016>
- Mokaddem Meriem, Gareil Pierre, Belgaied Jamel-Eddine, Varenne Anne, 2008. A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry via an electrospray ionization interface. Part I-Suction effect. *ELECTROPHORESIS* 29, 1957–1964. <https://doi.org/10.1002/elps.200700880>
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., Oi, V.T., 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6851–6855. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.21.6851>
- Moussa, E.M., Panchal, J.P., Moorthy, B.S., Blum, J.S., Joubert, M.K., Narhi, L.O., Topp, E.M., 2016a. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci* 105, 417–430. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.002>
- Moussa, E.M., Panchal, J.P., Moorthy, B.S., Blum, J.S., Joubert, M.K., Narhi, L.O., Topp, E.M., 2016b. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci* 105, 417–430. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.002>
- Muneeruddin, K., Thomas, J.J., Salinas, P.A., Kaltashov, I.A., 2014. Characterization of Small Protein Aggregates and Oligomers Using Size Exclusion Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 86, 10692–10699. <https://doi.org/10.1021/ac502590h>
- Narhi, L.O., Schmit, J., Bechtold-Peters, K., Sharma, D., 2012. Classification of protein aggregates. *J Pharm Sci* 101, 493–498. <https://doi.org/10.1002/jps.22790>
- Oliva, A., Llabrés, M., Fariña, J.B., 2014. Capability measurement of size-exclusion chromatography with a light-scattering detection method in a stability study of bevacizumab using the process capability indices. *Journal of Chromatography A, Method Validation* 1353, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.027>
- Pattky, M., Huhn, C., 2013. Advantages and limitations of a new cationic coating inducing a slow electroosmotic flow for CE-MS peptide analysis: a comparative study with commercial coatings. *Anal Bioanal Chem* 405, 225–237. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6459-8>
- Paul, R., Graff-Meyer, A., Stahlberg, H., Lauer, M.E., Rufer, A.C., Beck, H., Briguet, A., Schnaible, V., Buckel, T., Boeckle, S., 2012. Structure and Function of Purified Monoclonal Antibody Dimers Induced by Different Stress Conditions. *Pharm Res* 29, 2047–2059. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0732-6>
- Ratanji, K.D., Derrick, J.P., Dearman, R.J., Kimber, I., 2014. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J Immunotoxicol* 11, 99–109. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.821564>
- Razunguzwa, T.T., Warriar, M., Timperman, A.T., 2006. ESI-MS Compatible Permanent Coating of Glass Surfaces Using Poly(ethylene glycol)-Terminated Alkoxysilanes for Capillary Zone Electrophoretic Protein Separations. *Anal. Chem.* 78, 4326–4333. <https://doi.org/10.1021/ac052121t>
- Ren, C., Bailey, A.O., VanderPorten, E.C., Oh, A., Phung, W., Mulvihill, M.M., Harris, S.F., Liu, Y., Han, G., Sandoval, W., 2018. Quantitative determination of protein-ligand affinity by size exclusion chromatography directly coupled to high-resolution native mass spectrometry. *Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03829>

- Roberts, C.J., 2014. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends in Biotechnology* 32, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.005>
- Rodriguez, I., Li, S.F.Y., 1999. Surface deactivation in protein and peptide analysis by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* 383, 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00485-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00485-1)
- Rosati, S., Yang, Y., Barendregt, A., Heck, A.J.R., 2014. Detailed mass analysis of structural heterogeneity in monoclonal antibodies using native mass spectrometry. *Nat Protoc* 9, 967–976. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.057>
- Roselyne L'Italien, 2008. *Immunohématologie*.
- Ruuls, S.R., van Bueren, J.J.L., van de Winkel, J.G.J., Parren, P.W.H.I., 2008. Novel human antibody therapeutics: The age of the Umabs. *Biotechnol J* 3, 1157–1171. <https://doi.org/10.1002/biot.200800110>
- Schellekens, H., 2002. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 1, 457–462. <https://doi.org/10.1038/nrd818>
- Shukla, A.A., Wolfe, L.S., Mostafa, S.S., Norman, C., 2017. Evolving trends in mAb production processes. *Bioeng Transl Med* 2, 58–69. <https://doi.org/10.1002/btm2.10061>
- Sifniotis, V., Cruz, E., Eroglu, B., Kayser, V., 2019. Current Advancements in Addressing Key Challenges of Therapeutic Antibody Design, Manufacture, and Formulation. *Antibodies (Basel)* 8. <https://doi.org/10.3390/antib8020036>
- Singh, S.K., 2011. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci* 100, 354–387. <https://doi.org/10.1002/jps.22276>
- Sola, L., Chiari, M., 2012. Modulation of electroosmotic flow in capillary electrophoresis using functional polymer coatings. *Journal of Chromatography A* 1270, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.039>
- Stas, P., Lasters, I., Coulombel, T. française de L., 2009. Immunogénicité de protéines d'intérêt thérapeutique - Les anticorps monoclonaux thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 25, 1070–1077. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121070>
- Strand, V., Balsa, A., Al-Saleh, J., Barile-Fabris, L., Horiuchi, T., Takeuchi, T., Lula, S., Hawes, C., Kola, B., Marshall, L., 2017. Immunogenicity of Biologics in Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review. *BioDrugs* 31, 299–316. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0231-8>
- Stutz, H., 2009. Protein attachment onto silica surfaces--a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE. *Electrophoresis* 30, 2032–2061. <https://doi.org/10.1002/elps.200900015>
- Tassi, M., Vos, J.D., Chatterjee, S., Sobott, F., Bones, J., Eeltink, S., 2018. Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products. *Journal of Separation Science* 41, 125–144. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700988>
- Teillaud, J.-L., 2009. Qu'est-ce qu'une biothérapie ? L'exemple des anticorps monoclonaux. *La Presse Médicale, Biothérapies* 38, 825–831. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2008.12.025>
- Telikepalli, S., Kumru, O.S., Kim, J.H., Joshi, S.B., O'berry, K.B., Blake-Haskins, A.W., Perkins, M.D., Russell Middaugh, C., Volkin, D.B., 2015. Characterization of the Physical Stability of a Lyophilized IgG1 mAb after Accelerated Shipping-Like Stress. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104, 495–507. <https://doi.org/10.1002/jps.24242>
- Telikepalli, S.N., Kumru, O.S., Kalonia, C., Esfandiary, R., Joshi, S.B., Middaugh, C.R., Volkin, D.B., 2014. Structural Characterization of IgG1 mAb Aggregates and Particles Generated under Various Stress Conditions. *J Pharm Sci* 103, 796–809. <https://doi.org/10.1002/jps.23839>
- Terral, G., Beck, A., Cianféroni, S., 2016. Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization. *Journal of*

- Chromatography B, Analytical characterization of biopharmaceuticals 1032, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.044>
- Thompson, N.J., Rosati, S., Heck, A.J.R., 2014a. Performing native mass spectrometry analysis on therapeutic antibodies. *Methods, Discovery and Development of Antibody Therapeutics* 65, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.003>
- Thompson, N.J., Rosati, S., Heck, A.J.R., 2014b. Performing native mass spectrometry analysis on therapeutic antibodies. *Methods, Discovery and Development of Antibody Therapeutics* 65, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.003>
- Top 15 Best-Selling Drugs of 2018, 2019. . GEN - Genetic Engineering and Biotechnology News. URL <https://www.genengnews.com/a-lists/top-15-best-selling-drugs-of-2018/> (accessed 10.3.19).
- Vermeer, A.W.P., Norde, W., 2000. The Thermal Stability of Immunoglobulin: Unfolding and Aggregation of a Multi-Domain Protein. *Biophysical Journal* 78, 394–404. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76602-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76602-1)
- Vieillard, V., Astier, A., Sauzay, C., Paul, M., 2017. One-month stability study of a biosimilar of infliximab (Remsima®) after dilution and storage at 4 °C and 25 °C. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 75, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2016.08.002>
- Vincent, F.B., Morand, E.F., Murphy, K., Mackay, F., Mariette, X., Marcelli, C., 2013. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. *Annals of the Rheumatic Diseases* 72, 165–178. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202545>
- Vlasak, J., Ionescu, R., 2011. Fragmentation of monoclonal antibodies. *MAbs* 3, 253–263. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.3.15608>
- Wagner, C.L., Schantz, A., Barnathan, E., Olson, A., Mascelli, M.A., Ford, J., Damaraju, L., Schaible, T., Maini, R.N., Tcheng, J.E., 2003. Consequences of immunogenicity to the therapeutic monoclonal antibodies ReoPro and Remicade. *Dev Biol (Basel)* 112, 37–53.
- Wakankar, A., Chen, Y., Gokarn, Y., Jacobson, F.S., 2011. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs* 3, 161–172. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.2.14960>
- Wakankar, A.A., Borchardt, R.T., 2006. Formulation considerations for proteins susceptible to asparagine deamidation and aspartate isomerization. *J Pharm Sci* 95, 2321–2336. <https://doi.org/10.1002/jps.20740>
- Wang, T., Lucey, J.A., 2003. Use of Multi-Angle Laser Light Scattering and Size-Exclusion Chromatography to Characterize the Molecular Weight and Types of Aggregates Present in Commercial Whey Protein Products. *Journal of Dairy Science* 86, 3090–3101. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73909-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73909-5)
- Wang, W., Singh, S., Zeng, D.L., King, K., Nema, S., 2007. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96, 1–26. <https://doi.org/10.1002/jps.20727>
- Wei Wang, Christopher J. Roberts, 2010. Aggregation of Therapeutic Proteins.
- Wen, J., Arakawa, T., Philo, J.S., 1996. Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Anal. Biochem.* 240, 155–166. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0345>
- Wenz, C., Barbas, C., López-González, Á., Garcia, A., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Blanc, T., Freckleton, G., Britz-McKibbin, P., Shanmuganathan, M., de l'Escaille, F., Far, J., Haselberg, R., Huang, S., Huhn, C., Pattky, M., Michels, D., Mou, S., Yang, F., Neusuess, C., Tromsdorf, N., Baidoo, E.E.K., Keasling, J.D., Park, S.S., 2015. Interlaboratory study to evaluate the robustness of capillary electrophoresis-mass spectrometry for peptide mapping. *J Sep Sci* 38, 3262–3270. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500551>

- Woodard, J., Lau, H., Latypov, R.F., 2013a. Nondenaturing Size-Exclusion Chromatography-Mass Spectrometry to Measure Stress-Induced Aggregation in a Complex Mixture of Monoclonal Antibodies. *Anal. Chem.* 85, 6429–6436. <https://doi.org/10.1021/ac401455f>
- Woodard, J., Lau, H., Latypov, R.F., 2013b. Nondenaturing Size-Exclusion Chromatography-Mass Spectrometry to Measure Stress-Induced Aggregation in a Complex Mixture of Monoclonal Antibodies. *Anal. Chem.* 85, 6429–6436. <https://doi.org/10.1021/ac401455f>
- Yamashita, M., Katakura, Y., Shirahata, S., 2007. Recent advances in the generation of human monoclonal antibody. *Cytotechnology* 55, 55–60. <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9072-5>
- Ye, H., 2006. Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering. *Anal. Biochem.* 356, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.05.025>
- Yumioka, R., Sato, H., Tomizawa, H., Yamasaki, Y., Ejima, D., 2010. Mobile phase containing arginine provides more reliable SEC condition for aggregation analysis. *J Pharm Sci* 99, 618–620. <https://doi.org/10.1002/jps.21857>

## PARTIE III: RESULTATS

### III.1 Intérêt de la CZE-native MS pour l'analyse et la caractérisation d'Acms thérapeutiques

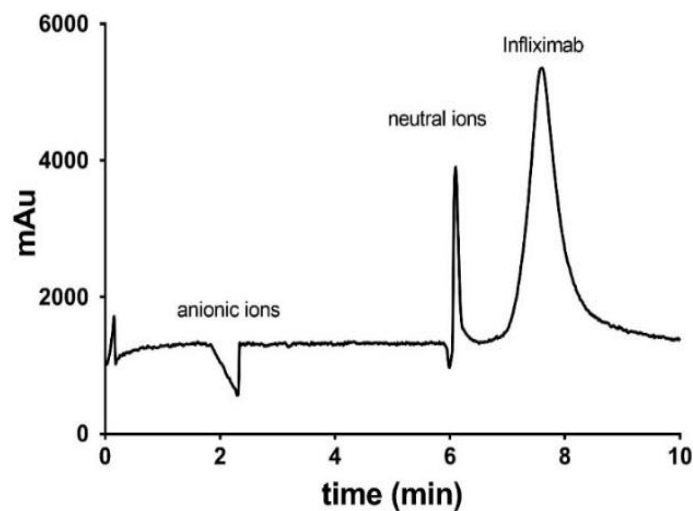
Dans ce premier chapitre expérimental, une méthode d'EC couplée à la spectrométrie de masse (ESI-QTOF) en mode natif a été développée pour analyser des Acms thérapeutiques dénaturés ou non. Cette étude a été réalisée dans un contexte de contrôle qualité des Acms. L'objectif étant de pouvoir détecter dans une préparation d'Acms reconstitués à l'hôpital, la présence éventuelle d'anticorps dénaturés présentant des modifications conformationnelles. En effet, la dénaturation de ces Acms peut ; (i) entraîner une altération des propriétés thérapeutiques des Acms, (ii) conduire à la formation de dimères responsables d'immunogénicité. Aussi, cette dénaturation ainsi que la dimérisation des Acms peuvent être considérés comme des « attributs de qualité » critique pour la qualité des Acms thérapeutiques.

Aussi, notre objectif était de développer une méthode permettant de séparer et d'identifier les différentes espèces (natives, dénaturées, ou dimères) pouvant être présentes dans un échantillon d'Acms potentiellement dégradés avant leur administration aux patients. Les Acms étant des protéines susceptibles d'interagir avec la surface des capillaires, il était nécessaire d'utiliser un revêtement pour prévenir le phénomène d'adsorption des protéines pouvant altérer la résolution entre les différentes espèces.

L'Infliximab a été choisi comme Acms modèle pour le développement de cette méthode. Auparavant, lors d'études précédentes, réalisées au laboratoire, l'intérêt des revêtements dynamiques cationiques comme le polybrene pour l'analyse CZE des Acms thérapeutiques formulés a été mise en évidence par Jaccoulet *et al.* (2015). Celui-ci a permis la séparation et la détection d'un mélange complexe de 4 Acms thérapeutiques par CZE-UV. Cependant, une adsorption résiduelle pouvant subsister, nous avons testé la capacité d'un revêtement multicouche à séparer les

différentes espèces présentes dans un échantillon préalablement soumis à un stress. Pour cela, un revêtement, adapté des travaux de Haselberg et al. (2010), constitué, à l'aide d'interactions électrostatiques, de couches successives de Polybrene (+) / Dextran Sulfate (-) / Polybrene (+) a été testé. Ce revêtement a permis de séparer un mélange complexe de  $\alpha$ -chymotrypsinogène A, ribonucléase A, lysozyme and cytochrome c, et le couplage à la spectrométrie de masse a permis d'identifier des produits de dégradation du lysozyme.

Dans la première partie de cette étude, une analyse de l'infiximab (1 mg/mL) par CZE-UV utilisant ce revêtement a été réalisée (Figure 3.1.1).



**Figure 3.1.1** : Analyse de l'infiximab (1 mg/mL) par CZE-UV.

Conditions expérimentales : Capillaire PB-DS- PB (50  $\mu$ m x 60 cm), Tampon Phosphate 75 mM, pH 3, Voltage appliqué -12 kV, 20°C,  $\lambda$  = 214 nm.

Nous avons ensuite analysé un échantillon d'infiximab soumis ou non à un stress en utilisant la méthode CZE présentée couplée à la spectrométrie de masse en mode « non dénaturant » avec une interface « sheath liquid ». Dans un premier temps, l'influence du pH du tampon d'analyse a été étudié. Les paramètres de spectrométrie de masse ont également été optimisés. La méthode d'analyse ainsi développée, dans des conditions presque « physiologiques », a été appliquée à un



échantillon d'Infliximab soumis ou non à un stress. Le stress utilisé était le stockage à long terme (> 6 mois) à 4 °C. Ces mêmes échantillons ont également été analysés par microscopie de force atomique afin de vérifier que les dégradations physiques ou les dimères observés n'étaient pas générés par les conditions expérimentales de la spectrométrie de masse. L'intérêt d'une approche middle-up pour approfondir le mécanisme de dimérisation a également été évaluée.

## Article 1: Capillary zone electrophoresis-native mass spectrometry for the quality control of therapeutic intact mAbs

Victor Le-Minh <sup>a</sup>, N.Thuy Tran <sup>a</sup>, Ali Makky <sup>b</sup>, Veronique Rosilio <sup>b</sup>, Myriam Taverna <sup>a</sup>, Claire Smadja<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institut Galien Paris Sud, UMR CNRS 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

<sup>b</sup> *Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Surface Physical Chemistry, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

**J. Chromatogr. A 1601, 375–384 (2019)**

### Abstract:

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are complex glycoproteins and ensuring their safety, efficacy and quality is still challenging. Indeed, during their manufacturing process, they are exposed to several stresses that can lead to their denaturation, misfolding or dimerization. We report here a new method based on capillary electrophoresis coupled to native mass spectrometry (MS) with a sheath liquid interface to analyze an intact therapeutic mAb, Infliximab, under non-denaturing conditions that preserve its conformational heterogeneity as well as self-association without inducing further unfolding / denaturation. For capillary zone electrophoresis (CZE) separation, a triple layer coating using polybrene-dextran sulfate-polybrene was employed. A sheath liquid composed of isopropanol - water - acetic acid with a flow rate of 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  and mild MS conditions allowed optimal signal intensities. A specific mass spectrum was obtained for each Infliximab conformation in a “stressed” formulated preparation. This is the first time that within a single analysis different conformational states, i.e. native and unfolded monomers as well as dimers are simultaneously detected. The results and the lack of analytical bias arising from the CZE-MS conditions were confirmed by using atomic force microscopy (AFM) as an orthogonal technique. A middle-up approach combined to CZE-MS analysis of the stressed samples suggested that the dimer formation involved mostly Fab-Fab interactions.

**Key words:** Therapeutic mAbs, CZE-native MS, folding, unfolding, dimers, stability, AFM

### **Highlights**

- Intact therapeutic mAbs analyzed by CZE- mass spectrometry under native conditions.
- Simultaneous detection of the different folded, unfolded or dimer forms in a single analysis.
- Involvement of Fab region in dimer formation was demonstrated by CZE-MS

### III.1.1. Introduction

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are one of the key topics in pharmaceutical industry with an important growth rate, especially in cancer and chronic inflammatory therapies [1]. The success of these biopharmaceuticals is related to their capacity to specifically interact with their target with relatively low adverse effects [2]. However, mAbs are complex glycoproteins with a wide range of potential microheterogeneities leading to significant challenge to ensure their safety, efficacy and quality from their manufacturing, storage until finally patient administration. Indeed, during their manufacturing and storage, mAbs are exposed to several stresses such as extreme pHs, high temperatures, light exposure, mechanical agitation or contact with various surfaces and materials. Such exposures can alter mAbs conformation, leading to their misfolding, denaturation, dimerization and aggregation. These generated conformational variants can potentially induce immunogenicity and impact mAbs efficacy and safety [3,4]. This type of structural variants, which appear besides charge, glycosylated, truncated, glycated variants are also classified as product variants and can be considered as critical quality attributes that could influence mAbs toxicity, immunogenicity, efficacy and their mechanism of action.

An extensive literature has reported analytical approaches to assess charge and size variants of mAbs as part of their quality control and stability evaluation [5–7]. Many studies have been devoted to small oligomer detection (e.g dimers, trimers) in mAbs preparation using SEC [8]. However, the detection of denatured mAbs is still difficult. Indeed, unfolded or misfolded forms are prone to self-association with the possibility to form dimers and small size oligomers inducing *in vivo* immunogenicity. To detect these specific mAbs impurities (conformers and dimers), bottom-up and middle-up approaches are precluded. Only native and mild analytical conditions can preserve weak non-covalent assemblies. Native mass spectrometry (MS) was introduced for the first time in 2004 as one of the emerging approaches able to address this challenge [9]. The term “native MS” could refer nowadays to conditions that maintain mAbs in their original folded or unfolded state prior to

MS analysis and also as much as possible during MS process (Leney and Heck 2017) [10]. Since only two years, a few liquid chromatography (LC) methods hyphenated to native MS and applied to IgG or therapeutic mAbs have been proposed [11]. Detecting non-covalent oligomers when using MS can indeed constitute a real challenge. Other approaches used Size Exclusion Chromatography (SEC) coupled to off-line native MS to allow both identification and quantification of size variants such as dimers, trimers and tetramers of a model bispecific antibody [12]. Ehkirch *et al.* developed recently an on-line coupling of SEC to native ion mobility spectrometry (IMS) IMS-MS to analyze pH-stressed trastuzumab which provided information on the monomeric mAbs and also on small oligomers [13]. SEC hyphenated to multi-angle scattering (MALS) is also a reliable method widely used to detect and separated small oligomers [14]. Although, LC-MS/MS and SEC-MALS can provide information about mAbs size variants (e.g. small oligomers), no conformational modifications such as denaturation or misfolding of mAbs have been detected yet by these approaches.

Besides these techniques, capillary zone electrophoresis (CZE) hyphenated to native-MS combining high separation efficiency and mass selective detection has recently attracted attention. Indeed, a recent interlaboratory study, composed by 13 independent laboratories (academic and private companies), evaluate the robustness of CE-MS for peptide mapping. The statistical evaluation, following ISO 85725-2 guidelines, showed that CE-MS method was robust, allowing thereby its transfer to multiple laboratories [15]. CE can be employed under mild conditions, without organic solvent, which is of particular interest to study conformers and small non-covalent oligomers. In addition, very few works on intact therapeutic mAbs analysis by CZE-MS have been reported until now [16–20]. Han *et al.* developed a CZE-MS with a sheath liquid (SL) interface method to analyze a non-therapeutic mAb, IgG1 but this protein was modified before analysis by reduction and deglycosylation [17]. Moreover, the denaturing conditions employed for mAbs (by using an acidic buffer) were not compatible with the preservation of the initial states of mAbs. More

recently, two sheathless CZE-ESI-MS methods were developed to analyze intact commercial mAbs. These studies allowing an efficient characterization of mAbs glycoforms were performed under denaturing conditions [20,21]. A pioneering approach relying on sheathless CZE- native MS has been recently proposed to analyze one therapeutic mAb (trastuzumab) under native conditions [22,23]. This method revealed the presence of monomers and traces of dimeric species. The origin of the dimer species was not explored, and no evidence was provided to demonstrate that the dimerization process did not occur during the MS experiments. To our best knowledge, no CZE-native MS method allowing the simultaneous detection of different intact mAbs states (folded, unfolded and dimers) in a formulated therapeutic mAbs has been proposed until now.

In this study, we investigated on-line CZE-native MS with, this time, a SL interface to analyze and detect simultaneously in one commercial stressed mAb (infliximab) the native forms as well as all the monomeric conformers that could be considered as product impurities (unfolded, misfolded, partially folded) together with small oligomers. For this purpose, we investigated non-denaturing conditions which (i) favor electrospray ionization efficiency, (ii) increase mAbs protonation, (iii) minimize mAbs adsorption on the capillary while preserving the original state of the mAbs. A triple layer coating proposed by Haselberg *et al.* for CZE-MS of basics proteins was exploited, for the first time for mAbs [24]. The nature of the dimer association was also investigated by CZE-MS employing a middle-up approach. An orthogonal method, atomic force microscopy (AFM) was employed to verify that the oligomers observed in CZE-MS were not generated in the MS source.

### **III.1.2. Materials and methods**

#### **III.1.2.1. Materials**

Polybrene 94% (Hexadimethrine bromide) (PB), dextran sulfate sodium salt (M.W. ~ 200 000) (DS), sodium chloride and sodium di-hydrogenphosphate, hydrochloric acid, sodium hydroxide (all reagent grade) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ultrapure water, methanol, iso-propanol, acetonitrile, 100 % acetic acid and 25% ammonium hydroxide (v/v) (all MS grade) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). USP grade solutions as sterile water for injection and 0.9% NaCl solution were provided by Laboratoire Aguettant (Lyon, France) and Fresenius Kabi France (Sèvres, France), respectively. FABRICATOR (Ides) was purchased from Genovis AB (Lund, Sweden). The Remicade (Infliximab) was purchased from Janssen Biologics B.V. (Leiden, The Netherlands)

Coating solutions and rinsing solution for AFM experiments were prepared with milli-Q water using a Direct-Q3 UV purification system (Millipore, Milford, MA, USA). The 0.2  $\mu\text{m}$  nylon filter was obtained from VWR (Radnor, PA, USA).

#### **III.1.2.2. Apparatus**

##### **III.1.2.2.1. CZE-MS**

CZE-MS experiments were performed using a 7100 Agilent capillary electrophoresis and ESI-QTOF 6540 mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A 60 cm silica capillary (i.d. 50  $\mu\text{m}$ ) was used. CZE-MS coupling was performed using a co-axial SL electrospray interface from Agilent Technologies. Mass Hunter B.07.00 software was employed to analyze the MS data.

### **III.1.2.2.2. AFM**

AFM experiments were performed using a Nanowizard® Ultraspeed AFM (JPK instruments, Berlin, Germany). The samples were deposited onto a muscovite mica grade V1 (Ted pella, Redding, CA, USA). Gold coated silicon cantilevers PPP-NCH-AuD (Nanosensors, Neuchâtel, Switzerland) with a spring constant of  $\sim 42 \text{ N m}^{-1}$  and a tip curvature radius of  $\sim 10 \text{ nm}$  were used. Data acquisition was carried out manually using JPK Data Processing software.

### **III.1.2.3. Methods**

#### **III.1.2.3.1. Preparation of native and stressed Infliximab**

Reconstituted infliximab was prepared according to manufacturer guidelines of Remicade. Infliximab lyophilized powder was diluted in sterile water for injection to obtain a concentration of  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ . The solution was then diluted in 0.9% NaCl solution (under aseptic conditions) to obtain a concentration of  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $6.7 \mu\text{M}$ ) or  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $13.4 \mu\text{M}$ ). The solution was finally dialyzed for 1 hour using a 10 kDa molecular weight cut-off Slide-A-Lyzer cassette (Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA) against 10 mM ammonium acetate buffer pH 6.5 at  $4^\circ\text{C}$ . The dialyzed solution was immediately analyzed. Stressed mAbs were prepared by storing reconstituted infliximab ( $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) at  $4^\circ\text{C}$  for 6 months (protected from light). This stress has been chosen to reproduce conditions encountered during a long-term storage in hospitals. We could have chosen harsher and faster stress, but as the physical degradation pathway depends strongly on the nature of the stress, this would have led to different conclusions.

#### **III.1.2.3.2. Capillary coating procedure**

The fused-silica capillary was preconditioned by flushing 10 min at 50 psi with successively 1M HCl, 1M NaOH, MeOH, 0.1 M NaOH and deionized water. A triple layer cationic coating based on PB-DS-PB was adapted from the protocol described by Haselberg et al. [24]. Solutions of 10% w/v PB and 3% w/v DS in deionized water were freshly prepared and filtered through a  $0.2 \mu\text{m}$



nylon membrane before the coating process. To ensure a good coating stability, the polymer solution rinse times were extended to 30 min at 10 psi, and 60 min incubation was performed after each polymeric solution flushing. The triple layer was prepared only once, and capillary wall was not re-coated before every single run as preconized by Haselberg et al. [24].

### **III.1.2.3.3. CZE-MS**

Analysis of mAbs were performed on the triple coated capillary. Hydrodynamic injection was performed at 1.44 psi for 20 s (4.3% of capillary volume). The separation was performed using a 40 mM (ionic strength) ammonium acetate solution at pH 6.0 as BGE (buffer capacity 4.2 mmol.L<sup>-1</sup>.pH). The separation voltage was -12kV and the capillary temperature was set at 20 °C. Between runs the capillary was rinsed with the BGE at 13.7 psi for 5 min.

The SL was a mixture of water-isopropanol-acetic acid 50:50:0.1 (v/v/v), delivered at a flow-rate of 10 µL min<sup>-1</sup>. The positive ionization mode was chosen using an ESI voltage of 3500 V. Nebulizer pressure was set at 10 psig. Flow and temperature of sheath gas (N<sub>2</sub>) were set at 6 L min<sup>-1</sup> and 150 °C, respectively. A drying gas temperature of 200 °C and flow (N<sub>2</sub>) at 8 L min<sup>-1</sup> were employed. The nozzle voltage was set at 2000 V. For the detector parameters, the micro-channel plate value was set at 900. Profile mass spectra were collected from 2000 to 10000 *m/z* and a pusher rate of 2 GHz. The acquisition rate employed was 0.4 spectrum s<sup>-1</sup>.

### **III.1.2.3.4. AFM measurements**

Fresh and storage-stressed Infliximab samples were diluted in deionized water to obtain a concentration of 2 µg.mL<sup>-1</sup>. 100 µl of 2 µg. mL<sup>-1</sup> Infliximab were deposited onto freshly cleaved mica substrates and left to incubate for 1 to 2 minutes. Afterwards, the substrates were gently rinsed with 200 µl of ultrapure water and dried under nitrogen stream. The AFM imaging of antibody samples was performed at room temperature (20 ± 1 °C) and ambient humidity (RH ~ 35%) using an hydrophilic surface (mica) without any special control in amplitude modulation

AFM (AM-AFM) in attractive regime [25,26] by applying low force settings [27] (90–95% of the free amplitude  $A \sim 20$  nm). In AFM modulation, the tip-surface distance regulation was performed to maintain constant the amplitude to a precise set-point. Samples imaged in this way are not “dried” since they are coated with a thin water film, which can leave biomolecules in a hydrated state as demonstrated recently in our AFM study of amyloid fibrils [28]. We can reasonably assume that what is observed on these wetted surfaces is close to what happens in solution.

For each sample, at least three different substrates at three different spots were systematically imaged at high resolution ( $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ , or  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ,  $1024 \times 1024$  pixels) by AFM and their morphology (height and width) was analyzed manually with the JPK Data Processing software using the line profile measurement option. For determination of the lateral dimension of monomeric antibodies, the widths were measured manually at the full width at half maximum to reduce the tip convolution.

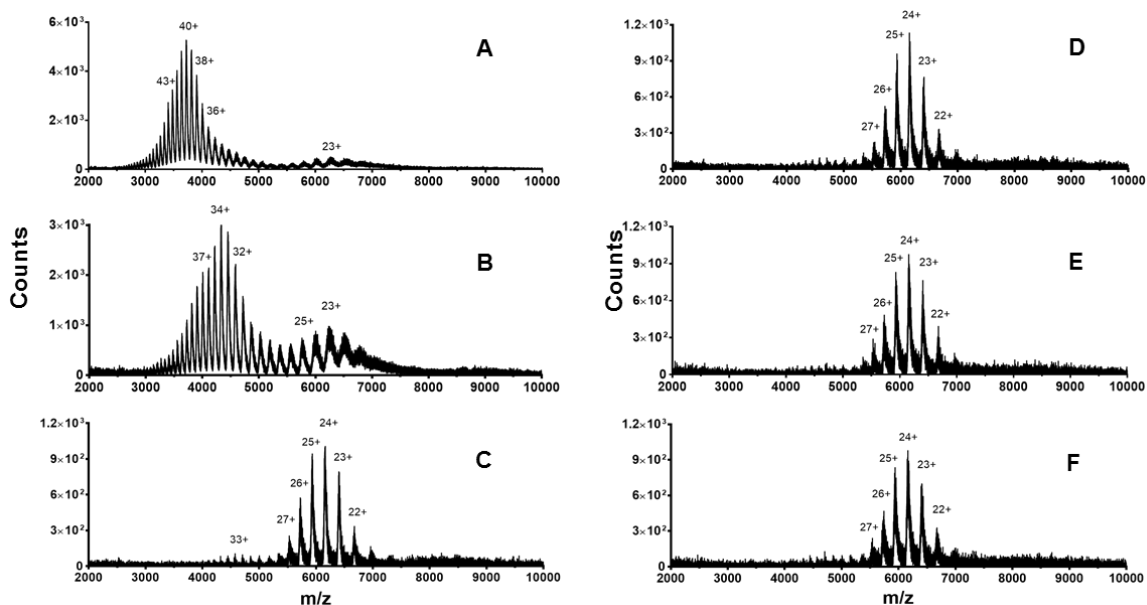
### III.1.3. Results and discussion

#### III.1.3.1. Method development

The most important challenge to detect mAbs monomeric folded forms or dimers is to select: (i) non-denaturing separation and ESI conditions to maintain mAbs in their native or original state, (ii) sheath-liquid composition leading to the optimal detection sensitivity and mAbs ionization, (iii) mild MS parameters to prevent in-source dimers/oligomers dissociation, monomers association as well as unfolding or denaturation.

To reduce as much as possible the mAb adsorption onto the capillary wall, a triple layer coating (PB-DS-PB), adapted from Haselberg *et al.* has been employed for the CZE separation [24]. In addition, the high electroosmotic flow induced by this cationic coating allowed mAbs migration without any additional pressure which would be detrimental to the analysis performances. We first optimized the BGE to analyze dialyzed reconstituted Infliximab. Under acidic and neutral conditions, a broad peak was observed (Figure 3.1.S1 A-F). Deconvolution spectra showed a main molecular mass of  $149096 \pm 109$  Da, which is in agreement with the theoretical molecular mass of Infliximab. Figure 3.2 compares the MS spectra of dialyzed Infliximab at various BGE pHs. Using acidic BGEs (40 mM formic acid pH 1.8; 40 mM acetic acid pH 3.0 and 40 mM ammonium acetate pH 4.0), Infliximab displayed a bimodal MS spectrum. At pH 1.8, the first envelope has a charge state distribution centered at 40+ and a wide mass range (2500-5500  $m/z$ ) whereas the second one exhibits a charge state distribution centered at 23+ and a narrower mass range (5500 to 7000  $m/z$ ) (Figure 3.1.2 A). These results are in agreement with previous studies showing by ESI-MS that the decrease of the pH to 2.6 in solution, generated for proteins like cytochrome C, a higher charge state distribution with a bimodal distribution corresponding to two co-existing forms; unfolded and folded [29]. Parallely, these authors demonstrated by complementary techniques (fluorescence, circular dichroism and absorption spectroscopy) that acidic conditions (pH 2.6) induced denaturation of the cytochrome C through the breakdown of the secondary and tertiary structure.

Acidic pHs are known to induce higher protonation of proteins. Protonation and unfolding are likely to be intricately linked. Considering that for a given native protein with a molecular mass  $M$ , the theoretical maximum charge state ( $Z$ ) can be evaluated as  $Z = 0.079 \times M^{1/2}$  [30], we estimated that for the native mAbs this value was 30+. The charge state of the second signal could correspond to the folded native mAbs. Indeed, folded mAbs exhibit a small number of charges on its surface, and this is also accompanied by narrower distribution of charge states. The first signal corresponded rather to a fully unfolded mAbs. Indeed, when mAbs is fully unfolded, it exposes more sites to protonation leading to a high charge state distribution with a wide mass range in the mass spectrum. Higher protonation of a “folded” forms solely should probably not induce a so important charge state shift. In addition, the fact that two forms are co-existing on the MS spectrum argues for the presence of coexisting unfolded and folded forms. At pHs 3.0 and 4.0, the first signal exhibited a distribution shift to higher  $m/z$  values compared to pH 1.8 (from 40+ at pH 1.8 to 34+ at pH 3.0 and pH 4.0) (Figures 3.1.2 B-C) and also a decreased signal intensity, probably due to partial unfolding of the mAb. At pH 4.0 this partial unfolded form exhibited an extremely low signal. The second signal, corresponding to native monomer, was increased from pH 3.0 to pH 4.0. At pH ranging from 5.0 to 7.0 (BGE 40 mM ammonium acetate) (Figures 3.1.2 D-F), only one envelope related to the folded mAbs was observed. These results confirm that the high charge state distribution observed at acidic pHs corresponds to a partially unfolded or totally denatured mAbs as previously described by Sousa *et al.* [31].



**Figure 3.1.1:** MS spectra of dialyzed Infliximab ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) obtained by CZE-ESI-MS using different BGE pHs (A) 40 mM formic acid pH 1.8; (B) 40 mM acetic acid pH 3.0; and 40 mM ammonium acetate (C) pH 4.0, (D) pH 5.0, (E) pH 6.0, and (F) pH 7.0.

CE conditions: PB-DS-PB capillary ( $50 \mu\text{m} \times 60 \text{ cm}$ ),  $-12 \text{ kV}$ ,  $20^\circ\text{C}$

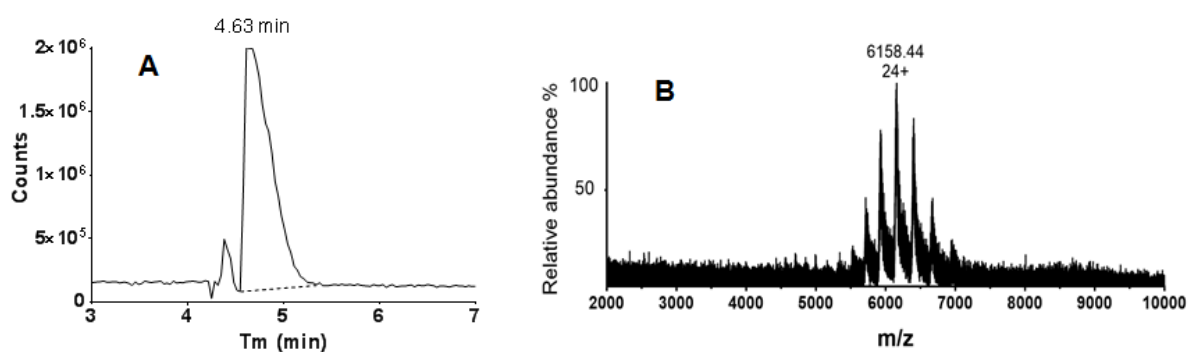
MS conditions: drying gas.  $200^\circ\text{C} - 8 \text{ L min}^{-1}$ , sheath gas  $150^\circ\text{C} - 6 \text{ L min}^{-1}$ , nebulizer pressure 10 psig, transferred capillary, nozzle, fragmentor and skimmer voltages were set at 3500 V, 2000 V, 300 V and 200 V, respectively; Sheath liquid:  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ , IPA/water/acetic acid 50:50:0.1 (v/v/v).

We also observed that the signal intensity was slightly reduced, when BGE pHs raised from 5.0 to 7.0, close to Infliximab pI (7.6), probably due a small reduction of ionization efficiency and an increasing background noise. We compared two different types of BGE ammonium acetate and ammonium bicarbonate (40 mM ionic strength, pH 6.0). Results showed similar CE-native MS spectra for both buffers. However, it is important to note that ammonium bicarbonate potentially favor protein unfolding during ESI process [32]. Consequently, for all the following CZE-MS experiments, a BGE at pH 6.0 composed of 40 mM ammonium acetate was chosen as a compromise between the signal intensity and the preservation of native conditions. In this condition, the coating stability was assessed. An excellent repeatability of Infliximab migration times was obtained with RSD below 0.64 % ( $n = 8$ ) for CZE-MS (Figure 3.1.S1 G).

We then investigated the impact of the SL composition and flow rate on the ionization behavior of Infliximab using direct infusion in order to enhance the sensitivity of MS while preventing denaturation or self-association [33]. To favor sensitive detection of mAbs, SL containing both acids and organic solvents are generally preferred as they allow maximum protonation of the amino acid ionizable groups. First, the influence of different solvents, acetonitrile, methanol and isopropanol (IPA) has been compared. For this purpose, we employed for SL a solvent/water ratio of 50:50 v/v. As expected, methanol and acetonitrile induced Infliximab denaturation, leading to the detection of the envelope corresponding to the unfolded mAbs (Figure 3.1.S2). In contrast, IPA did not induce any denaturation. Therefore, different ratios of IPA/water have been tested from 10:90 to 70:30 (v/v). The highest signal intensity for the native Infliximab was obtained for IPA/water ratios between 50:50 to 70:30 (v/v), and no unfolded form was observed in these conditions, despite the high content of IPA. Therefore, SL containing 50% of IPA has been employed in the following experiments. The influence of acidic additives (acetic and formic acids) in the SL was also tested at different proportions to further increase the signal intensity. Experiments showed that the detection sensitivity was improved and no mAbs unfolding was observed by using a SL containing 0.1% acetic acid in IPA/water 50:50 mixture. As the major drawback of SL is related to sample dilution effect, several flowrates from 1 to 20  $\mu\text{L min}^{-1}$  have been tested. The signal intensities linearly increased with flow rates ranging from 1 to 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  and then attained a plateau. However, Infliximab denaturation was observed at flow rates over 15  $\mu\text{L min}^{-1}$  (Figure 3.1.S2). To explain this phenomenon, two hypotheses could be proposed. First, a higher SL flow rate induces a higher proportion of acetic acid and IPA leading thereby to mAbs denaturation. Secondly, with a coaxial sheath liquid interface, an ionic boundary at the capillary outlet is formed due to the migration of sheath liquid counterions in the capillary [34]. At higher flow rate this ionic boundary zone might increase, favoring further mAbs denaturation. Therefore, a flow rate of 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  was selected as a compromise between signal intensity and folded mAbs preservation.

Taking into account that MS parameters should be finely tuned to prevent dissociation of non-covalent complexes or denaturation of monomeric mAbs from solution into gas phase, both drying gas and sheath gas were lowered from 250 °C (8L. min<sup>-1</sup>) to 200°C (8L. min<sup>-1</sup>) and from 295°C (8L. min<sup>-1</sup>) to 150 °C (6L. min<sup>-1</sup>), respectively. The signal intensity increased with the nebulizer pressure ranging from 1 to 10 psig and remained constant for 10-20 psig. As the nebulizer gas pressure could cause possible siphoning effects during CZE-MS analysis, inducing unstable electrospray, the value of 10 psig was selected. A good ion transmission efficiency was achieved when the transfer capillary and the skimmer voltages were set at 3500 V and 200 V, respectively. An appropriate fragmentor voltage was selected at 300 V to minimize in-source induced collision dissociation while enhancing the signal intensity of Infliximab.

Therefore, the developed CZE-MS method using a BGE at near physiological conditions (40 mM ammonium acetate pH 6.0) and a SL composed of IPA/water/acetic acid, 50:50:0.1 v/v/v delivered at the flow rate 10 µL min<sup>-1</sup> and optimized and mild MS conditions described above was applied to the analysis of a fresh reconstituted Infliximab. No envelope corresponding to unfolded monomer nor modification of the charge state distribution has been observed, confirming that no physical degradation, attributable to MS experimental conditions, occurred when fresh infliximab samples were analyzed under these CZE-native MS conditions (Figure 3.1.3).



**Figure 3.1.2:** CZE-MS analysis of fresh dialyzed Infliximab (2 mg. mL<sup>-1</sup>). (A) Total ion chromatogram (B) MS spectrum. Experimental conditions as mentioned in Figure 3.1.2.

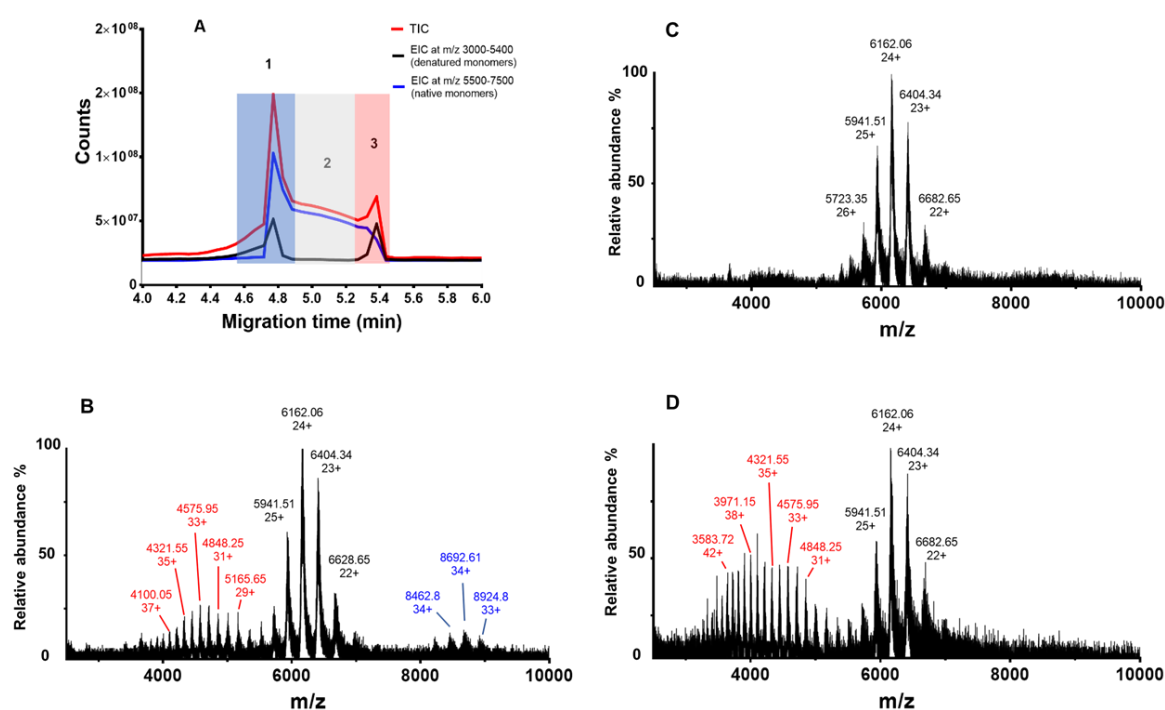
### III.1.3.2. Stressed infliximab analysis

In the second part of this work, the CZE-native MS method was employed to investigate Infliximab conformational changes induced by a storage stress (6 months at 4 °C).

The TIC recorded during the analysis of the stressed Infliximab could be divided into three regions (1 to 3) (red line, Figure 3.1.4 A). The folded monomer with  $m/z$  ranging from 5500 to 6700 was detected in the mass spectrum of the three regions of the TIC (Figures 3.1.4 B-D). The extracted ion chromatogram (EIC) obtained for the unfolded mAbs signal (3000-5400  $m/z$ ) (black line, Figure 3.1.4 A) exhibited two peaks, at 4.7 and 5.4 minutes. On the EIC of the native monomer signal (5500-7500  $m/z$ ), a large and tailing peak was observed between 4.5 and 5.4 min (Figure 3.1.4, A-blue line). The deconvoluted masses detected in the region 1 are about 150 kDa and 303 kDa, corresponding to the monomer and dimer of Infliximab. The mass spectrum of the region 1 (4.5 min - 4.9 min) (Figure 3.1.4 B) displayed three envelopes representing, unfolded monomers with  $m/z$  ranging from 3800 to 5400 and charge state centered at 33+, a folded monomer (charge state centered at 24+) and a dimer (8000-9000  $m/z$  and charge states centered at 34+). In the mass spectrum of the region 3 (5.3-5.5min) (Figure 3.1.4 D), two possible forms ( $m/z$  ranging from 3000 to 5400) could be distinguished based on their charge state distributions centered at 33+ ion and 39+, respectively. Considering their similar charge state distribution, we can hypothesize that the unfolded form exhibiting lower charge states (33+) corresponds to the unfolded form detected also in region 1. However, a dimer was detected in region 1 but not in the third one, it exhibits a lower electrophoretic mobility than the monomer. This could be explained by the fact that dimers observed on the region 1 result from a self-association of unfolded forms appearing during the storage (6 months, 4 °C). Then, this dimer could be partially dissociated under our ionization conditions, releasing a small proportion of unfolded monomer during the gas phase process. This suggests that the unfolded mAbs (monomeric form) exhibiting a charge state centered at 33+ detected in both regions 1 and 3 are related to dimer dissociation and/or non-associated monomers.



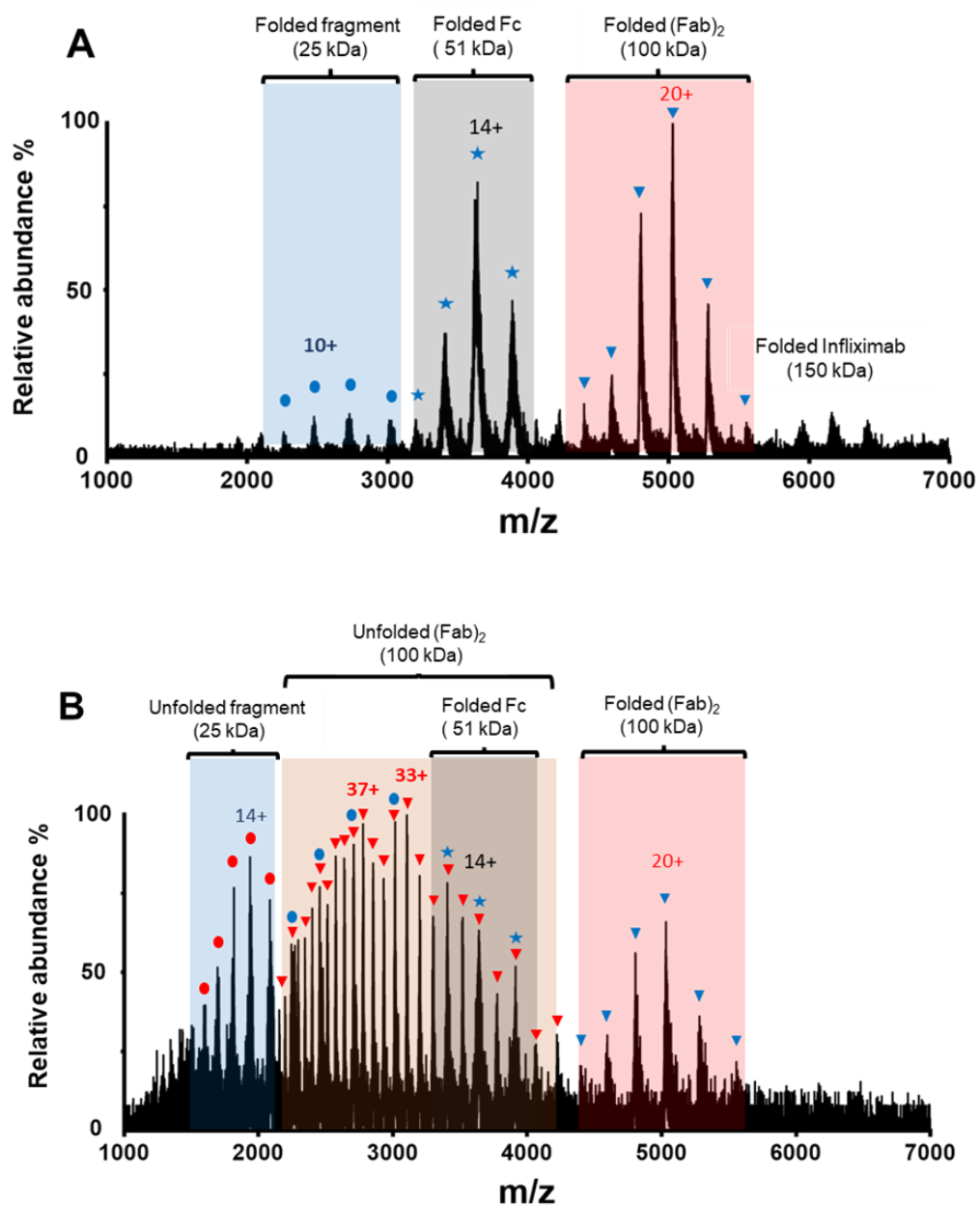
In region 3, the mass spectrum exhibited an additional unfolded form with charge states centered at 37+. Overall results suggest that CE dimension allows separation of dimers from unfolded monomers and discrimination between two unfolded forms. It is important to note that several partially or fully unfolded mAbs are detected by CE-MS but only the monomer exhibiting a 33+ charge state is prone to self-association during the mAbs storage. This is in agreement with previous works showing that not all the misfolded mAbs are prone to form dimers as this phenomenon is related to amino acid sequences exposed in misfolded mAbs [35].



**Figure 3.1.3:** Stressed Infliximab ( $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) analysis by CZE-MS. (A): Total ion chromatogram (red line), Extracted ion chromatogram (EIC) of folded Infliximab ( $5500\text{-}7000 \text{ m/z}$ ) (blue line), EIC of unfolded Infliximab ( $3000\text{-}5500 \text{ m/z}$ ) (black line). Mass spectra of (B) region 1 (4.5-4.9 min), (C) region 2 (4.9-5.3 min), (D) region 3 (5.3-5.5min) from the TIC. Experimental conditions as mentioned in Figure 3.1.2.

To characterize the nature of the dimer detected in the stressed mAbs preparation a middle-up approach which included cleavage of the mAb by IdeS below the hinge region to produce  $\text{F}(\text{ab})_2$  and  $\text{Fc}/2$  fragments, and the analysis by the optimized CZE-native MS method, was carried out.

After enzymatic digestion of fresh infliximab, CZE analysis showed a poor resolution between (Fab)<sub>2</sub> and Fc (Figure 3.1.S3). However, CZE dimension was mandatory considering its “online desalting” role before ESI-MS analysis allowing elimination of the digestion buffer (100 mM phosphate pH 7.0). The ESI-MS showed a mass spectrum corresponding to an intact folded (Fab)<sub>2</sub> (~ 100 kDa), Fc (~51 kDa) fragments which exhibited low charge state distributions centered at 20+, 14+, respectively (Figure 3.1.5 A). Very low signals corresponding to small amount of folded undigested Infliximab and Fc/2 (~ 25 kDa) were also observed. The mild conditions of analysis provided by CZE-native MS maintained the non-covalent interactions between the Fc/2 fragment despite the cleavage below the inter-chain disulfide bond [36–38]. A similar observation was made by Haselberg and colleagues [20] when analyzing Infliximab digested by Ides with CE-MS at high acetic acid percentages in BGE (20 %). This was attributed by the authors to non-covalent association between the two Fc/2 at acetic acid concentrations below 10%. For the stressed sample, we detected folded signals related to F(ab)<sub>2</sub>, Fc, Fc/2 and unfolded signals related to (Fab)<sub>2</sub> and Fc/2 (Figure 3.1.5 B). The unfolded F(ab)<sub>2</sub> exhibited the charge state distribution centered at 33+ overlapping the folded Fc and folded Fc/2 signals respectively and exhibited the highest relative abundance percentage (Supporting data 4). The mass spectrum showed a low relative abundance of unfolded Fc/2. Therefore, we can assume that the dimers observed in stressed mAbs, mostly originate from partially or fully unfolded mAbs present in the initial solution via their unfolded Fab region. These results are in agreement with previous studies describing motifs prone to self-association, in commercial mAbs such as Bevacizumab, Rituximab or Palivizumab [39]. Indeed, several groups have reported mAbs dimers formation via Fab-Fab association in various stressed samples. In most cases, whatever the stress applied UV light exposure [40,41] and temperature [42], F<sub>ab</sub>-F<sub>ab</sub> interactions are often demonstrated.

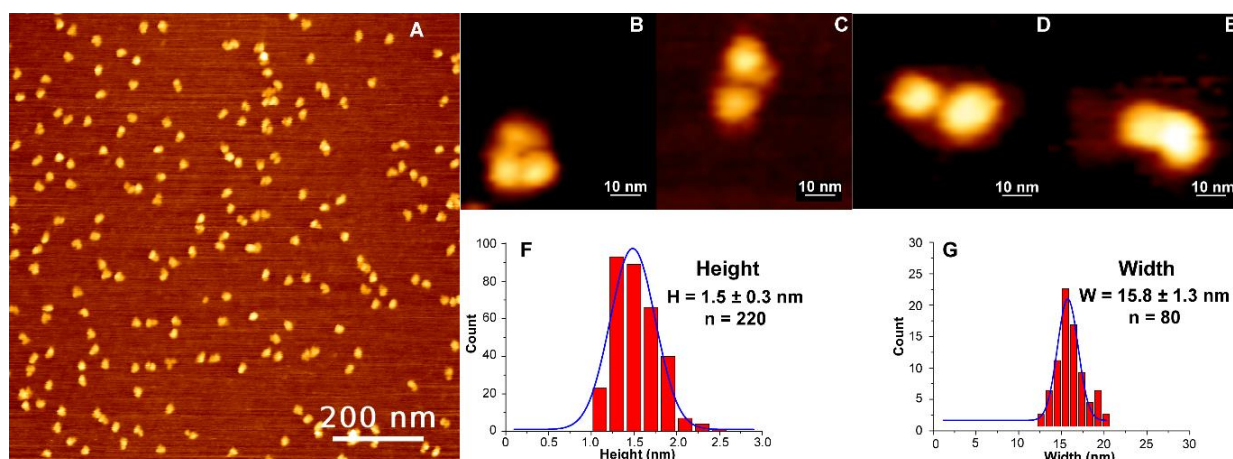


**Figure 3.1.4:** Mass spectra of reduced and IdeS treated Infliximab analyzed by CZE-MS. (A) Fresh Infliximab, (B) storage stressed Infliximab. Peaks: (●) Folded Fc/2, (★) Folded Fc, (▼) Folded F(ab)<sub>2</sub>, (▼) denatured F(ab)<sub>2</sub>, (●) Denatured Fc/2. Experimental conditions as mentioned in Figure 3.1.2.

### III.1.3.3. AFM experiments

In order to confirm that the dimers formation observed by CZE-MS on stressed samples are not artificially formed by the analytical method employed (i.e. ESI conditions), AFM imaging has been performed on Infliximab sample stored 6 months at 4°C and on fresh infliximab sample. AFM is one of the most powerful tools for the imaging of proteins and their aggregates either in ambient air or physiological conditions with sub-angstrom resolution in vertical direction against a lateral resolution of about 10 nm [25–27,43]. AFM has been widely used in assessing the orientation of immobilized antibodies [44] and their structural changes when exposed to different stressful conditions (salt concentrations, temperature, and adsorption onto hydrophobic substrates) [45,46]. In our study we have performed AFM imaging on both Infliximab samples (stored 6 months at 4°C and fresh) in order to examine the different possible structural morphologies present in the stressed sample and to confirm observation made by CZE-MS on stressed samples.

In fresh Infliximab sample AFM images showed exclusively monomers (Figure 3.1.6 A). We can observe from Figures 3.1.6 A-E that Infliximab antibodies appear as monomeric features having trinodular structure with a Y-shaped morphology depending on their orientation onto the mica surface. These nodes account to the three IgG fragments (1Fc and 2 Fab). Indeed, whereas the Y-shaped orientation corresponds to the three nodes laying flat on the surface as described in many AFM studies [25–27,43], other antibodies appear with a binodular or monodular shape which corresponds to antibody molecules lying on one side (i.e. either on their Fc or on their two Fab fragments respectively). The isolated antibody structures exhibited a height of  $1.5 \pm 0.3$  nm ( $n = 220$ ) and a width of  $15.8 \pm 1.3$  nm ( $n = 80$ ) which are consistent with the values reported in other AFM studies [25–27,43] for IgG monomers (Figures 3.1.6 F-G).

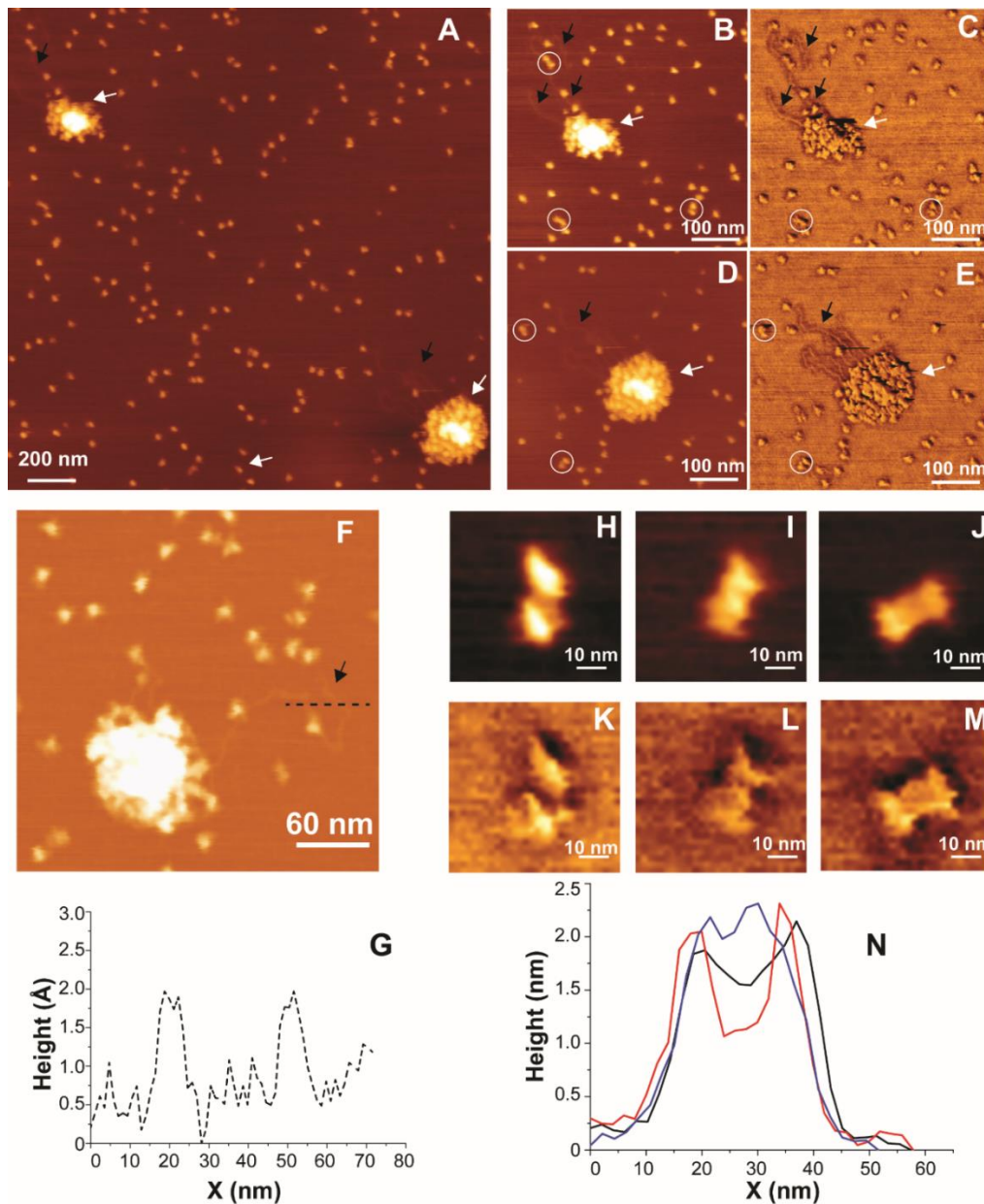


**Figure 3.1.5:** (A) AM-AFM topography image of Infiximab monomeric forms adsorbed onto mica surface performed in ambient conditions. (B), (C), (D) and (E) images of individual antibodies with different orientation. Histograms of height (F) and (G) width of infiximab monomeric antibodies.

In contrast, for the stressed samples, mAbs images revealed in addition to the monomeric form, also dimeric (white circle, Figures 3.1.7 A-E), oligomeric (white arrows, Figure 3.1.7 B), large aggregates having thin protrusions (black arrows, Figures 3.1.7 A-F). All these forms are consequently assumed to be originally present in the stressed sample. The monomeric Infiximab in both samples, stressed and fresh, exhibited similar conformational features. The dimeric structures showed in the topography and phase images (Figures 3.1.7 H-N), exhibited a width of  $28.7 \pm 1.5$  nm ( $n = 13$ ) which corresponds to two monomeric antibodies lying flat and connected to each other. The antibody aggregates revealed a height of  $6.7 \pm 1.6$  nm ( $n = 22$ ). Such aggregates height corresponded approximately to 4 layers of monomeric antibodies stacked on each other. In addition, the aggregates were frequently surrounded by long filamentous protrusions (Figure 3.1.7 G) with a height distribution of  $3.2 \pm 0.8$  Å ( $n = 14$ ). This low height could correspond to an antibody fully or partially unfolded.

These experiments, performed by AFM, which showed folded monomers, denatured forms and dimers in the stressed sample and only monomers in the fresh sample, are in agreement with those obtained from CZE-native MS. However, it is important to note that the aggregates observed in

AFM experiments were not detected by CZE-native MS. This could be due to the high molecular weight of the mAbs aggregates rendering their ionization difficult.



**Figure 3.1.6:** (A) AM-AFM topography image of stressed Infliximab sample adsorbed onto mica surface performed in ambient conditions. White arrows indicate the presence of aggregates, black arrows point on the protrusions (B), (D), (C) and (E) are topography and phase images of aggregated antibodies with denatured ones. White circles indicate the presence of dimeric forms with different orientation. (F) AM-AFM topography image of an aggregate with a filamentous protrusion (black arrow). Dotted black lines correspond to the line profile plotted in (G). (H)-(J) and (K)-(M) are topography and phase images of individual dimers forms. (N) line profile of the dimers forms shown in (H)-(J).

### **III.1.4. Conclusion**

We reported in this study a very promising method dedicated to therapeutic mAbs analysis by CZE-native MS. The triple layer coated (PB-DS-PB) capillary is reported for therapeutic mAbs analysis by CZE-native MS for the first time, preventing mAbs adsorption as well as application of additional pressure. In addition, CE could play the role of an on-line desalting method before native-MS. The main advantage compared to SEC is that CZE allows partial separation of different conformational states of Infliximab, and the MS under specific and mild conditions enables the identification of native, unfolded monomers as well as dimers, matching thereby the criteria of a quality control attribute determination. As a proof of concept, the versatility of our approach has been confirmed by analyzing two others therapeutic mAbs. With this new tool, we can anticipate that different stresses provoking mAbs denaturation and dimer formation during their shelf life could be further investigated.

The CZE-native MS results concerning mAbs denaturation (partial or total) and dimer formation were confirmed by AFM which evidenced monomers, dimers and unfolded forms in the stressed sample. Importantly, we have demonstrated that the dimer formation observed in our experimental MS conditions was not attributable to the analytical method employed but rather to the middle term storage of the mAbs. We also demonstrated that the dimer originated from unfolded mAbs via interactions between Fab regions.

### **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interest.

### **Corresponding author:**

Prof. Claire Smadja, Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay.

[claire.smadja@u-psud.fr](mailto:claire.smadja@u-psud.fr)

Telephone: 0033146835942

### **Acknowledgments**

We thank the Ecole doctorale “Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes” which provided the financial support for Le-Minh as a fellowship.

This work was supported in part by ITAAM project (Grant ANR-10-LABX-33 as member of the Laboratory of Excellence LERMIT)

The authors would like to thank to Pr. Jean Claude Tabet from CEA Saclay for the valuable discussions about mass spectrometry.



### III.1.5. Supporting information

Capillary zone electrophoresis-native mass spectrometry for the quality control of therapeutic intact mAbs

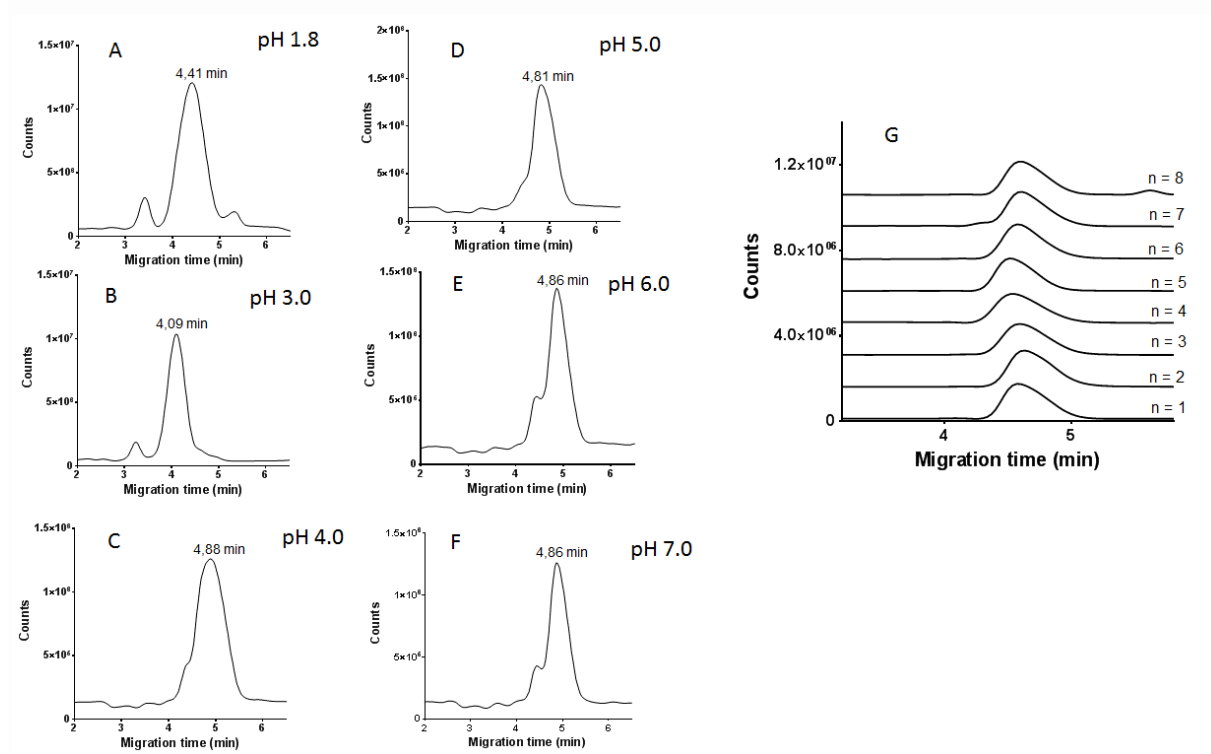
Victor Le-Minh <sup>a</sup>, N.Thuy Tran <sup>a</sup>, Ali Makky <sup>b</sup>, Veronique Rosilio <sup>b</sup>, Myriam Taverna <sup>a</sup>, Claire Smadja<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

<sup>b</sup> Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Surface Physical Chemistry, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

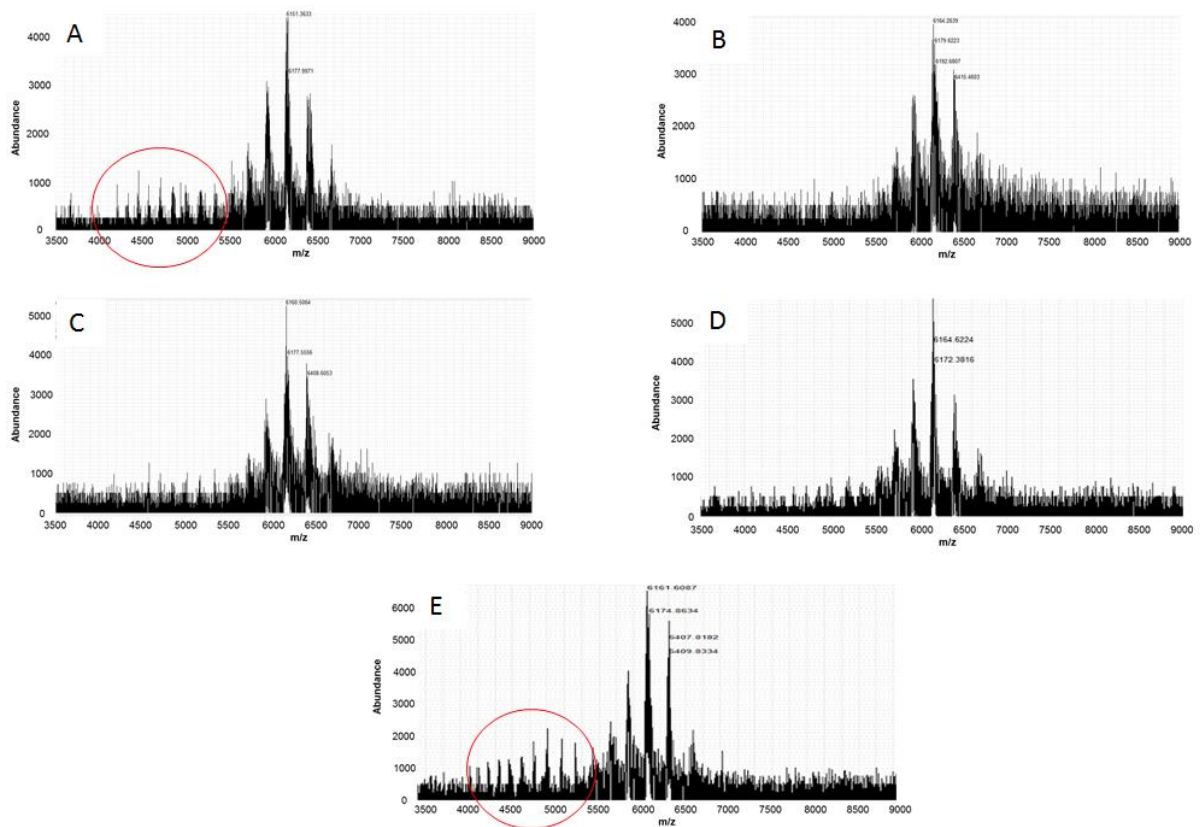
#### Supporting information- S1

**Figure 3.1.S1: Fresh Infliximab:** EIC at different pHs, (A) pH 1.8, (B) pH 3.0, (C) pH 4.0, (D) pH 5.0, (E) pH 6.0, (F) pH 7.0, (G) Repeatability, pH 6.0 (ammonium acetate 40 mM). Other conditions see experimental section.



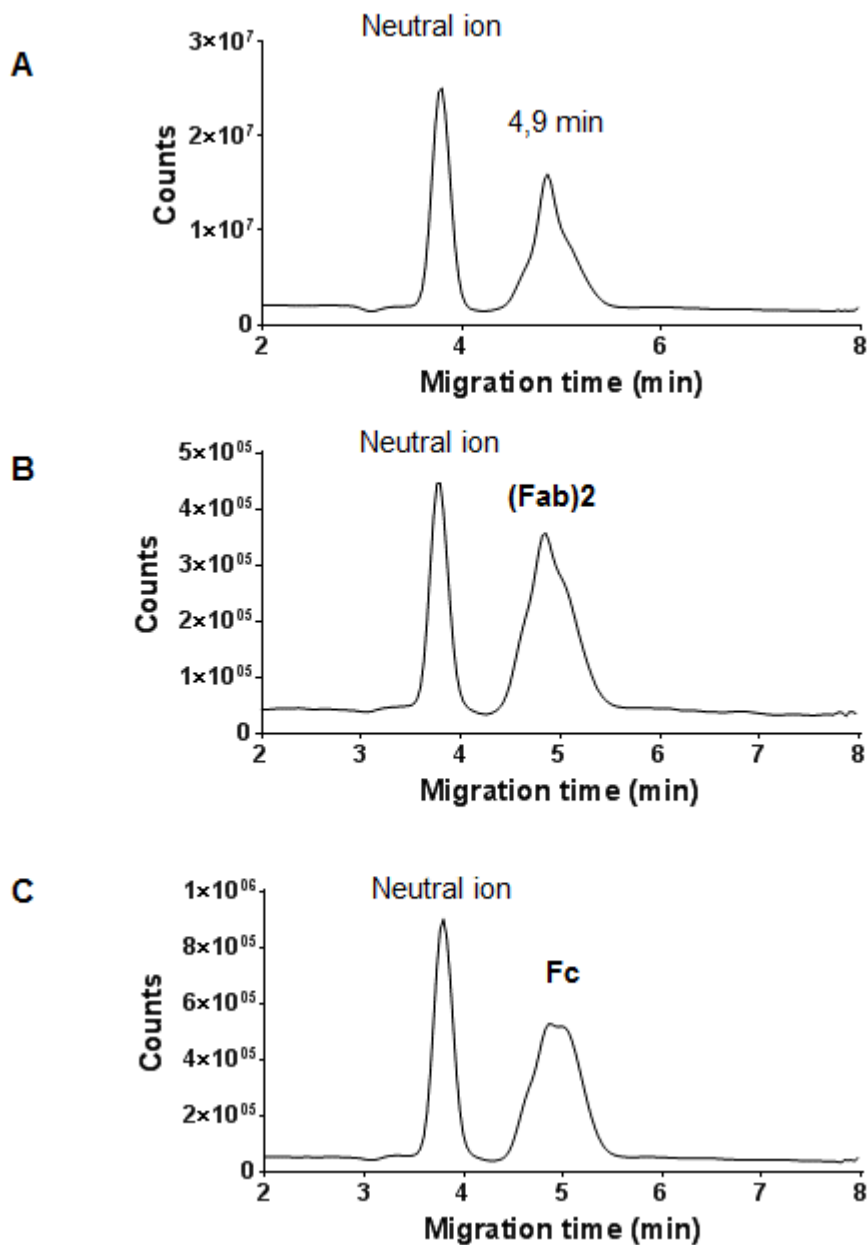
## Supporting information- S2

**Figure 3.1.S2:** Mass spectrum of dialyzed Infliximab (2mg/mL) in direct infusion with different sheath liquid compositions: (A) H<sub>2</sub>O/MeOH (50/50), 10  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , (B) H<sub>2</sub>O/IPA (50/50, v/v), 10  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , (C) H<sub>2</sub>O/IPA/acetic acid (50/50/1, v/v/v), 10  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , (D) H<sub>2</sub>O/IPA/acetic acid (50/50/0.1, v/v/v), 10  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; (E) H<sub>2</sub>O/IPA/acetic acid (50/50/0.1, v/v/v), 20  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Red circles: denatured forms. Other conditions see experimental section.



### Supporting information- S3

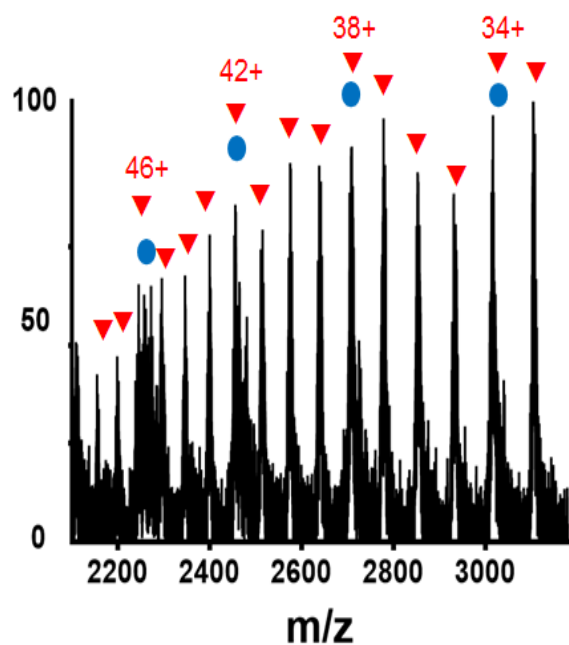
**Figure 3.1.S3:** CZE-MS analysis of IdeS digested Infiximab (A) Total ion current, (B) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  4400-5300 represented for folded (Fab)2 signals, (C) Extracted ion current of  $m/z$  3300-4000 represented for folded Fc signals. Other conditions see experimental section.



### Supporting information- S4

**Figure 3.1.S4:** Mass spectra of IdeS digested Infiximab analyzed by CZE-MS.

Peaks: (●) Folded Fc/2, (▼) denatured F(ab)2



**Table 3.1.S4:** (A) Peaks table of folded Fc/2 in Figure 3.1.5 A;

(B) Peak table of denatured Fab and folded Fc/2 overlaid in Figure 3.1.5 B

(A)

$\sim m/z$	$z$	Peak width (amu)
3039	8	87
2726	9	110
2470	10	66
2258	11	69

(B)

$\sim m/z$	$z$	Peak width (amu)
3104	33	44
3016	34	82
2931	35	51
2852	36	66
2778	37	41
2709	38	86
2638	39	40
2575	40	49
2515	41	42
2456	42	68
2400	43	38
2345	44	43
2274	45	91
2244	46	

## References of Article 1

- [1] D.M. Ecker, S.D. Jones, H.L. Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, *MAbs*. 7 (2015) 9–14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>.
- [2] A.M. Scott, J.P. Allison, J.D. Wolchok, Monoclonal antibodies in cancer therapy, *Cancer Immun.* 12 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380347/> (accessed December 2, 2017).
- [3] K.D. Ratanji, J.P. Derrick, R.J. Dearman, I. Kimber, Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation, *J Immunotoxicol.* 11 (2014) 99–109. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.821564>.
- [4] E.M. Moussa, J.P. Panchal, B.S. Moorthy, J.S. Blum, M.K. Joubert, L.O. Narhi, E.M. Topp, Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates, *J Pharm Sci.* 105 (2016) 417–430. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.002>.
- [5] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianféroni, Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products, *Anal. Chem.* 85 (2013) 715–736. <https://doi.org/10.1021/ac3032355>.
- [6] R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products, *Journal of Chromatography B.* 1032 (2016) 61–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.028>.
- [7] S. Fekete, A.-L. Gassner, S. Rudaz, J. Schappler, D. Guillarme, Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 42 (2013) 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.012>.
- [8] S. Fekete, D. Guillarme, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals, *Anal. Chem.* 88 (2016) 480–507. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04561>.
- [9] R.H. van den Heuvel, A.J. Heck, Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries, *Current Opinion in Chemical Biology.* 8 (2004) 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.08.006>.
- [10] A.C. Leney, A.J.R. Heck, Native Mass Spectrometry: What is in the Name?, *J Am Soc Mass Spectrom.* 28 (2017) 5–13. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1545-3>.
- [11] M. Tassi, J.D. Vos, S. Chatterjee, F. Sobott, J. Bones, S. Eeltink, Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products, *Journal of Separation Science.* 41 (2018) 125–144. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700988>.
- [12] M. Habberger, M. Leiss, A.-K. Heidenreich, O. Pester, G. Hafenmair, M. Hook, L. Bonnington, H. Wegele, M. Haindl, D. Reusch, P. Bulau, Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry, *MAbs.* 8 (2015) 331–339. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1122150>.
- [13] A. Ehkirch, O. Hernandez-Alba, O. Colas, A. Beck, D. Guillarme, S. Cianféroni, Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products, *Journal of Chromatography B.* 1086 (2018) 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.010>.
- [14] T. Ogawa, N. Hirokawa, Multiple analyses of protein dynamics in solution, *Biophys Rev.* 10 (2017) 299–306. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0354-7>.
- [15] C. Wenz, C. Barbas, Á. López-González, A. Garcia, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, T. Blanc, G. Freckleton, P. Britz-McKibbin, M. Shanmuganathan, F. de l’Escaille, J. Far, R. Haselberg, S. Huang, C. Huhn, M. Pattky, D. Michels, S. Mou, F. Yang, C. Neusuess, N. Tromsdorf, E.E.K. Baidoo, J.D. Keasling, S.S. Park, Interlaboratory study to evaluate the robustness of capillary electrophoresis-mass spectrometry for peptide mapping, *J Sep Sci.* 38 (2015) 3262–3270. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500551>.

- [16] E.A. Redman, N.G. Batz, J.S. Mellors, J.M. Ramsey, Integrated microfluidic capillary electrophoresis-electrospray ionization devices with online MS detection for the separation and characterization of intact monoclonal antibody variants, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2264–2272. <https://doi.org/10.1021/ac503964j>.
- [17] M. Han, B.M. Rock, J.T. Pearson, D.A. Rock, Intact mass analysis of monoclonal antibodies by capillary electrophoresis—Mass spectrometry, *Journal of Chromatography B.* 1011 (2016) 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.045>.
- [18] K. Jooß, J. Hühner, S. Kiessig, B. Moritz, C. Neusüß, Two-dimensional capillary zone electrophoresis-mass spectrometry for the characterization of intact monoclonal antibody charge variants, including deamidation products, *Anal Bioanal Chem.* (2017). <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0542-0>.
- [19] A.-L. Marie, G. Rouby, E. Jaccoulet, C. Smadja, N.T. Tran, M. Taverna, Capillary Electrophoresis for the Quality Control of Intact Therapeutic Monoclonal Antibodies, in: *Capillary Electrophoresis Trends and Developments in Pharmaceutical Research*, Pan Stanford, 2017: pp. 305–361. <https://doi.org/10.1201/9781315225388-9>.
- [20] R. Haselberg, T. De Vijlder, R. Heukers, M.J. Smit, E.P. Romijn, G.W. Somsen, E. Domínguez-Vega, Heterogeneity assessment of antibody-derived therapeutics at the intact and middle-up level by low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 1044 (2018) 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.024>.
- [21] J. Giorgetti, A. Lechner, E. Del Nero, A. Beck, Y.-N. François, E. Leize-Wagner, Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. (2018) 1469066718807798. <https://doi.org/10.1177/1469066718807798>.
- [22] A.M. Belov, R. Viner, M.R. Santos, D.M. Horn, M. Bern, B.L. Karger, A.R. Ivanov, Analysis of Proteins, Protein Complexes, and Organellar Proteomes Using Sheathless Capillary Zone Electrophoresis - Native Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2017). <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1781-1>.
- [23] A.M. Belov, L. Zang, R. Sebastiano, M.R. Santos, D.R. Bush, B.L. Karger, A.R. Ivanov, Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry, *Electrophoresis.* 39 (2018) 2069–2082. <https://doi.org/10.1002/elps.201800067>.
- [24] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis of intact basic proteins using noncovalently triple-layer coated capillaries, *J. Sep. Science.* 32 (2009) 2408–2415. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900164>.
- [25] A. San Paulo, R. García, High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes., *Biophys J.* 78 (2000) 1599–1605.
- [26] N.H. Thomson, The substructure of immunoglobulin G resolved to 25kDa using amplitude modulation AFM in air, *Ultramicroscopy.* 105 (2005) 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2005.06.024>.
- [27] A. Makky, T. Berthelot, C. Feraudet-Tarisse, H. Volland, P. Viel, J. Polesel-Maris, Substructures high resolution imaging of individual IgG and IgM antibodies with piezoelectric tuning fork atomic force microscopy, *Sensors and Actuators B: Chemical.* 162 (2012) 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.12.077>.
- [28] A. Makky, L. Bousset, J. Polesel-Maris, R. Melki, Nanomechanical properties of distinct fibrillar polymorphs of the protein  $\alpha$ -synuclein, *Sci Rep.* 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep37970>.
- [29] L. Konermann, D.J. Douglas, Acid-Induced Unfolding of Cytochrome c at Different Methanol Concentrations: Electrospray Ionization Mass Spectrometry Specifically

- Monitors Changes in the Tertiary Structure, *Biochemistry*. 36 (1997) 12296–12302. <https://doi.org/10.1021/bi971266u>.
- [30] J. Fernandez de la Mora, Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism, *Analytica Chimica Acta*. 406 (2000) 93–104. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00601-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00601-7).
- [31] F. Sousa, B. Sarmiento, M.T. Neves-Petersen, Biophysical study of bevacizumab structure and bioactivity under thermal and pH-stresses, *Eur J Pharm Sci*. 105 (2017) 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.019>.
- [32] J.B. Hedges, S. Vahidi, X. Yue, L. Konermann, Effects of Ammonium Bicarbonate on the Electrospray Mass Spectra of Proteins: Evidence for Bubble-Induced Unfolding, *Anal. Chem*. 85 (2013) 6469–6476. <https://doi.org/10.1021/ac401020s>.
- [33] A.-L. Marie, E. Dominguez-Vega, F. Saller, J.-L. Plantier, R. Urbain, D. Borgel, N.T. Tran, G.W. Somsen, M. Taverna, Characterization of conformers and dimers of antithrombin by capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*. 947 (2016) 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.10.016>.
- [34] F. Foret, T.J. Thompson, P. Vouros, B.L. Karger, P. Gebauer, P. Bocek, Liquid Sheath Effects on the Separation of Proteins in Capillary Electrophoresis/Electrospray Mass Spectrometry, (1994). <https://doi.org/10.1021/ac00096a010>.
- [35] C.J. Roberts, Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control, *Trends in Biotechnology*. 32 (2014) 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.005>.
- [36] K. Gunasekaran, M. Pentony, M. Shen, L. Garrett, C. Forte, A. Woodward, S.B. Ng, T. Born, M. Retter, K. Manchulenko, H. Sweet, I.N. Foltz, M. Wittekind, W. Yan, Enhancing Antibody Fc Heterodimer Formation through Electrostatic Steering Effects, *J Biol Chem*. 285 (2010) 19637–19646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.117382>.
- [37] R.J. Rose, A.F. Labrijn, E.T.J. van den Bremer, S. Loverix, I. Lasters, P.H.C. van Berkel, J.G.J. van de Winkel, J. Schuurman, P.W.H.I. Parren, A.J.R. Heck, Quantitative Analysis of the Interaction Strength and Dynamics of Human IgG4 Half Molecules by Native Mass Spectrometry, *Structure*. 19 (2011) 1274–1282. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.06.016>.
- [38] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 °C, *Journal of Chromatography B*. 1048 (2017) 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017>.
- [39] X. Wang, T.K. Das, S.K. Singh, S. Kumar, Potential aggregation prone regions in biotherapeutics, *MAbs*. 1 (2009) 254–267.
- [40] R. Paul, A. Graff-Meyer, H. Stahlberg, M.E. Lauer, A.C. Rufer, H. Beck, A. Briguet, V. Schnaible, T. Buckel, S. Boeckle, Structure and Function of Purified Monoclonal Antibody Dimers Induced by Different Stress Conditions, *Pharm Res*. 29 (2012) 2047–2059. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0732-6>.
- [41] R. Bommana, Q. Chai, C. Schöneich, W.F. Weiss, R. Majumdar, Understanding the Increased Aggregation Propensity of a Light-Exposed IgG1 Monoclonal Antibody Using Hydrogen Exchange Mass Spectrometry, Biophysical Characterization, and Structural Analysis, *J Pharm Sci*. 107 (2018) 1498–1511. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.01.017>.
- [42] F. Plath, P. Ringler, A. Graff-Meyer, H. Stahlberg, M.E. Lauer, A.C. Rufer, M.A. Graewert, D. Svergun, G. Gellermann, C. Finkler, J.O. Stracke, A. Koulov, V. Schnaible, Characterization of mAb dimers reveals predominant dimer forms common in therapeutic mAbs, *MAbs*. 8 (2016) 928–940. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1168960>.
- [43] N.H. Thomson, Imaging the substructure of antibodies with tapping-mode AFM in air: the importance of a water layer on mica, *Journal of Microscopy*. 217 (2005) 193–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01399.x>.

- [44] Y.H. Tan, M. Liu, B. Nolting, J.G. Go, J. Gervay-Hague, G. Liu, A nanoengineering approach for investigation and regulation of protein immobilization, *ACS Nano*. 2 (2008) 2374–2384. <https://doi.org/10.1021/nn800508f>.
- [45] H. Lee, M. Kirchmeier, H. Mach, Monoclonal Antibody Aggregation Intermediates Visualized by Atomic Force Microscopy, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 100 (2011) 416–423. <https://doi.org/10.1002/jps.22279>.
- [46] N.A. Barinov, V.V. Prokhorov, E.V. Dubrovin, D.V. Klinov, AFM visualization at a single-molecule level of denaturated states of proteins on graphite., *Colloids Surf B Biointerfaces*. 146 (2016) 777–784. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.014>.



### Conclusion du chapitre III.1

Les conditions expérimentales ; i.e., le tampon d'analyse par électrophorèse capillaire, les paramètres de spectrométrie de masse ainsi que la composition du « sheath liquid » ont été optimisées afin d'analyser l'infiximab dans des conditions presque « physiologiques ».

La première partie des expériences réalisées en utilisant des échantillons d'infiximab non stressés montrent qu'un tampon d'analyse CE à pH acide (2.8) entraîne une dénaturation des Acms qui est attestée par la présence d'enveloppe avec une grande distribution d'état de charge caractéristique d'une protéine dénaturée. Lorsque le pH est augmenté jusqu'à 7.0, il n'y a plus d'enveloppe correspondant à l'Acm dénaturé, seule une enveloppe correspondant à des Acms à l'état natif est observée.

Dans un deuxième temps, cette méthode ainsi développée a été appliquée à l'analyse d'un échantillon d'infiximab reconstitué préalablement soumis à un stress. Les résultats obtenus ont montré qu'il était possible de séparer et d'identifier en une seule analyse CE-MS les différentes espèces d'anticorps monoclonaux natif, monomère dénaturé et dimères présentes dans l'échantillon. Ces expériences suggèrent également deux types de dénaturation des anticorps. Ces résultats observés sur deux types d'échantillon d'infiximab (soumis ou non à un stress) ont été confirmés par les expériences de microscopie à force atomique (AFM) qui est un outil puissant pour l'imagerie des protéines et de leurs agrégats à haute résolution. L'AFM a permis de visualiser les dimères, les agrégats ainsi que des chaînes protéiques provenant de la dénaturation d'Infiximab.

Dans la dernière partie de ce travail nous avons approfondi notre compréhension des mécanismes de dimérisation après un stockage à 4 °C plus de 6 mois. L'approche middle-up utilisant l'Ides suggère une formation de dimères provenant de l'interaction entre les fragments Fab-Fab des Acms dénaturés.

### III.2. Revêtements statiques pour l'analyse d'Acms thérapeutiques par CZE-native MS

Nous avons montré dans le chapitre expérimental précédent le potentiel de la CZE-couplée à la native MS pour le contrôle qualité d'Acms thérapeutiques. Dans ce travail, nous avons utilisé un revêtement constitué de trois couches successives de PB-DS-PB. Cependant, bien que ce type de revêtement soit aisé à mettre en œuvre il présente plusieurs inconvénients ; (i) la nécessité de plusieurs étapes, ce qui rend le temps de conditionnement long, (ii) une obstruction possible du capillaire, (iii) un couplage avec la spectrométrie de masse difficile. De plus, une possibilité de fuite dans l'appareillage de spectrométrie de masse a également été rapporté. C'est pourquoi, nous avons testé dans ce chapitre expérimental des revêtements statiques covalent ou non.

Aussi, nous nous sommes intéressés à des revêtements stables et compatibles avec la spectrométrie de masse : (i) commerciaux à base de polyacrylamide (PAA) ou de polyvinyl alcohol (PVA) qui sont neutres, (ii) préparés in situ comme le polyéthylènimine (PEI) qui est chargé positivement, (iii) un nouveau copolymère composé de N,N-diméthylacrylamide (DMA) et de monomères ionisables (e.g. glycidyl methacrylate (GMA) and 3-(methacryloyl-oxy)propyl]trimethoxy-silane (MAPS)). Ce polymère innovant sera soit cationique, neutre ou zwitterionique selon le monomère choisi.

Dans une première partie de ce travail une optimisation des conditions d'analyse d'un anticorps thérapeutique modèle, l'infliximab, a été réalisée sur l'ensemble des revêtements à l'aide d'un plan d'expérience. Ceci dans l'objectif d'un couplage de l'EC à la spectrométrie de masse en conditions presque physiologiques. Les paramètres étudiés étaient le pH, la force ionique, l'intensité de la pression additionnelle ainsi que le % d'isopropanol (IPA). Les facteurs de réponses étaient, la surface du pic, le temps de migration ainsi que l'asymétrie du pic.

Dans la deuxième partie de ce travail, une étude a été réalisée à l'aide de l'inflximab pour mettre en évidence le revêtement présentant la meilleure stabilité lorsque cet Acm est analysé en utilisant les conditions expérimentales sélectionnées lors de l'étape précédente. Le revêtement ainsi sélectionné a ensuite été employé pour analyser une dizaine d'Acm thérapeutiques de différents types (i.e. ximab, zumab, mumab), sous types (IgG 1 ou IgG 4), rayon hydrodynamique et présentant différentes propriétés physico-chimiques. Une analyse en composantes principales a été réalisée afin d'évaluer la capacité de ce revêtement à discriminer les différents anticorps thérapeutiques.

La dernière partie de cette étude a porté sur l'analyse de l'inflximab soumis ou non à un stress par l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse.

## Article 2: Covalent-coating capillaries enabling to the analysis of therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis coupled to non-denaturing mass spectrometry

Victor Le-Minh <sup>a</sup>, Emmanuel Jaccoulet <sup>a,b</sup>, Laura Sola <sup>c</sup>, Aurélie Champouillon <sup>a</sup>, N.Thuy Tran <sup>a</sup>, François-Xavier Legrand <sup>d</sup>, Marcella Chiari <sup>c</sup>, Myriam Taverna <sup>a</sup>, Claire Smadja <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institut Galien Paris Sud, UMR CNRS 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

<sup>b</sup> *Hôpital européen Georges Pompidou (HEGP), Service Pharmacie (AP-HP), Paris, France*

<sup>c</sup> *Institute of Chemistry of Molecular Recognition, National Research Council of Italy, Milano, Italy*

<sup>d</sup> *Institut Galien Paris Sud, UMR CNRS 8612, Chemistry and Physic of Multiphase Systems, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

### Article in preparation

#### Abstract

In this study, we investigated for mAbs analysis, a new co-polymer made of N,N-dimethylacrylamide (DMA) and different ionizable monomers (glycidyl methacrylate (GMA) and 3-(methacryloyl-oxy)-propyl]trimethoxy-silane (MAPS)) as neutral, cationic or zwitterionic DMA-GMA-MAPS static coatings for capillary electrophoresis (CE). DMA-GMA-MAPS based coatings were compared to conventional coatings (neutral and cationic) such as polyvinyl alcohol (PVA), polyacrylamide (PAA), and polyethyleneimine (PEI) polymers. A fractional experiment design was first carried out to optimize the background electrolyte (BGE) conditions. Under optimized CE conditions, the neutral DMA-GMA-MAPS exhibited the best performances according to the response evaluation and stability studies. We also demonstrated the potential application of this approach to study the physicochemical properties of the mAbs through the analysis of ten different mAbs by CE-UV. Finally, we illustrated the interest of this neutral DMA-GMA-MAPS coating for Infliximab analysis by CE hyphenated to native MS. This method allowed in a single analysis separation and discrimination of different conformational states and to point out the coexistence of degraded and fragment molecules in a stressed compounded infliximab.

**Key words:** Therapeutic mAbs, DMA-GMA-MAPS, PVA, PAA, CE-native MS, covalent coating capillary

**Highlights:**

- Various covalent coating including different forms of DMA-GMA-MAPS coatings enabling efficient analysis of mAbs in CZE-MS were studied.
- In-depth optimization of the best analytical conditions was conducted using design of experiments.
- The interest of the neutral DMA-GMA-MAPS coating for the analysis of various mAbs in CZE-UV was investigated.
- Successful application on the detection of degraded mAbs with CZE-MS was carried out.

### **III.2.1. Introduction**

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) and related compounds are key topics in pharmaceutical industry with a spectacular growth rate. More than 80 therapeutic mAbs have been approved and over 570 antibody therapeutics are at various clinical phases [1]. Indeed, they are considered as a major class of biopharmaceuticals allowing treatment of life-threatening and severe diseases such as cancers, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis. Immunoglobulin G is the most common form in mAbs. Next to mAbs, bispecific antibodies, antibodies fragments or Fc fusion proteins are also approved [2]. The mAbs and their derivatives are complex glycoproteins with a wide range of potential microheterogeneities due to multi post-translational modifications, denaturation and eventual aggregation [3,4]. This renders mandatory in-depth analytical characterization to ensure their safety, efficacy and quality. For this purpose, analytical characterizations are mainly relied on electrophoretic, chromatographic methods and mass spectrometry [5].

Intact proteins analysis in native mass spectrometry (MS) is an important approach to characterize recombinant therapeutic mAbs nowadays. Up to now, few methods coupling liquid chromatography and native MS, dedicated to mAb analysis, have been proposed. Hydrophobic interaction chromatography coupled to Q-TOF mass spectrometer allowing IgG1 mass determination and small oligomeric form detection have been recently developed [6]. Size exclusion chromatography hyphenated to native IM-MS demonstrated its ability to detect intact trastuzumab and higher ordered structure (dimers, trimers) in pH stressed samples [7]. Simultaneous quantification and identification of a model bispecific antibody by ultra -pressure liquid chromatography size exclusion separation combined with native ESI-mass spectrometry has been performed [8]. However, although LC-native MS provided valuable information concerning mAb charge and size variants, this approach is still challenging because of the secondary interactions of the proteins with the stationary phase.

Capillary electrophoresis (CE) has demonstrated to be an effective method for the separation of proteins is widely applied in biopharmaceutical characterization [9]. Capillary zone electrophoresis (CZE) which has recently attracted attention for mAb characterization and it presents a promising choice for hyphenation to native-MS [10]. It combines high separation efficiency with mass selective detection and analyte characterization. However, mAbs are prone to adsorb into bare fused-silica capillary walls leading to poor resolution, unstable EOF and a lack of reproducibility [9,11]. To overcome these limitations, various capillary coatings, dynamic or static, have been employed for the analysis of therapeutic proteins [12]. Dynamic coatings agents are not compatible for CE-MS coupling since they may enter in the ion source suppressing thereby analytes ionization and leading to contamination of the mass spectrometer. The static coatings, polymer attached to the capillary wall by adsorption or covalent grafting, are preferred for CE-MS analysis [13]. In this line, a promising approach relied on successive multiple ionic polymers layers (SMIL) of oppositely charges has emerged. SMIL developed by Katayama have demonstrated several advantages compared to monolayers such as; (i) improved stability, (ii) enhanced separation efficiency [14]. The capillaries modified by multilayers of electrolytes allowed an efficient separation and analysis of basic proteins by CE [14,15] and CZE-MS [16,17]. The triple-layers polybrene-dextran sulfate-polybrene has also been reported for a development and application in the studies of infliximab stabilities by CZE-native MS [18]. Recently, a five-layer SMIL has been successfully applied for protein analysis in CE [19,20]. However, although SMIL protocols are easily carried out, several drawbacks are observed, e.g., long-time conditioning, capillary clogging and awkward hyphenation with mass spectrometry. Static covalent coatings offer therefore a promising advantage considering their long-term stability and easy implementation in CE-MS despite their laborious preparation.

Several works reported the reduction of protein/mAb adsorption in capillary wall with polymers, neutral (e.g. hydroxypropylcellulose, polyvinyl alcohol (PVA)) or cationic

(polyethyleneimine (PEI)) coatings [11,13,21,22]. Intact therapeutic proteins, e.g. interferon- $\beta$ 1 and mAbs, have been analyzed under denaturing conditions by CZE-MS with a PEI coating [23,24]. Haselberg *et al.*, employed a commercial covalent neutral capillary, pre-coated by polyacrylamide (PAA), to analyze intact and IdeS digested trastuzumab by CZE-MS under denaturing conditions [25]. Intact trastuzumab has been analyzed by CZE-native MS to evaluate its heterogeneity using the same coating by Belov *et al.* [26]. Therefore, it is important to note that despite the various type of static coatings proposed to prevent protein adsorption, only one neutral covalent coating (PAA) has been reported for intact mAb analysis by CZE-native MS (Belov 2018). However, this analysis was performed under an additional pressure of 3 psi which did not allow any separation of the different species present in a stressed mAbs sample for instance. In a mAbs quality control context, a separation method enabling discrimination between potentially degraded mAbs and intact species is mandatory.

Therefore, the present study aimed at investigating various static coatings for CZE-native MS analysis of mAbs allowing discrimination between denatured and folded, and analysis reproducibility in a quality control context. For this purpose, infliximab behavior has been evaluated on various coatings including two covalent commercial neutral coatings (PAA, PVA) and a cationic PEI coating. Similarly, a new tunable polymeric coating, which self-adsorbed on the inner capillary wall and it is able to regulate EOF intensity has been also studied [27]. This co-polymer is made of N,N-dimethylacrylamide (DMA), glycidyl methacrylate (GMA) that assure adsorption on the capillary wall, 3-(methacryloyl-oxy)-propyl]trimethoxy-silane (MAPS) that increases the stability of the coating by promoting the condensation of the polymer with surface silanols and different ionizable monomers (weak acrylamido acids and bases commercially available under the trade name of Immobilines) that confer to the polymer backbone a pH dependent negative or positive charge [28]. The Immobilines, widely employed in the Isoelectric focusing in immobilized pH gradients (IEF-IPG) technique, can modulate the surface charge density in a highly predictable manner,



according to the Henderson-Hasselbalch equation. For example, when the Immobiline pKa8.5 is added to the polymer backbone, it shows a net positive charge in acidic conditions, which decreases while increasing the buffer pH and approaches the neutrality in buffers with pH values higher than 8.5. These coatings are easily prepared, stable and have demonstrated their reusability and potential compatibility with MS [29]. A fractional design of experiment has been established to find the optimal conditions compatible with non-denaturing MS for infliximab analysis. The coating exhibiting the best stability has been tested with various therapeutic mAbs and the CE coupling with native MS has been evaluated for stressed infliximab sample.

### **III.2.2. Materials and methods**

#### **III.2.2.1. Chemicals**

Water ultrapure, iso-propanol, methanol, acetic acid, and ammonium hydroxide 28% (all LC-MS grade) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO), ammonium bicarbonate, ammonium sulfate (reagent grade) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). PEI polymer solution was purchased from Fluorochem (Derbyshire, UK). NaCl was obtained from Phenomenex (Torrance, CA, USA). NaOH 1N, HCl 1N, ethanol 98% (all reagent grade) were obtained from VWR (Radnor, PA, USA). Deionized water used in coated capillary preparation and CE-UV experiments was purified using a Direct-Q3 UV purification system (Millipore, Milford, MA, USA). 0.9 % NaCl saline bag FreeFlex®, sterile PVC bag was from Fresenius Kabi (50 mL, Fresenius Kabi, France). N,N-dimethylacrylamide (DMA), glycidyl methacrylate (GMA) and 3-(methacryloyl-oxy)-propyl]trimethoxy-silane (MAPS) polymers were kindly provided by L. Sola and M. Chiari from Institute of Chemistry of Molecular Recognition (Italy).

#### **III.2.2.2. Monoclonal antibodies**

Ten commercially therapeutic monoclonal antibodies were used: bevacizumab (25 mg/mL, Avastin), pertuzumab (30 mg/mL, Perjeta), rituximab (10mg/mL, Mabthera) and trastuzumab (150 mg, Herceptin) were purchased from Roche (Switzerland); infliximab (100 mg, Inflectra) was from Pfizer (USA). Nivolumab (10 mg/mL, Opdivo), ipilimumab (5mg/mL, Yervoy) were from Bristol-Myers Squibb (USA). Pembrolizumab (25 mg/mL, Keytruda) was purchased from Merck Sharp & Dohme (UK). Adalimumab (50 mg/mL, Humira) was from Abbott (USA) and natalizumab (20mg/mL, Tysabri) was from Biogen (USA).

### **III.2.2.3. Instrumentations**

#### **III.2.2.3.1. CE – UV instrumentation**

CE-UV experiments were carried out with an MDQ CE instrument (Sciex Separation, Brea, CA, USA) equipped with a UV detector. A coated capillary of 60 cm total length (50 cm effective length) was used. The capillary was rinsed by BGE at 14 psi for 5 min before each run. Sample hydrodynamic injection was performed at 0.5 psi for 10 s (i.e., 0.083 % of total capillary volume). The mAb detection and separation temperature were set at 214 nm and 25 °C, respectively. The 32 karat software (Sciex Separation, Brea, CA, USA) was employed to analyze the CE-UV data.

#### **III.2.2.3.2. CE-MS instrument**

CE-MS experiments were performed using a 7100 Agilent capillary electrophoresis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A 65-cm coated capillary was used. The hydrodynamic injection was performed at 1.43 psi for 60 s (i.e., 10% of the total capillary volume). The analysis was performed under 20 kV and an additional pressure of 0.58 psi.

The sheath-flow interface was used to connect the outlet of the CE to ESI-QTOF mass spectrometer (Agilent QTOF 6540). The sheath liquid was a mixture of water-isopropanol-acetic acid 50:50:0.1 (v/v/v) and delivered at a flow rate of 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . The positive ionization mode was chosen. Nebulizer pressure was set at 10 psi. Flow rate and temperature of sheath gas ( $\text{N}_2$ ) were set at 6  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  and 100 °C, respectively. A drying gas temperature of 250 °C and drying gas flow ( $\text{N}_2$ ) at 8  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  were used. Transferred capillary, nozzle, fragmentor and skimmer voltages were set at 3000 V, 2000 V, 300 V, and 150 V respectively. Profile mass spectra were collected from 1500 to 7500  $m/z$  with an acquisition rate of 0.5 spectrum. $\cdot\text{s}^{-1}$ . Agilent Mass Hunter B.07.00 software was employed to analyze the MS data.

#### **III.2.2.4. Coating preparation**

*Commercial coated capillaries:* The PVA and PAA capillaries were purchased from Beckman Coulter (Sciex Separation, Brea, CA, USA).

*DMA-GMA-MAPS coated capillaries (positive, neutral and zwitterionic):* Fused-silica capillary (50  $\mu\text{m}$  I.D.) obtained from Phymep (Paris, France) was used to prepare the DMA-GMA-MAPS coating. The silica fused capillary was pretreated by a rinsing at 40 psi employing the CE MDQ instrument with ethanol 98% (4 minutes), deionized water (2 minutes), 1M NaOH (4 minutes), deionized water (4 minutes), 0.1M HCl (4 minutes) and deionized water (8 minutes), respectively. Additionally, the capillary was incubated for 30 minutes after each previous rinsing step with ethanol, 1M NaOH and 0.1 M HCl. The solutions of DMA-GMA-MAPS polymers were subsequently prepared and used to coat the inner capillary wall following the protocol adapted from Sola L. *et al.* [27]. Briefly poly(DMA-GMA-MAPS) (namely neutral coating) poly(DMA-GMA-MAPS- Immobiline  $\text{pK}_a8.5$ ) (namely positive coating) and poly(DMA-GMA-MAPS-Immobiline  $\text{pK}_a8.5$ - Immobiline  $\text{pK}_a3.6$ ) (namely zwitterionic coating) were dissolved in DI water to obtain a final concentration of 2% w/v and then diluted 1:1 with a solution of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.6 M. The resulting solutions were pumped into the pre-treated capillaries for 10 min at room temperature. The flow was then stopped, and the solutions were allowed to remain in the capillaries for an additional 15 min. Finally, the capillaries were rinsed with DI water, emptied using a positive pressure and cured at 80°C for 30 min.

*PEI coated capillary:* The preparation of silica capillary tubes with a cross-linked coating PEI was adapted from Bush *et al.* method [23].

#### **III.2.2.5. mAb preparation**

*mAbs preparation for CZE-UV analysis*

Lyophilized mAbs (infliximab, trastuzumab) were first reconstituted with sterile water for injection to reach the manufacturer required concentration, (infliximab and trastuzumab at 10 mg.mL<sup>-1</sup> and 21 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively). Each mAb solution (including infliximab, trastuzumab and other mAbs) were then diluted from their respective marketed solutions using 0.9% NaCl solution to reach a final concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup>. The compounded mAb solutions were stored at 4° C and protected from light. Compounding and sampling from the bags were performed with sterile oil-free syringes and needles, under aseptic conditions using a laminar flow hood.

#### *Infliximab preparation for CZE-MS analysis*

The infliximab solution at 10 mg.mL<sup>-1</sup> (getting from above protocol) was first diluted in deionized water to 2 mg.mL<sup>-1</sup> and was further dialyzed using a 10 kDa molecular weight cut-off Slide-A-Lyzer cassette (Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA) against water for 4h at room temperature to remove the excipients in formulated infliximab.

#### *Stressed Infliximab protocol*

Dialyzed infliximab solutions (2 mg.mL<sup>-1</sup>) was radiated by UV 365 nm with the UV BiolinkBLX (Fischer Scientific, MA, USA) for 10 hours then subsequently agitated at 37°C and 600 rpm during 2 hours employing Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany).

#### **III.2.2.6. EOF measurement**

The EOF was estimated at different pH values using different running buffers: ammonium acetate (40 mM, pH 4.0-5.0) and ammonium carbonate (40 mM, pH 6.0-8.0). The applied voltage was -30 kV for PEI capillary and +30 kV for PVA, PAA, DMA-GMA-MAPS capillaries. DMSO 0.1% (v/v) in water was used as a neutral marker. For most coating, except PEI, EOF was measured and calculated following William and Vigh method [30].

### III.2.2.7. Optimization of BGE conditions

A three level, four factors was designed to optimize analysis conditions for infliximab by CZE-UV. The factors considered were pH, ionic strength (IS), additional pressure (Pa), and isopropanol (IPA) percentage. The studied responses were the peak capacity, peak asymmetry and peak area. The relation between the selected responses Y and the coded variables Xi that is related to the factors was expressed as equation:

$$Y = constant + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=2}^4 b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 \sum_{k=3}^4 b_{ijk} X_i X_j X_k + b_{ijkl} X_1 X_2 X_3 X_4$$

where  $b_i$ ;  $b_{ij}$ ;  $b_{ijk}$  and  $b_{ijkl}$  are the estimation of the effects of the main factor; first order of interaction; second order and third order of interaction, respectively.

The design and statistical analysis were performed using Minitab 17 software (Minitab, PA, USA) for the evaluation of the influence of the factors on the selected responses.

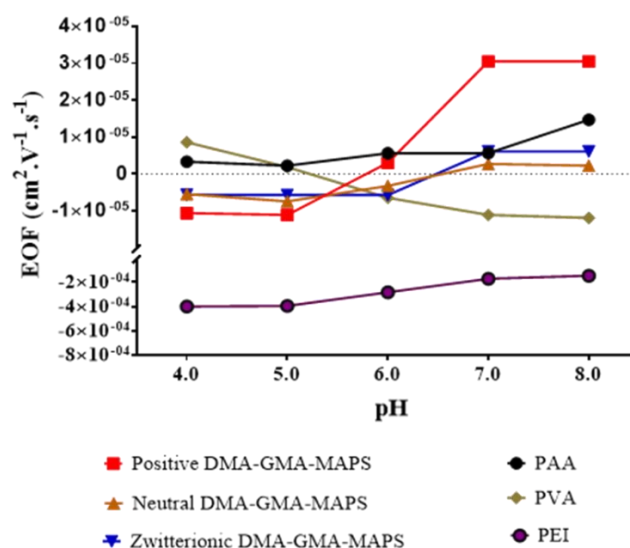
### III.2.2.8. Multivariate analysis

A factorial analysis of mixed data (PCAMix), which enables the association of continuous and categorical variables was carried out to provide an overview of the mAbs (n = 10) behavior in CZE analysis. The physicochemical properties included in the PCAMix were; electrophoretic mobility ( $\mu_{ep}$ ), mean hydrodynamic radius (Rh), retention factor (Rf), theoretical molecular weight (MW), and isoelectric point (pI). The Rh compounded mAbs was measured with a Nanosizer (Malvern Panalytical, UK) using a protein-free cuvette Eppendorf UVette (Eppendorf, Hamburg, Germany). The Rh measurements were performed three times for each mAb and under at 25°C. While pI and retention factor (Rf) were obtained from Goyon *et al.* publications [31,32] (Supporting information – Table 3.2.S4). The quantitative data were mean- centered before to the analysis. The mAbs type (i.e., ximab to mumab) was the qualitative variables. PCAMix was conducted using XLStat data analysis software (Addinsoft, NY, USA).

### III.2.3. Results and discussion

#### III.2.3.1. Coated capillaries: EOF measurements

This study aims at developing a stable coated capillary allowing mAbs analysis by CZE-non denaturing MS. Therefore, only buffers compatible with MS (ammonium acetate and ammonium carbonate) have been employed in this work. Six different capillaries were investigated including two commercial neutral coated capillaries (PVA, PAA), one *in-situ* positive coated capillary (PEI), and three *in-situ* coated DMA-GMA-MAPS capillaries different pH-dependent net charges (positive, neutral and zwitterionic).



**Figure 3.2.1:** Experimentally measured EOF of 6 coated capillaries at different pH of BGE ranged from pH 4.0-8.0.

Amongst these capillaries, only PEI showed a strong reversed EOF varying from  $-2 \times 10^{-4}$  to  $-4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , from pH 8.0 to 4.0 (Figure 3.2.1). This strong EOF was related to the positive charge coating. We can state from the weak eof modification over the pH range that the coating is stable. For the other capillaries, weak EOF mobilities varying from  $-1.2 \times 10^{-5}$  to  $3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  was observed. This could be explained by the neutral nature or the weak charge density of the coatings. The positive DMA-GMA-MAPS coating exhibited the higher EOF mobility as compared

to the other coated capillaries at BGE pH 7.0-8.0. Reverse EOF observed for DMA-GMA-MAPS and PVA coatings, could be related to free silanols groups.

### **III.2.3.2. Optimization of the CE conditions**

Optimization of the CE conditions was conducted to prevent adsorption of the mAbs onto the inner coated capillary wall that may cause surface modification and thereby a lack of analysis reproducibility. Infliximab ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $\text{pI} = 7.6$ ) was chosen as mAbs model. The criteria for the evaluation of the coatings and the different parameters influencing the CE analysis were the RSDs of the peak areas and migration times.

#### **III.2.3.2.1. Preliminary study**

##### *Selection of the capillary coating*

For capillaries exhibiting low EOF (Method 1 - Table 3.2.1) (i.e. all the coating except PEI), an additional hydrodynamic pressure (0.2 psi) was applied in order to reduce the analysis time. The capillaries were rinsed with ten capillary volumes of the ammonium acetate buffer 40 mM, pH 5.0 between each run. The results of the RSDs for infliximab analysis are depicted in Table 3.2.1.

High RSDs of the peak area were observed whatever the coatings employed was. Regarding the migration time ( $T_m$ ), only neutral and positive DMA-GMA-MAPS coatings showed a relatively low RSD (<5%) while the other capillaries showed much higher RSDs (> 5 %). For zwitterionic DMA-GMA-MAPS coating, a high RSD of both  $T_m$  and peak area was observed. Such poor RSD could be due to the co-presence of positive and negative charges on this coating. The charges may promote strong adsorption of infliximab on the coating through electrostatic interactions, leading to poor repeatability. Consequently, the zwitterionic DMA-GMA-MAPS coating was not further studied in the following experiments.



**Table 3.2.1:** Infliximab 1mg.mL<sup>-1</sup> analysis by CZE-UV with 6 coated capillaries. Method 1: BGE of 40 mM ammonium acetate pH 5.0; l = 10 cm; L = 60 cm; injection of 1% Vo; detection 214 nm; voltage 30 kV; additional pressure 0.2 psi. Method 2: BGE of 40 mM ammonium acetate pH 5.0; l = 50 cm; L = 60 cm; injection of 1% Vo; detection 214 nm; voltage -20 kV

Coating	Analysis method	BGE rinsing (n=18)		Additional rinsing (IPA:100 mM acetic acid, 10/90, v/v) (n=6)	
		RSD Tm	RSD Area	RSD Tm	RSD Area
PAA	1 (Low EOF)	13.41%	10.39%	0.32%	1.67%
PVA	1 (Low EOF)	14.66%	10.71%	1.11%	3.61%
Neutral DMA-GMA-MAPS	1 (Low EOF)	1.84%	19.28%	0.79%	4.73%
Positive DMA-GMA-MAPS	1 (Low EOF)	2.51%	7.73%	1.35%	5.33%
Zwitterionic DMA-GMA-MAPS	1 (Low EOF)	42.41%	34.10%	-	-
PEI	2 (Low EOF)	5.67%	31.15%	0.59%	17.00%

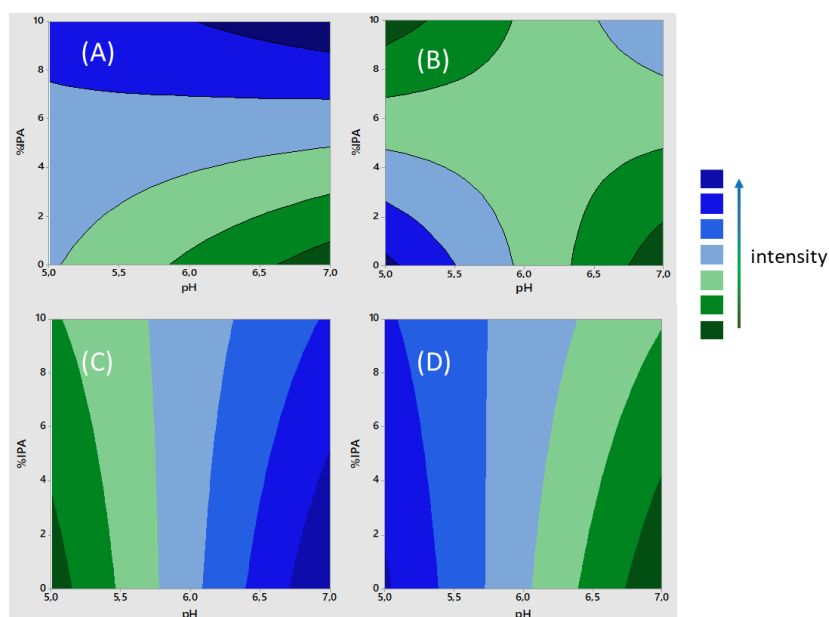
#### *Rinsing condition*

Typical rinses with HCl or NaOH solutions were not suitable due to a lack of compatibility with either working pH range of coated capillaries or mass spectrometry. Rinsing the capillary with the BGE solution was tested and led to poor repeatability, as shown in Table 3.2.1. To improve the repeatability, an organic solvent was tested. Rinsing the capillary with a solution of isopropanol:100mM acetic acid (10/90, v/v) at pH ~ 3.0 after each analysis, improve the repeatability with a Tm RSD (n = 6) at less than 2 % for all the capillaries (Table 3.2.1). In terms of peak area, PAA capillary exhibited the best RSD (1.67%) compared to other capillaries. Such results are in agreement with previous studies where acidic BGE solutions containing low organic solvent percentage were employed to reduce protein adsorption in capillary wall [33]. However, PEI capillary still exhibits a high peak area RSD (17.00 %) despite this additional rinsing step and was consequently excluded from the study.

### III.2.3.2.2. Optimization by a Design of Experiments

The study was performed for the four low-EOF capillaries (PVA, PAA, neutral DMA-GMA-MAPS and positive DMA-GMA-MAPS) with the ammonium acetate buffer [34]. A fractional factorial design of experiments (FFD) has been conducted to define conditions limiting mAbs adsorption. The factors selected for the DoE were; pH (5.0 to 7.0), ionic strength (20 to 60 mM), additional pressure (0.4 to 0.8 psi) and IPA % in BGE (0 to 10 %). The considered response factors were; peak area, peak capacity, and peak asymmetry calculated at 10% of the peak height of infliximab in CZE-UV analysis. This fractional factorial design ( $2^{4-1}$ ) has been performed in duplicate for each experiment (Supporting Information-Table 3.2.S1). The normalized results of the experimental design were evaluated at a confidence level of 95% with the p-values and  $R^2$  (Supporting information-Table 3.2.S2-S3).  $R^2$  according to the responses and particularly for peak area ( $R^2 > 0.884$ ) indicate a good fit of the models. The results showed that factors at high value induced a positive impact on peak capacity and peak asymmetry in all the coatings, except neutral DMA-GMA-MAPS where a negative influence of the pH on peak capacity was observed. We can conclude that, higher IS, Pa and % IPA lead to better peak capacity and low peak asymmetry. Therefore IS 60 mM ammonium acetate and 0.5 psi assisted pressure were chosen as a compromise between time analysis and resolution. To determine the optimum pH and % IPA for BGE, the influence of these two factors on peak area has been investigated with the four coatings (PVA, PAA, neutral DMA-GMA-MAPS and positive DMA-GMA-MAPS). Figure 3.2.2 contour plots of peak area versus pH and % IPA highlight infliximab behavior according to each type of capillary. The best compromise for PAA, neutral and positive DMA-GMA-MAPS coatings was obtained at pH 6 and 5% IPA (Figure 3.2.2 A, C, D). Higher % IPA and pH close to pI were excluded considering their detrimental effect on mAb ionization and thereby their detection sensitivity under native-MS analysis. For PVA, the best result is obtained at low % IPA and low pH (Figure 3.2.2 B). However, in these conditions, mAbs could interact more easily with the capillary wall. Therefore, a BGE, at

60 mM ammonium acetate, with pH 5.8 and 5% IPA and 0.5 additional pressure has been chosen for the following experiments.



**Figure 3.2.2:** Contour plots of infliximab Area vs pH and %IPA under fixed conditions of ammonium acetate ionic strength and additional pressure at 60 mM and 0.5 psi, respectively with (A) PAA (B), PVA (C), neutral DMA-GMA-MAPS, and (D) positive DMA-GMA-MAPS coatings. This BGE provided a good buffer capacity (9.3 mmol/l.pH) and could maintain the native-like state of mAbs (low IPA amount and near neutral pH).

### III.2.3.3. Capillaries stability

In order to evaluate the stability of these coating for mAbs analysis in non-denaturing conditions, three series of infliximab analyses have been performed three consecutive days (20 analysis on the first day and six analysis at day 2 and 3) (Figure 3.2.3). The results showed a satisfactory  $T_m$   $RSD_{intraday}$  and  $RSD_{interday}$  for most of the capillaries. For the Peak area  $RSD$  ( $n = 6$ ), PAA, positive DMA-GMA-MAPS and neutral DMA-GMA-MAPS coatings exhibited low variability ( $< 5\%$ ) whereas PVA capillary, exhibited a very high variability (14.56%). Therefore, considering  $RSD$  for  $T_m$  (1.48; 0,44; for intra-day and inter-day respectively) peak area (4.5), and peak asymmetry (1.46), compared to other coatings, neutral DMA-GMA-MAPS has been chosen for the following

experiments (Table 3.2.2). The low RSD of neutral DMA-GMA-MAPS is very likely due to its anti-fouling properties, which prevents interactions of the samples with the capillary wall.

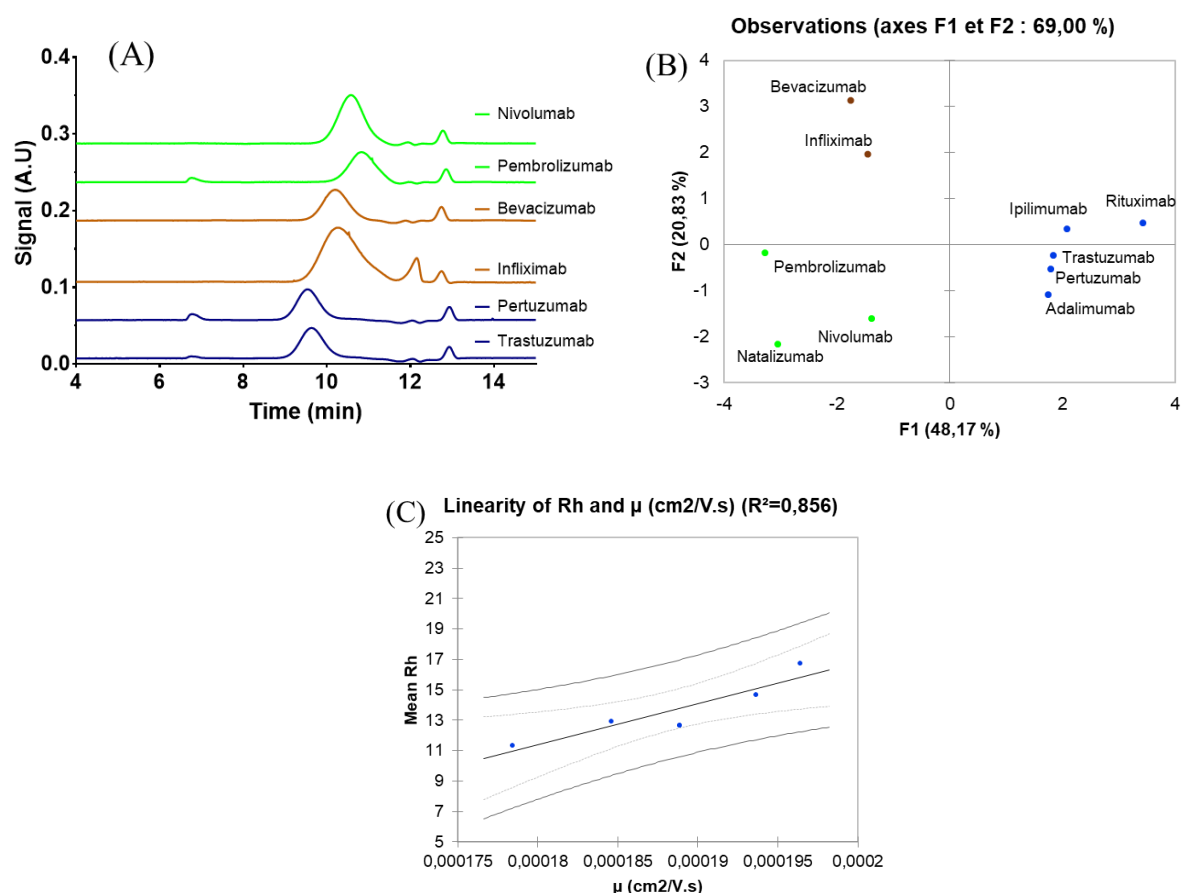
**Table 3.2.2:** Results of infliximab analysis with CZE-UV under optimized BGE conditions with different coated capillaries

Capillary	PAA	PVA	Positive DMA-GMA-MAPS	Neutral DMA-GMA-MAPS
T <sub>m</sub> (RSD %) - intraday (n=20)	1.21	1.36	0.96	1.48
T <sub>m</sub> (RSD %) - interday (n=32)	2.47	3.77	0.63	0.44
Area (RSD %) – day 2 (n=6)	4.94	14.56	4.44	4.50
Corrected Area	1.93	1.61	1.52	4.7
Peak asymmetry	3.80	2.80	3.10	1.46

#### III.2.3.4. Application to the analysis of different mAbs

Ten mAbs (nivolumab, pembrolizumab, bevacizumab, infliximab, pertuzumab, trastuzumab, ipilimumab, rituximab, adalimumab, and natalizumab) with different physico-chemical properties (Supporting information - Table 3.2.S4) [31] were tested under the optimized CE conditions with the neutral DMA-GMA-MAPS coating. Figure 3.2.4 A shows the sharp peaks with different migration times obtained for mAbs. Indeed, the coating exhibits a low EOF which is negligible compared to the 0.5 psi additional pressure of the buffer flow. Meanwhile, the mAbs with higher pI (e.g., rituximab, pertuzumab) exhibited higher  $\mu_{ep}$  at pH 5.8 leading thereby to low migration times (9.6 min). In contrast, nivolumab and pembrolizumab, with a lower pI, exhibited lower  $\mu_{ep}$ , and thereby high migration times (10.8 min). To explain CZE mechanisms, a PCAMix was performed from the qualitative and quantitative data of the mAbs. Data gathered electrophoretic mobility, hydrodynamic radius, molecular weight, isoelectric point, hydrophobicity, mAbs type (i.e. zumab, mumab), and IgG subclasses. As a result, three clusters of mAbs were obtained in the PC1 (48.2 %) - PC2 (20.8 %) score-plot (Figure 3.2.4 B): two main groups were separated on PC1 axis according

to their basicity. Indeed, rituximab typically belongs to the high  $pI$  group ( $pI = 9.4$ ), while pembrolizumab and infliximab are from the lower one ( $pI = 7.6$ ). Among the less basic mAbs, two other groups were formed on the PC2 axis according to the hydrodynamic radius  $R_h$  where bevacizumab (16.73 nm) and infliximab (14.65 nm) were discriminated from pembrolizumab, nivolumab, and natalizumab (12.91, 12.67, 11.34 nm respectively).



**Figure 3.2.4:** CZE-UV analysis of 10 mAbs with neutral DMA-GMA-MAPS coating under optimized CE conditions. (A) Electropherograms of the analysis; (B) PCAMix score-plot (PC1-PC2) of the data of the 10 mAbs. The colors assigned to the mAbs were arbitrary to provide a clear representation of the four groups of mAb; (C) the correlation between  $R_h$  and  $\mu_{ep}$  of the low  $pI$  mAbs. All the data were normalized before PCA. Experimental conditions, as mentioned in Figure 3.2.3.

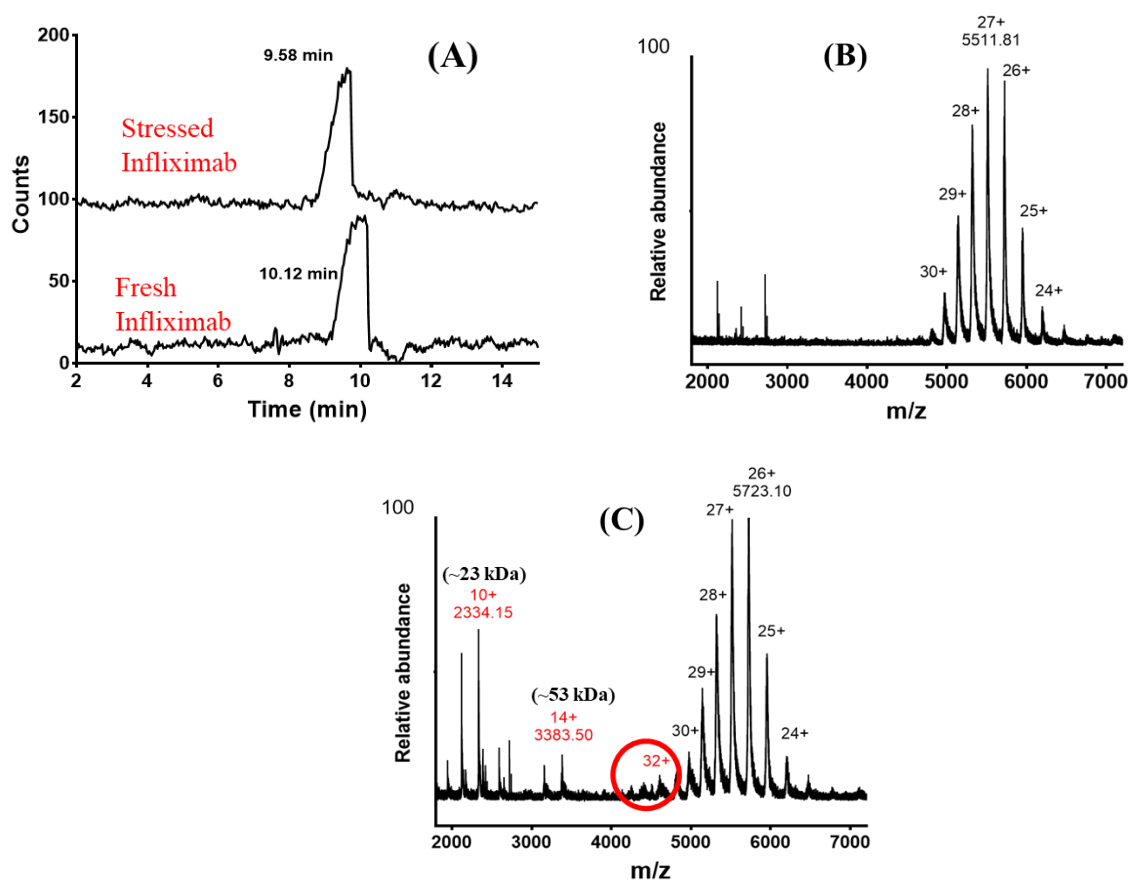
The PCAMix also suggested that, under the optimized CZE conditions, mAbs were separated according to their basicity (i.e.,  $pI$ ) much more than their size ( $R_h$ ) except with low  $pI$  mAbs. The  $pI$  and the  $R_h$  as a function of the mean electrophoretic migrations ( $\mu_{ep}$ ) were analyzed. A good

correlation between the  $pI$  and  $\mu_{ep}$  ( $R^2 = 0.950$ ) was obtained (data not shown). For the Rh, the correlation was not significant ( $R^2 = 0.201$ ) considering all the mAbs, but improved ( $R^2 = 0.808$ ) when only low  $pI$  mAbs are considered (Figure 3.2.4 C). Also, the PC1-PC2 score-plot (Figure 3.2.4 B) shows discrimination between the IgG1 and IgG4 mAbs (e.g., bevacizumab and pembrolizumab) having low  $pI$  along the PC2 axis. In conclusion, these experiments indicate the potential of the neutral DMA-GMA-MAPS coating for mAb analysis concerning their properties and separation purposes.

### III.2.3.5. Antibody analysis by CE-MS

The neutral DMA-GMA-MAPS capillary has been employed to characterize fresh and dialyzed infliximab by CZE-MS with developed conditions using 60 mM ammonium acetate at pH 5.8 with 5% of IPA. A CE-ESI-MS with sheath liquid interface was employed. The conditions of sheath liquid and MS was adopted from Le-Minh et al. [18]. Stressed (UV 365nm and mechanical) and fresh infliximab showed a slight  $T_m$  difference (9.58 min VS 10.12 min) in CE-MS analysis (Figure 3.2.5 A). The mass spectrum of fresh infliximab exhibited a narrow charge state distribution centering at 27+ with mass-to-charge ( $m/z$ ) ranging from 4800 to 6500  $m/z$  that represents the folded native state of mAbs (Figure 3.2.5 B). The mass spectrum of the peak at 9.58 min showed a main envelope of folded infliximab that was centered at 26+ charge. Denatured infliximab and fragments have also been detected in the stressed samples. The higher charge signals detected (> 31+) would partly correspond to the unfolded monomer (red circle, Figure 3.2.5 C). Two other envelopes were detected with the  $m/z$  ranging from 2000  $m/z$  to 2800  $m/z$  and from 3100  $m/z$  to 3500  $m/z$ . Deconvoluted mass of these envelopes showed two molecules at 23 kDa and 53 kDa that could correspond to infliximab fragments (charges centering at 10+ and 14+, respectively) (Figure 3.2.5 C). Mainly, all these molecules comigrated and were unable to be separated in this capillary. That may be explained by the weak separation capacity of volatile BGE and by the application of assisted

pressure. Nevertheless, these different conformational states have been separated and discriminated thank to MS using non-denaturing conditions.



**Figure 3.2.5:** Neutral DMA-GMA-MAPS capillary coating for CZE coupled to non-denaturing MS, (A) Electropherograms of fresh and stressed infliximab; (B) Mass spectrum of fresh infliximab; (C) Mass spectrum of stressed infliximab. CE conditions: length 65 cm; voltage 20 kV; 0.58 psi additional pressure; temperature 20°C. MS conditions: drying gas. 250 °C – 8 L min<sup>-1</sup>; sheath gas 100°C – 6L min<sup>-1</sup>; nebulizer pressure 10 psig; transferred capillary, nozzle, fragmentor and skimmer voltages were set at 3000 V, 2000 V, 300 V and 150 V respectively; Sheath liquid: 10 μL.min<sup>-1</sup> acetic acid/isopropanol/ water 1:50:50 (v/v/v).

### **III.2.4. Conclusion**

We have studied multiple covalent in-situ prepared and commercial coatings enabling the analysis of the mAbs by CZE and CZE-MS in non-denaturing conditions. The stability and method optimization performed for each coated capillary showed the interaction and the dramatic influence between the factors and especially the pH and the % IPA for mAbs analysis. The neutral DMA-GMA-MAPS coating demonstrated excellent stability and high reliability leading to the analysis of the behavior of therapeutic mAbs through CZE-UV. Moreover, such coating allows the successful characterization of native and degraded infliximab by CZE-MS. Neutral DMA-GMA-MAPS coating for CZE-native MS application offers high potential for the characterization of other mAbs and other therapeutic proteins.



### **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interest.

### **Acknowledgments**

We thank the Ecole doctorale “Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes” which provided the financial support for Le-Minh as a fellowship.

This work was supported in part by ITAAM project (Grant ANR-10-LABX-33 as member of the Laboratory of Excellence LERMIT)

### **Corresponding author:**

Prof. Claire Smadja, Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay.

[claire.smadja@u-psud.fr](mailto:claire.smadja@u-psud.fr)

Telephone: 0033146835942

### III.2.5. Supporting Information

#### Covalent-coating capillaries enabling to the analysis of therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis coupled to non-denaturing mass spectrometry

Victor Le-Minh <sup>a</sup>, Emmanuel Jaccoulet <sup>a,b</sup>, Laura Sola <sup>c</sup>, Aurélie Champouillon <sup>a</sup>, N.Thuy Tran <sup>a</sup>, François-Xavier Legrand <sup>d</sup>, Marcella Chiari <sup>c</sup>, Myriam Taverna <sup>a</sup>, Claire Smadja <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institut Galien Paris Sud, UMR CNRS 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

<sup>b</sup> *Hôpital européen Georges Pompidou (HEGP), Service Pharmacie (AP-HP), Paris, France*

<sup>c</sup> *Institute of Chemistry of Molecular Recognition, National Research Council of Italy, Milano, Italy*

<sup>d</sup> *Institut Galien Paris Sud, UMR CNRS 8612, Chemistry and Physic of Multiphase Systems, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

**Table 3.2.S1:** Fractional factorial design of 4 factors ( $2^{4-1}$ ) applied for capillaries for the optimization of BGE conditions

Run (x2)	pH	IS (mM)	Pa (psi)	IPA (%)
1	5.0	20	0.4	0
2	7.0	20	0.4	10
3	5.0	60	0.4	10
4	7.0	60	0.4	0
5	5.0	20	0.8	10
6	7.0	20	0.8	0
7	5.0	60	0.8	0
8	7.0	60	0.8	10
9	6.0	40	0.6	5

pH; IS: ionic strength; Pa: additional pressure; IPA: isopropanol

**Table 3.2.S2:** Statistical analysis of results from the experimental design - p value of the influences of the factors on responses

Capillary	Factors	p-value		
		Peak asymmetry	Peak capacity	Area
PAA	pH	<0.001 (-)	0.001 (+)	0.011 (+)
	IS	<0.001 (-)	<0.001	0.688 (-)
	Pa	0.002 (-)	<0.001 (+)	<0.001 (-)
	%IPA	0.01 (-)	0.22 (+)	<0.001 (+)
PVA	pH	0.008 (-)	0.006 (+)	0.001 (+)
	IS	0.033 (-)	<0.001 (+)	0.003 (-)
	Pa	0.699 (+)	0.003 (+)	0.589 (+)
	%IPA	0.386 (+)	0.004 (+)	0.08 (-)
Neutral DMA-GMA-MAPS	pH	0.001 (-)	0.012 (-)	<0.001 (+)
	IS	0.126 (-)	0.436 (+)	0.283 (-)
	Pa	0.102 (-)	0.033 (+)	0.039 (-)
	%IPA	0.138 (-)	0.521 (+)	0.681 (-)
Positive DMA-GMA-MAPS	pH	<0.001 (-)	<0.001 (+)	<0.001 (-)
	IS	<0.001 (-)	<0.001 (+)	<0.001 (-)
	Pa	0.009 (-)	<0.001 (+)	<0.001 (-)
	%IPA	<0.001 (-)	<0.001 (+)	0.092 (+)

Red number: significative influence; (-) negative influence; (+) positive influence

**Table 3.2.S3:** Statistical analysis of results from the experimental design - significances of the obtained correlations between studied factors and responses.

Coating	R <sup>2</sup>		
	Peak asymmetry	Peak capacity	Area
PAA	0.9448	0.9625	0.9857
PVA	0.7201	0.9232	0.9477
Neutral DMA-GMA-MAPS	0.8467	0.8119	0.8846
Positive DMA-GMA-MAPS	0.9882	0.9856	0.9888

**Table 3.2.S4:** Physicochemical data of studied mAbs

mAbs	$\mu\text{ep}$ (cm <sup>2</sup> /V.s)	pI	Rf	MW (Da)	dh (nm)	Class	Generation
<b>Natalizumab</b>	1.78E-04	7.8	2.2	149000	11.345	IgG4	Humanized
<b>Pembrolizumab</b>	1.85E-04	7.6	5.5	149100	12.915	IgG4	Humanized
<b>Nivolumab</b>	1.89E-04	8	2.4	146221	12.665	IgG4	Human
<b>Infliximab</b>	1.94E-04	7.6	3.1	149100	14.65	IgG1	Chimeric
<b>Bevacizumab</b>	1.96E-04	8.3	4.5	149000	16.735	IgG1	Humanized
<b>Adalimumab</b>	2.09E-04	8.9	1.2	148000	11.545	IgG1	Human
<b>Trastuzumab</b>	2.09E-04	9.1	1.8	145421	12.44	IgG1	Humanized
<b>Pertuzumab</b>	2.12E-04	9	3.3	148088	10.805	IgG1	Humanized
<b>Ipilimumab</b>	2.14E-04	9.2	4.3	148000	12.17	IgG1	Human
<b>Rituximab</b>	2.19E-04	9.4	3.7	145000	11.525	IgG1	Chimeric

## References of Article 2

- [1] H. Kaplon, J.M. Reichert, Antibodies to watch in 2019, *MAbs*. 11 (2019) 219–238. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1556465>.
- [2] P.J. Carter, G.A. Lazar, Next generation antibody drugs: pursuit of the “high-hanging fruit,” *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (2018) 197–223. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.227>.
- [3] W. Wang, S. Singh, D.L. Zeng, K. King, S. Nema, Antibody Structure, Instability, and Formulation, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 1–26. <https://doi.org/10.1002/jps.20727>.
- [4] L.K. Hmiel, K.A. Brorson, M.T. Boyne, Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8108-x>.
- [5] S. Fekete, D. Guillarme, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals, *Anal. Chem.* 88 (2016) 480–507. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04561>.
- [6] B. Chen, Z. Lin, A.J. Alpert, C. Fu, Q. Zhang, W.A. Pritts, Y. Ge, Online Hydrophobic Interaction Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis of Intact Monoclonal Antibodies, *Anal. Chem.* 90 (2018) 7135–7138. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01865>.
- [7] A. Etkirch, A. Goyon, O. Hernandez-Alba, F. Rouviere, V. D’Atri, C. Dreyfus, J.-F. Haeuw, H. Diemer, A. Beck, S. Heinisch, D. Guillarme, S. Cianferani, A Novel Online Four-Dimensional SEC×SEC-IM×MS Methodology for Characterization of Monoclonal Antibody Size Variants, *Anal. Chem.* 90 (2018) 13929–13937. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03333>.
- [8] M. Habegger, M. Leiss, A.-K. Heidenreich, O. Pester, G. Hafenmair, M. Hook, L. Bonnington, H. Wegele, M. Haindl, D. Reusch, P. Bulau, Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry, *MAbs*. 8 (2015) 331–339. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1122150>.
- [9] R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products, *J. Chromatogr. B.* 1032 (2016) 61–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.028>.
- [10] V. Le-Minh, N.T. Tran, A. Makky, V. Rosilio, M. Taverna, C. Smadja, Capillary zone electrophoresis-native mass spectrometry for the quality control of intact therapeutic monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. A.* 1601 (2019) 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.050>.
- [11] H. Stutz, Protein attachment onto silica surfaces--a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE, *Electrophoresis*. 30 (2009) 2032–2061. <https://doi.org/10.1002/elps.200900015>.
- [12] C. Huhn, R. Ramautar, M. Wuhler, G.W. Somsen, Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 297–314. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3193-y>.
- [13] A.-L. Gassner, S. Rudaz, J. Schappler, Static coatings for the analysis of intact monoclonal antibody drugs by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*. 34 (2013) 2718–2724. <https://doi.org/10.1002/elps.201300070>.
- [14] H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, Stable Cationic Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers for Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5272–5277. <https://doi.org/10.1021/ac980522l>.
- [15] T.W. Graul, J.B. Schlenoff, Capillaries Modified by Polyelectrolyte Multilayers for Electrophoretic Separations, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4007–4013. <https://doi.org/10.1021/ac990277l>.

- [16] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis of intact basic proteins using noncovalently triple-layer coated capillaries, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2408–2415. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900164>.
- [17] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis-mass spectrometry of intact basic proteins using Polybrene-dextran sulfate-Polybrene-coated capillaries: system optimization and performance, *Anal. Chim. Acta.* 678 (2010) 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.032>.
- [18] V. Le-Minh, N.T. Tran, A. Makky, V. Rosilio, M. Taverna, C. Smadja, Capillary zone electrophoresis-native mass spectrometry for the quality control of intact therapeutic monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. A.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.050>.
- [19] S. Bekri, L. Leclercq, H. Cottet, Polyelectrolyte multilayer coatings for the separation of proteins by capillary electrophoresis: Influence of polyelectrolyte nature and multilayer crosslinking, *J. Chromatogr. A.* 1399 (2015) 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.033>.
- [20] L. Leclercq, M. Morvan, J. Koch, C. Neusüß, H. Cottet, Modulation of the electroosmotic mobility using polyelectrolyte multilayer coatings for protein analysis by capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.008>.
- [21] E. Jaccoulet, C. Smadja, P. Prognon, M. Taverna, Capillary electrophoresis for rapid identification of monoclonal antibodies for routine application in hospital, *Electrophoresis.* 36 (2015) 2050–2056. <https://doi.org/10.1002/elps.201400603>.
- [22] C.A. Lucy, A.M. MacDonald, M.D. Gulcev, Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 81–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114>.
- [23] D.R. Bush, L. Zang, A.M. Belov, A.R. Ivanov, B.L. Karger, High Resolution CZE-MS Quantitative Characterization of Intact Biopharmaceutical Proteins: Proteoforms of Interferon- $\beta$ 1, *Anal. Chem.* 88 (2016) 1138–1146. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03218>.
- [24] J. Giorgetti, A. Lechner, E. Del Nero, A. Beck, Y.-N. François, E. Leize-Wagner, Intact monoclonal antibodies separation and analysis by sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom. Chichester Engl.* (2018) 1469066718807798. <https://doi.org/10.1177/1469066718807798>.
- [25] R. Haselberg, T. De Vijlder, R. Heukers, M.J. Smit, E.P. Romijn, G.W. Somsen, E. Domínguez-Vega, Heterogeneity assessment of antibody-derived therapeutics at the intact and middle-up level by low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 1044 (2018) 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.024>.
- [26] A.M. Belov, R. Viner, M.R. Santos, D.M. Horn, M. Bern, B.L. Karger, A.R. Ivanov, Analysis of Proteins, Protein Complexes, and Organellar Proteomes Using Sheathless Capillary Zone Electrophoresis - Native Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2017). <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1781-1>.
- [27] L. Sola, M. Chiari, Modulation of electroosmotic flow in capillary electrophoresis using functional polymer coatings, *J. Chromatogr. A.* 1270 (2012) 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.039>.
- [28] C. Zilio, L. Sola, F. Damin, L. Faggioni, M. Chiari, Universal hydrophilic coating of thermoplastic polymers currently used in microfluidics, *Biomed. Microdevices.* 16 (2014) 107–114. <https://doi.org/10.1007/s10544-013-9810-8>.
- [29] L. Sola, M. Chiari, Tuning capillary surface properties by charged polymeric coatings, *J. Chromatogr. A.* 1414 (2015) 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.032>.
- [30] B.A. Williams, G. Vigh, Fast, Accurate Mobility Determination Method for Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1174–1180. <https://doi.org/10.1021/ac950968r>.

- [31] A. Goyon, V. D'Atri, O. Colas, S. Fekete, A. Beck, D. Guillarme, Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: Feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation, *J. Chromatogr. B.* 1065 (2017) 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.027>.
- [32] A. Goyon, M. Excoffier, M.-C. Janin-Bussat, B. Bobaly, S. Fekete, D. Guillarme, A. Beck, Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. B.* 1065–1066 (2017) 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.033>.
- [33] A. Staub, S. Comte, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, J. Schappler, Use of organic solvent to prevent protein adsorption in CE-MS experiments, *Electrophoresis.* 31 (2010) 3326–3333. <https://doi.org/10.1002/elps.201000245>.
- [34] L. Konermann, Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH “Buffer” for Native Electrospray Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 1827–1835. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1739-3>.

## Conclusion du chapitre III.2

Les expériences préliminaires réalisées dans cette partie expérimentale ont montré l'importance de l'étape d'optimisation de rinçage, notamment à l'aide d'isopropanol (10%). Ceci a permis d'améliorer les RSD du T<sub>m</sub> et de l'aire du pic pour tous les revêtements à l'exception du PEI. Aussi, ce revêtement a été exclu à l'étape suivante. DMA-GMA-MAPS zwitterionique a été exclu avant l'étude d'optimisation du rinçage compte tenu des RSD très importants du T<sub>m</sub> et de l'aire du pic. Un plan d'expérience a ensuite été réalisé sur l'ensemble des revêtements qui a permis d'optimiser les conditions d'analyse par EC compatible avec la spectrométrie de masse. Ceci a permis de définir les conditions d'analyse pour la suite des expériences. Le tampon d'analyse choisi était donc constitué d'un tampon ammonium acétate de force ionique 60 mM, à pH 5.8, avec un pourcentage d'IPA de 5%. Une pression additionnelle de 0.5 psi a également été utilisée durant l'analyse.

Les études de stabilité réalisées à l'aide de l'infliximab par CZE-UV ont montré que le polymère présentant la meilleure stabilité était le copolymère DMA-GMA-MAPS neutre avec le plus faible RSD en termes d'asymétrie de pic, de T<sub>m</sub> et de surface de pic. La capacité de discrimination de ce revêtement par CZE-UV a été testée à l'aide d'analyse statistique multivariée en analysant 10 Acms thérapeutiques reconstitués. Les résultats obtenus ont montré que pour les Acms à faible pI, il était possible de les discriminer en fonction de leur sous-types (IgG1 ou IgG4) et de leur rayon hydrodynamique. Cette méthode optimisée avec ce revêtement DMA-GMA-MAPS neutre a ensuite également été appliquée avec succès pour la détection et la caractérisation d'échantillon d'Infliximab dégradés par la lumière ou l'agitation par EC couplée à la spectrométrie de masse en mode native. Les spectres obtenus après analyse des échantillons stressés montrent qu'il a été possible de détecter des Acms dénaturés, natifs ainsi que des fragments d'anticorps.



### **III.3. Analyse et caractérisation d'Acms thérapeutiques ; couplage simultané de la SEC à une double détection par fluorescence et spectrométrie de masse.**

Dans cette partie expérimentale, nous avons souhaité approfondir l'influence des différents paramètres de spectrométrie de masse sur la formation artificielle de dimères afin de pouvoir distinguer les dimères présents dans l'échantillon analysé de ceux formés artificiellement par spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons conçu un système de SEC couplée simultanément à la MS et à un détecteur de fluorescence pour la détection et la caractérisation de molécules dégradées d'anticorps.

A l'aide de ce système, nous avons identifié les conditions expérimentales liées à la SEC-MS (e.g. tampon, solvant organiques, températures d'ionisation) responsables de dénaturations et de dimérisations artificielles et prévenant le plus possible les interactions avec la phase stationnaire. Ceci a permis de proposer une méthode d'analyse des Acms par SEC couplée à la FLD et la spectrométrie de masse limitant ces effets délétères. La méthode ainsi développée va donc permettre d'identifier les monomères dénaturés, natifs et les dimères présents dans l'échantillon d'anticorps soumis préalablement à un stress. Nous avons également vérifié que dans les conditions expérimentales ainsi développées l'inflximab conserve son affinité pour sa cible biologique le TNF $\alpha$ . Cette méthode SEC-FLD/MS a ensuite été appliquée à la caractérisation d'agrégats et de monomères dénaturés présents dans un échantillon de trastuzumab stressé. Nous avons ensuite à l'aide de cette méthode séparative, séparer et déterminer la quantité de monomères dénaturés par rapports aux monomères natifs en utilisant le couplage de la SEC à la mobilité ionique-MS (IMS-MS).

Finalement, nous avons appliqué cette méthode de SEC-FLD/MS pour évaluer l'influence des conditions environnementales (agitation, lumière, température) sur la dégradation de plusieurs mAbs thérapeutiques.

### Article 3: Conformation assessment of therapeutic monoclonal antibodies by SEC-MS: unravelling analytical bias for quality control application

Victor Le-Minh<sup>a</sup>, Frédéric Halgand<sup>b</sup>, Guillaume Val der Rest<sup>b</sup>, Myriam Taverna<sup>a</sup>, Claire Smadja<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

<sup>b</sup> *Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 15 avenue Jean Perrin, 91405 Orsay, France*

#### Article in preparation

##### Abstract:

Immunogenicity related to the degradation of therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) remains a major concern for their therapeutic efficacy and safety. Therefore, an analytical method allowing characterization and detection of mAbs degradation is mandatory. In this study, a simultaneous coupling of size exclusion chromatography (SEC) to native mass spectrometry (MS) and fluorescence detector (FLD) is proposed to detect degraded therapeutic mAbs and biases of structural changes (e.g. dimerization, denaturation) that may occur during native MS. A comprehensive study on infliximab behaviors have been performed under different mobile phase conditions (e.g. composition, pH, organic solvent, etc.) and MS parameters (e.g. gas temperatures, CID energies, etc.). Experimental conditions avoiding artificial denaturation and/ or dimerization have been defined. We have also demonstrated that under the developed conditions infliximab affinity towards its biological target TNF $\alpha$  is preserved. In addition, using this method dimers, denatured monomers and fragments could be detected in trastuzumab samples stressed by a long-term storage. These results were confirmed by using SEC coupled to ion mobility mass spectrometry as an orthogonal method for the detection of denatured monomer.

**Keywords:** therapeutic mAbs, SEC-Native MS, SEC-IMS-MS, artificial dimerization and denaturation, dimer, denatured mAb

**Highlights:**

- Intact therapeutic mAbs can be analyzed by SEC-FLD/MS under native conditions.
- We are able to discriminate artificial versus original dimers present in the sample.
- Under the SEC-MS conditions reported, Infliximab affinity to its biological target TNF $\alpha$  is preserved.
- Online coupling of SEC to IMS-MS was performed to evaluate unfolded monomer in stressed sample of trastuzumab.

### **III.3.1. Introduction**

Quality control of therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) in the hospital context plays a pivotal role to ensure their efficacy and safety before administration to patients. Indeed, therapeutic proteins such mAbs could induce immunogenic responses related to antidrug antibodies generated by patients, leading to life threatening situations [1]. Immunogenicity may be provoked by mAbs physical degradations such as unfolding, misfolding and aggregation that occur during their preparation and/or storage [2,3]. Therefore, an accurate method able to detect and characterize these physically degraded mAbs in reconstituted preparations is mandatory. For this purpose, methods allowing detection of conformational/structural modifications and aggregates are required. However, the detection of misfolded and/or weak non-covalent complexes assemblies of therapeutic mAbs are still challenging considering their inherent complexity in terms of size and heterogeneity and their relative instability upon analysis.

Native mass spectrometry (native MS) is nowadays one of the most valuable tool to characterize, non-covalent mAbs interactions and mAbs intrinsically disordered [4–6]. However, when mAbs are physically degraded, coexisting species i.e. folded, misfolded, unfolded or aggregates can be found in the same infusion bag. Thus, mass spectra often show overlapping distributions rendering data interpretation difficult. This is why, coupling of native-MS to a separative method is of particular interest. Among separative methods, size exclusion chromatography (SEC) which is based on differences in hydrodynamic radius, is considered as a reference method to characterize, in complex mixtures, different components such as, high-molecular weight species (HMWS) (i.e dimers, trimers, soluble oligomers), mAbs monomers and low-molecular weight species (LMWS) (i.e mAbs fragments) [7]. In addition, combined to MS, SEC is an online effective way to remove non-volatile molecules by a fast buffer exchange[8].

SEC-Native MS or ion mobility spectrometry (IM) -MS methods have recently been reported and employed to characterize antibodies [9–12]. These approaches are able to preserve non-

covalent protein-protein interactions [13,14]. Recently, Ehkirch et *al.* has presented an innovative 4-dimensional method to characterize mAbs size variants with SEC x SEC - IM x MS. In this configuration, the first SEC dimension, nonvolatile salt buffer was used for the separation whereas the second SEC was for an online desalting step using volatiles buffers [15]. Although this set-up renders SEC fully compatible to MS while maintaining SEC performance, it remains hardly transferable for routine analysis of mAbs infusion bags at the hospital. The approaches frequently employed to render SEC compatible to MS and to limit as much as possible the secondary interactions between proteins and stationary phases employ high concentration of volatile buffers (e.g. ammonium salts) in the mobile phase as well as volatile additives (e.g. organic solvent). However, it is still difficult to prevent HMWS adsorption on the stationary phase [16], [17]. Moreover, artificial protein denaturation, association or oligomer dissociation may occur during the separation due to some ESI native-MS parameters. This renders difficult to draw relevant conclusions from MS data and evaluate the quality of the compounded therapeutic mAbs.

To elucidate the impact of analysis conditions and parameters on the modification of protein structure (denaturation, unfolding), mAbs association or aggregate dissociation during SEC-ESI-MS, we developed the simultaneous coupling of SEC to ESI-QTOF and fluorescence detector (FLD). FLD detecting intrinsic fluorescence of mAbs brings indeed complementary information to MS; (i) molecular weights of different species using a molar mass calibration curve and (ii) molecules undetected by native MS (e.g. very high molecular weight, low amount species). In this work, SEC-FLD/native MS conditions have been also evaluated to reduce mAbs affinity on SEC stationary phases, to ensure high chromatographic performance and high MS sensitivity. The different parameters (chromatographic conditions and MS) influencing artificial infliximab oligomers formation have been deeply investigated.

Conditions avoiding analytical biases have been this way defined. We have also checked Infliximab ability to interact with its biological target TNF $\alpha$ . Finally, this SEC method coupled to

MS has been applied to stressed trastuzumab sample and revealed evidence of the trastuzumab denaturation and dimerization. In addition, analysis of stressed trastuzumab sample by SEC-IMS-MS also allowed to discriminate the denatured versus native conformation of trastuzumab.

### **III.3.2. Experimental section**

#### **III.3.2.1. Chemicals, Reagents, and Samples.**

Ultrapure Water, methanol, iso-propanol, acetonitrile, acetic acid and ammonium hydroxide MS grade were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ammonium acetate, ammonium bicarbonate, ammonium formate MS grade, Phosphate buffered saline (PBS) and TNF $\alpha$  were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Two commercially available mAbs were used: 150mg trastuzumab (Herceptin, Roche, Switzerland) and 100mg infliximab (Inflectra, Pfizer, Belgium).

#### **III.3.2.2. Sample preparation.**

mAbs lyophilizate were first reconstituted with sterile water for injection to reach the initial concentration required by the manufacturer (infliximab and trastuzumab at 10 mg.mL<sup>-1</sup> and 21 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively). Then, each mAbs solutions was separately compounded in 0.9% NaCl according to manufacturer guidelines. Polyolefin FreeFlex® bags for infusion containing 0.9% NaCl were from Fresenius Kabi (France). The final concentration of mAbs solutions were 1.0 mg. mL<sup>-1</sup>. The compounded mAb solutions were stored at 4° C and protected from light. Compounding, reconstitution and sampling from bags were performed under aseptic conditions using a laminar flow hood.

*Stressed sample:* Stressed Trastuzumab were prepared by storing reconstituted solutions (1.0 mg.mL<sup>-1</sup>) at 4°C for 6 months (protected from light).

#### **III.3.2.3. TNF $\alpha$ -mAb incubation**

Commercial TNF $\alpha$  was diluted in PBS buffer at pH 7.3 to obtain a concentration of 0.5 mg. mL<sup>-1</sup> (~ 10  $\mu$ M). The TNF $\alpha$  solution was subsequently mixed with mAbs (molar ratio ranging from 1.4 /1 to 1/70) in an Eppendorf Protein Lobind tube and stirred (at 300 rpm, 37°C during 30 min) using a Thermomixer C (Eppendorf, Hamburg, Germany).

#### **III.3.2.4. Fluorescence spectroscopy**

The intrinsic fluorescence measurements of infliximab were performed with the FP-750 Spectrofluorometer (Jasco Inc, Easton, MD, USA). Excitation wavelength was set at 280 nm and emission has been registered from 295 nm to 450 nm

#### **III.3.2.5. SEC-FLD/MS**

SEC-FLD/MS experiments were performed using a 1260 Agilent UPLC, 1260 FLD detector (Xenon lamp) and ESI-QTOF 6540 mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). An Agilent Bio SEC-3 column (3 $\mu$ m, 300 Å, 4.6 x 300 mm) was used. Agilent Mass Hunter B.07.00 software was employed to analyze the MS data.

To hyphenate SEC with both ESI-MS and FLD, a post-column splitting flow was set up with a 99:1 (v/v) splitter. The flow rate was set to obtain the same retention time for one given peak using both MS or FLD detection. The mobile phase was pumped at 300  $\mu$ L.min<sup>-1</sup>. FLD detection was performed at  $\lambda_{ex}$  = 280 nm, and  $\lambda_{em}$  350 nm.

For MS detection, the positive ionization mode was chosen. Nebulizer pressure was set at 25 psig. Transferred capillary, nozzle, fragmentor and skimmer voltages were set at 2500 V, 2000 V, 200 V and 80 V respectively. Profile mass spectra were collected from 1000 to 10000  $m/z$  with an acquisition rate of 0.4 spectrum.s<sup>-1</sup>.

#### **III.3.2.6. SEC-IMS/MS**

SEC-IMS-MS experiments were performed on a HPLC Acquity (Waters, Manchester, UK) and a QToF instrument (Synapt G2-Si, Waters Company, Manchester, UK) equipped with a traveling wave ion mobility guide. The column and mobile phase conditions were similar for those for SEC-FLD/MS.

Acquisition of mass spectra were carried out at  $m/z$  ranging from 2000 to 14.000 and analyzed in the positive ion mode under “near-native” condition. The instrumental parameters were: capillary



voltage = 4.5 kV, sampling cone = 150 V, source offset = 150 V, nebulization gas pressure = 5 bar, source temperature = 40 °C, desolvation temperature = 75 °C. The drift gas was nitrogen. T-wave parameters were: Trap gas flow = 2 ml/min; IMS gas flow = 45 ml/min, Trap wave velocity = 300 m/s, Trap wave height = 4 V, He cell gas flow = 120 ml/min, IMS wave velocity = 800 m/s, IMS wave height = 40 V, Transfer wave velocity = 110 m/s and Transfer wave height = 4 V. Calibration was performed using sodium trifluoroacetate. Averaged RMS deviation was around 20 ppm for “native” analyses. After recording ion mobility data, we extracted all information, such as mass to charge ratios ( $m/z$ ), drift times ( $t_d$ ) and intensities, using the peak detection procedure of Driftscope™ software. All the data were gathered in a raw data file (.csv). Then our home-made script allowed extracting information only related to a-Syn\* by entering its average molecular mass, the  $m/z$  accuracy and limits of the charge states distribution. This allowed us to rapidly process the data and plot  $\Omega = f(z)$  ( $\Omega$  = CCS = collisional cross sections;  $z$  = charge state) graphs to reveal the conformational landscape properties.

### **III.3.3. Results and discussion**

The impact of the SEC-MS experimental conditions on fresh infliximab ( $1.0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) physical degradations (i.e. denaturation, dimerization) was investigated by coupling SEC, with a post-column splitting, to a double detection (FLD and native MS). An optimization of the mobile phase composition has been performed to avoid as much as possible artificial mAbs denaturation, association or aggregate dissociation during Infliximab analysis. For native MS, near-physiological conditions as well as soft ionization parameters have been employed to preserve initial conformation and weak noncovalent interactions.

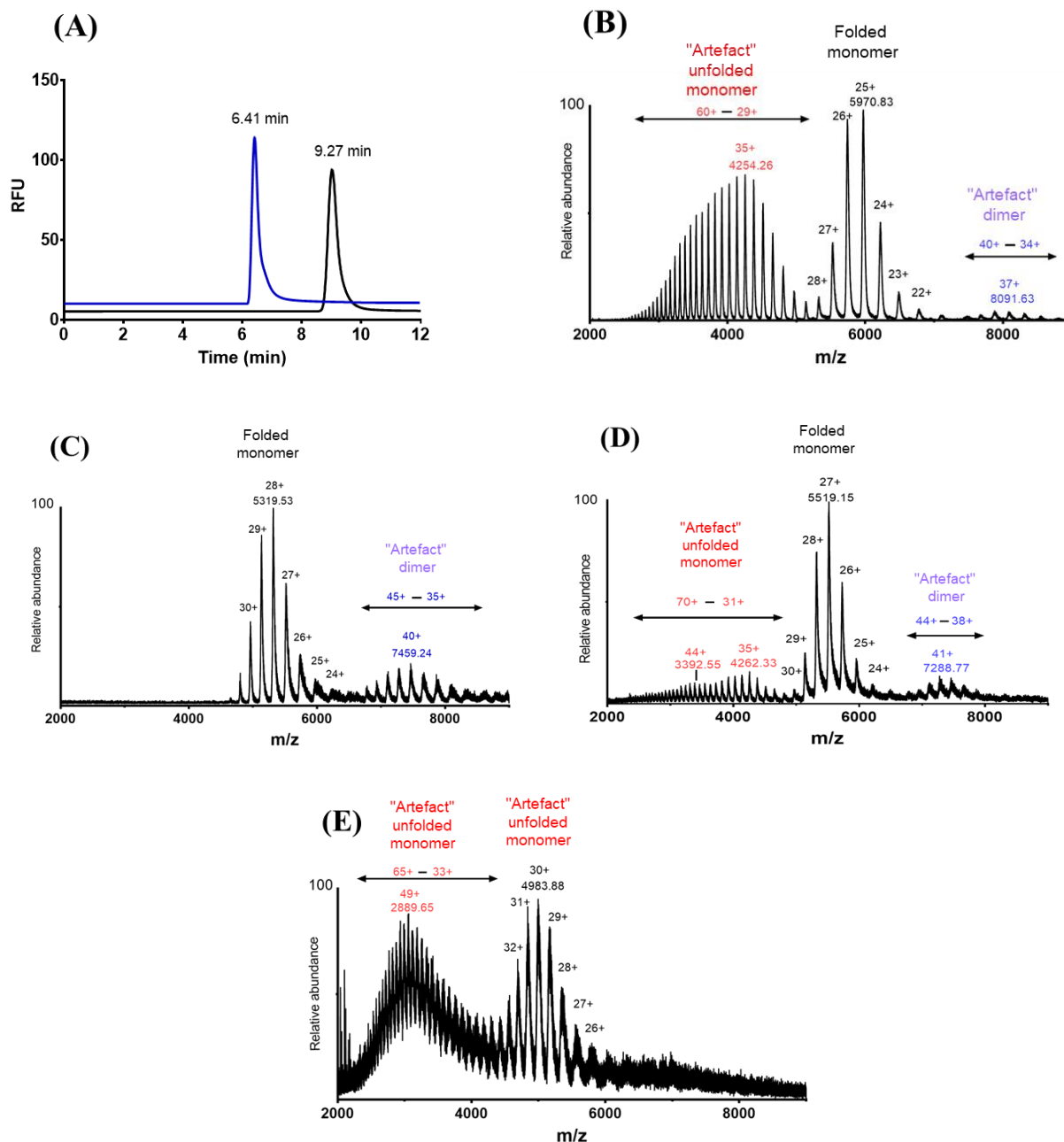
#### **III.3.3.1. Optimization of mobile phase buffer for nondenaturing SEC-FLD/MS**

##### **III.3.3.1.1. Influence of mobile phase buffer electrolytes**

We evaluated the influence of the mobile phase buffer at different pHs and ionic strengths on mAbs behavior. At pH 3.0 (acetic acid 100 mM), we can observe by SEC-FLD that the retention time is 6.41 min, whereas at pH 6.0 (ammonium acetate 100 mM), it is increased to 9.27 min (Figure 3.3.1 A). This  $t_R$  shift clearly results from the denaturing effect of acidic mobile phase (pH 3.0) leading to Infliximab unfolding and an increase of its hydrodynamic volume. The native-MS detection, at pH 3.0 (acetic acid 100 mM), showed that infliximab fresh sample exhibited a bimodal spectrum with two distinct envelopes. The first envelope of monomers exhibiting very high charge state distribution (CSD) ranging from 29+ to 60+ ions (Figure 3.3.1 B) confirms the infliximab denaturation which exposes a higher number of charges on its surface. The second envelope has a much lower CSD from 21+ to 29+ ions. According to Rayleigh limit [18], a native form of folded monomer theoretically displays a low charge-density with a narrow CSD with a maximum charge state ( $Z$ ) estimated at 30+. These results were confirmed by analyzing other therapeutic mAbs (i.e. Rituximab, Bevacizumab, Pembrolizumab, Pertuzumab and Nivolumab) which also exhibited CDS at 30+ (data not shown).

At near-neutral pH (6.0) and whatever the buffer employed (ammonium acetate, ammonium formate or ammonium bicarbonate) only one peak of monomeric infliximab, exhibiting the same  $t_R$ , was observed by SEC-FLD/MS., native-MS analysis of this monomeric fraction showed that Infliximab analyzed with ammonium acetate (100 mM) exhibited one envelope centered at 28+ corresponding to the folded monomer but also additional one related to dimers formed artificially by MS conditions (Figure 3.3.1 C). At the same pH with ammonium formate buffer (100 mM), in the monomeric fraction, a partial infliximab unfolding was observed in MS, probably due to a pH transition from pH 6.0 in aqueous phase to pH near pKa 3.7 (formic acid) in the gas phase (Figure 3.3.1 D). Dimers were also observed with ammonium formate buffer. Concerning ammonium bicarbonate buffer (100 mM, pH 6.0), this tended to fully denature protein during the ionization. Indeed, two envelopes were observed in the monomeric fraction, one with a 49+ (unfolded form) and the second with charges centered at 30+ (Figure 3.3.1 E). Both envelopes could be related to different unfolded or partially unfolded forms. This phenomenon is probably caused by the interaction between proteins in bicarbonate buffer and CO<sub>2</sub> outgassing during ESI leading to bubbles production. Heating and bubbling synergistically induce protein unfolding as explained by Hedge and colleagues [19].

In our SEC-MS experiments, the dimerization phenomenon of Infliximab has been observed with most of the mobile phases tested except ammonium bicarbonate (Figure 3.3.1 B, C, E). Since ammonium bicarbonate buffer tends to denature proteins, ammonium acetate buffer (100 mM, pH 6.0) has been chosen.

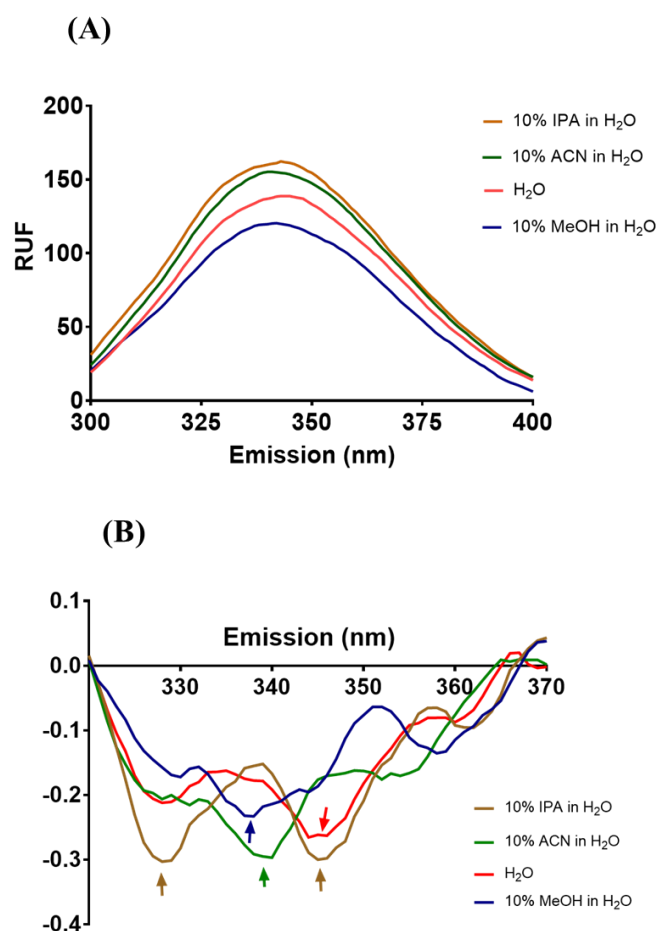


**Figure 3.3.1:** Online SEC-FLD/native MS analysis of Infliximab (A) SEC-FLD chromatogram using 100mM acetic acid pH 3.0 mobile phase (blue trace) and 100mM ammonium acetate pH 6.0 mobile phase (black trace). Mass spectra of monomeric Infliximab at different mobile phase (B) 100 mM acetic acid pH 3.0, (C) 100 mM ammonium acetate pH 6.0, (D) 100 mM ammonium formate pH 6.0, (E) 100 mM ammonium bicarbonate pH 6.0.

Column: BioSEC-3, (4.6 mm × 300 mm, 300 Å, particle diameter 3 μm); Flow rate: 300 μL.min<sup>-1</sup>; FLD: λ<sub>ex</sub> = 280 nm, λ<sub>em</sub> = 350 nm. MS condition: drying gas. 250 °C – 6 L min<sup>-1</sup>, sheath gas 200 °C – 6 L min<sup>-1</sup>, nebulizer pressure 15 psig, transferred capillary, nozzle, fragmentor and skimmer voltages were set at 3500 V, 1500 V, 175 V and 65 V respectively

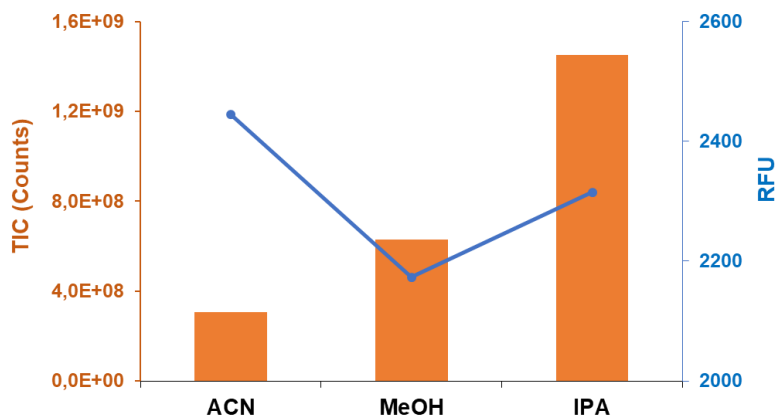
### III.3.3.1.2. Influence of organic solvents on FLD and MS signal

Organic solvents are often employed in SEC mobile phases to limit the hydrophobic non-specific interaction of protein to stationary phases, and also to enhance the MS ionization efficiency [17]. However, a high percentage of solvent could induce; (i) protein denaturation, (ii) modification of the protein equilibrium between folded and unfolded states, (iii) fluorescent properties modification and (iv) dissociation of non-covalent oligomers. The influence of organic solvents on infliximab fluorescent signal has been first evaluated by adding 10% organic solvent in the compounded infliximab. Both isopropanol (IPA) and acetonitrile (ACN) improved the intrinsic fluorescence intensity of infliximab whereas the signal was reduced with methanol (MeOH) (Figure 3.3.2 A). In addition, a slight shift of emission maximum (from 345 nm to 337 nm) was observed with MeOH and ACN (Figure 3.3.2 B). Then, organic solvents (10 %) were added to the mobile phase (ammonium acetate 100 mM pH 6.0). FLD detection showed that infliximab peak area was higher with ACN compared to IPA and MeOH (ACN > IPA > MeOH) (Figure 3.3.3), while infliximab peak shape and retention time were similar with the three solvents. With MS detection, IPA addition provided the highest infliximab signal which was approximately 2 and 5-fold higher compared to MeOH and ACN, respectively. Therefore, IPA has been chosen for the following experiments. Most importantly, MS detection showed that a self-association of monomeric mAbs was observed whatever the organic solvent employed.



**Figure 3.3.2:** (A) Fluorescence emission spectra and (B) Fluorescence second derivative spectra when organic solvent is added in the compounded Infiximab ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ , ( $\lambda_{\text{em}} = 295 - 450 \text{ nm}$ ).

The influence of IPA % in mobile phase from 5-30% (v/v) has been also evaluated. Retention times, peak shape and peak area remained all constant for infliximab with the FLD detection. On the contrary, in native-MS, by increasing IPA % (from 5 to 30%) the ionization efficiency of infliximab monomer increased by 1.5-fold while artificial dimerization strongly increases by 2-fold. In addition, possible dissociation of aggregates has been reported by previous studies [20]. Therefore, 10 % has been chosen as a compromised condition enhancing MS-sensitivity and limiting hydrophobic interactions while avoiding the unwanted mAb conformational changes.



**Figure 3.3.3:** Comparison of different organic solvent in mobile phase, ACN, MeOH, IPA. Online SEC-FLD/native MS analysis of fresh infliximab with mobile phase containing 10% organic solvent: Mass spectra intensity (orange histogram) and peak area measured by FLD detector (blue trace) of Infliximab monomers.

Mobile phase: ammonium acetate 100 mM, pH = 6.0, 10 % organic solvent (v/v), other experimental conditions as mentioned in Figure 3.3.1.

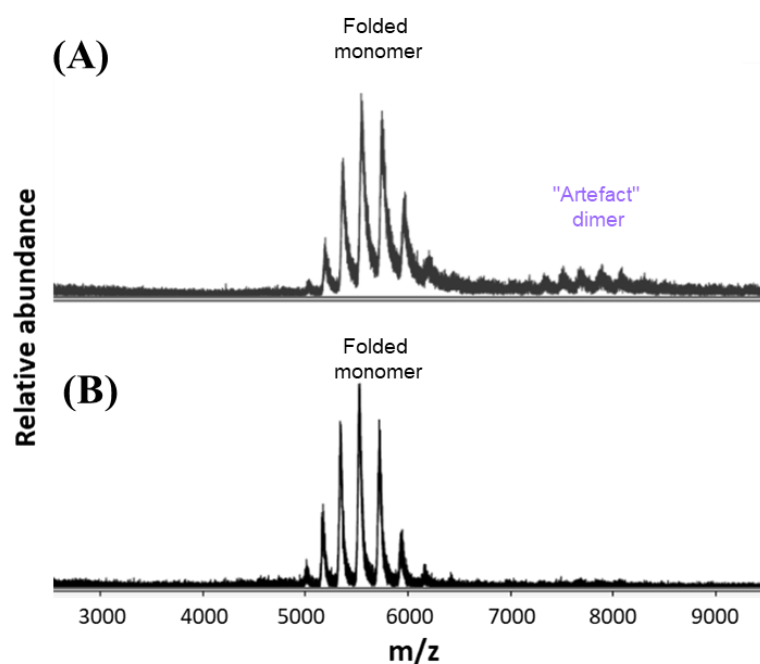
#### III.3.3.1.3. Influence of mobile phase ionic strength, pH and temperature

Ammonium acetate buffers at pH 5.0 to 7.0 with ionic strengths ranging from 60 to 200 mM have been then tested. High pHs and high ionic strengths increase slightly FLD signal while MS signal remained unchanged. Temperature was varied from 20°C to 40°C and no significant difference either on fluorescence or MS signal were observed. Finally, a mobile phase with 150 mM ammonium acetate pH 6.5 has been chosen for mAbs analysis by SEC. FLD detector showed that infliximab exhibits a slight tailing peak ( $A_s = 1.3$ ) in this condition. The method has been validated with Infliximab in term of specificity, repeatability ( $t_R$  and peak area of the monomer: 0.03 and 0.22 % RSD respectively), intermediate precision ( $t_R$  and monomeric infliximab peak area: 0.05 and 0.52 % RSD, respectively). The fractionation domain of this column was found linear from 29 kDa to 669 kDa ( $R^2 = 0.9888$ ).

### III.3.3.2. Optimization of MS parameters

In the second part of the study, we investigated the ionization and desolvation conditions with the optimized mobile phase to improve the sensitivity and prevent as much as possible mAb structural changes bias. Gas temperatures (sheath gas and drying gas) were found to be the most critical parameters for infliximab ionization. High gas temperatures enhance ionization efficiency and ions transmission compared to low gas temperature. However, in the same time, high temperatures increase the artificial denaturation and dimerization risks during the ionization process. Especially, low sheath gas temperature (i.e. 100°C) combined with high drying gas (i.e. 350°C) could reduce the dimerization rate. In contrast, high sheath gas temperature (i.e. 300°C) with low drying gas temperature (i.e. 150°C) increased the dimerization rate. It could be hypothesized that high sheath gas favors ionization, but low drying gas temperature leads to a poor desolvation and low ions transmission resulting in an increasing dimerization rate. In-source CID plays also a role in desolvation assist and adduct elimination [21]. We have demonstrated that dimer artefacts were diminished at 25 V and disappeared with collision energy at 100 V (Figure 3.3.4). At in-source CID voltage above 100 V, fragmentation of intact infliximab has been observed. Finally, we have chosen 150 °C for sheath gas and 250 °C for drying gas and 100 V for collision energy. When these conditions were employed, no dimerization and denaturation-bias has been observed.





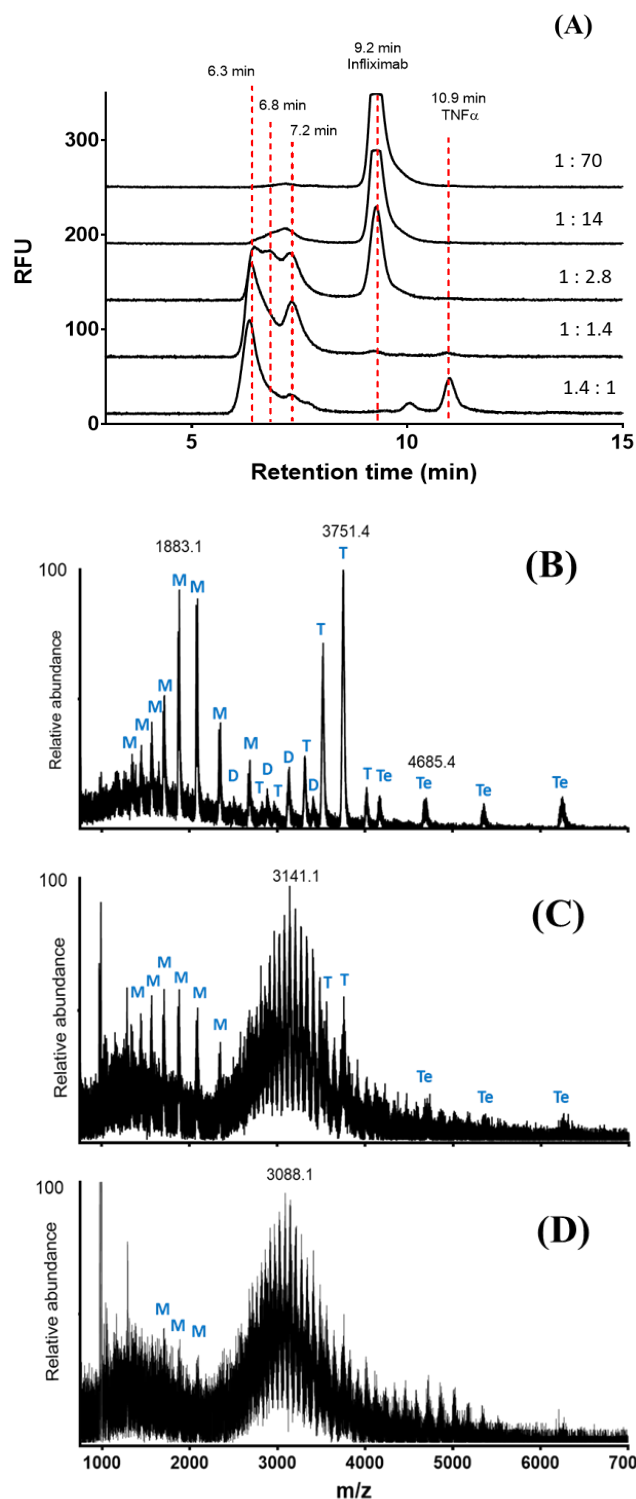
**Figure 3.3.4:** Mass spectra of monomeric Infiximab fraction at different voltages of in-course CID. (A), 0V, (B) 100 V.

Mobile phase: ammonium acetate 150 mM, pH = 6.0 (10% IPA), other experimental conditions as mentioned in Figure 3.3.1.

### III.3.3.3. Interaction TNF $\alpha$ and INF

In order to verify that infliximab is maintained under its native states and able to establish interactions with TNF $\alpha$ , its biological target, in the SEC-FLD/MS conditions previously developed. A constant concentration of infliximab at 6.7  $\mu\text{M}$  (1 mg.mL<sup>-1</sup>) has been incubated during 30 min at 37 °C with an increasing concentration of TNF $\alpha$  (52kDa) ranging from 0.1  $\mu\text{M}$  to 10  $\mu\text{M}$ . The results obtained showed that at ratio (1/70, TNF $\alpha$ /infliximab mole/mole) a main peak corresponding to monomeric infliximab ( $t_R$  9.2 min) observed by SEC-FLD (Figure 3.3.5 A). Ratio 1/14 showed two peaks, one monomeric infliximab and a second peak that could correspond to a complex TNF $\alpha$ -infliximab. Based on the  $t_R$  obtained by FLD, the molecular weight of this complex observed at ratio 1/14 could be estimated at 1000 kDa. At ratio 1/2.8 four main populations could be observed, with one main peak corresponding to monomeric infliximab and three populations corresponding to

different types of complex between infliximab and TNF $\alpha$ . By increasing further, the ratio TNF $\alpha$  versus Infliximab (1/1.4, 1.4/1) all the molecules of infliximab are interacting with TNF $\alpha$  suppressing thereby the peak corresponding to infliximab and only two types of hetero-oligomer complex between TNF $\alpha$  and Infliximab are evidenced. These results showing hetero-oligomer complexes composed by TNF $\alpha$ -infliximab related to the increasing the TNF $\alpha$  vs infliximab ratio confirm the specific interaction of infliximab towards TNF $\alpha$ . Moreover, we could hypothesize that the variation of the number of hetero-oligomers is related to a transition state of TNF $\alpha$ -infliximab complex by increasing the TNF $\alpha$  level. With the obtained results, we can conclude that the mobile phase containing 10 % IPA in 150 mM acetate ammonium pH 6.0 does not disrupt the non-covalent interaction between TNF $\alpha$  and infliximab. However, these complexes detected by FLD could not be seen by native-MS with developed method using ammonium acetate due to the limited mass range detection of QTOF6450 for the ions above 10 000  $m/z$ . Therefore, in order to determine the composition of these complexes, the ammonium bicarbonate buffer inducing protein denaturation and potentially dissociation of non-covalent interactions in native-MS have been employed to analyze TNF $\alpha$ -Infliximab complexes at ratio (1:2.8).



**Figure 3.3.5:** (A) SEC Chromatograms of TNF $\alpha$ /Infliximab mixtures at different ratios. Online SEC-native MS analysis of TNF $\alpha$  / Infliximab mixture at ratio 1:2.8, Mass spectra of (B) TNF $\alpha$ , (C) TNF $\alpha$  /Infliximab complex at 7.2 min and (D) TNF $\alpha$  : INF complex at 6.3 min (M), (D), (T), (Te) are monomeric, dimeric, trimeric and tetrameric forms of TNF $\alpha$ , respectively

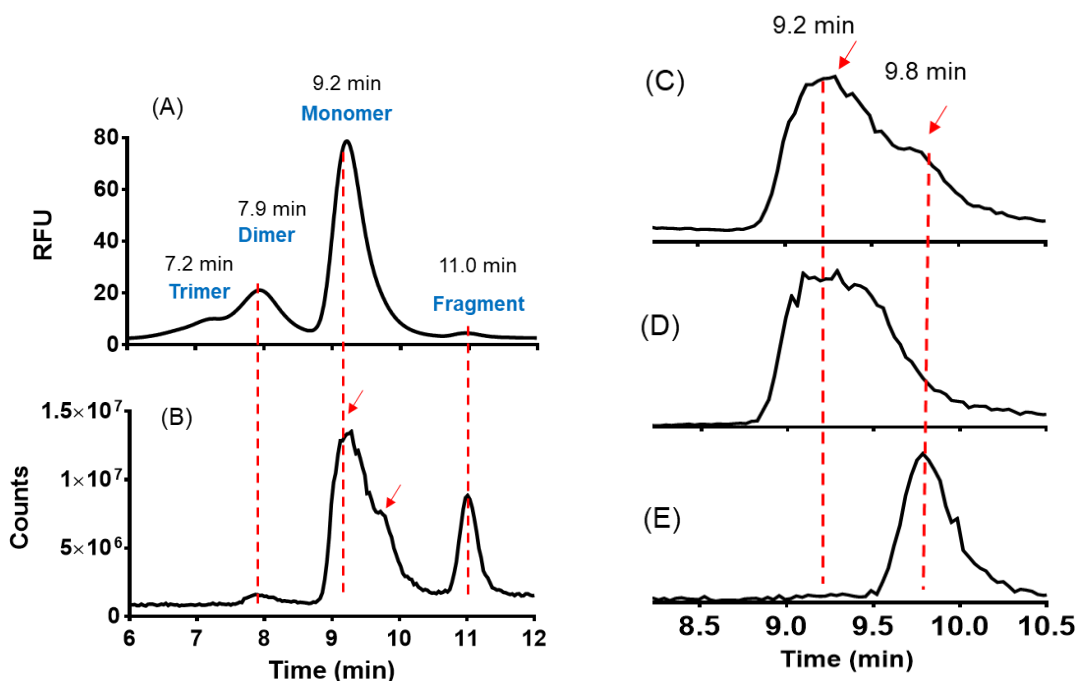
Mobile phase: ammonium bicarbonate 150 mM pH 6.5 (10% IPA). Column: BioSEC-3, (4.6 mm × 300 mm, 300 Å, particle diameter 3 μm); Flow rate: 300 μL.min<sup>-1</sup>; FLD: λ<sub>ex</sub> = 280 nm, λ<sub>em</sub> = 350 nm.

MS conditions: MS condition: drying gas. 250 °C – 6 L min<sup>-1</sup>, sheath gas 150 °C – 6L min<sup>-1</sup>, nebulizer pressure 25 psig, transferred capillary, nozzle, fragmentor and skimmer voltages were set at 2500 V, 2000 V, 300 V and 80 V respectively

FLD detection showed that similar retention times and chromatographic profiles between ammonium bicarbonate buffer (pH 6.5 150 mM) and ammonium acetate (pH 6.5 150 mM) buffer. The TNFα homotrimer state eluted at 10.9 min (Figure 3.3.5 A) was partially dissociated in ESI-process and homotrimers, dimers and monomers have been identified in MS spectra (Figure 3.3.5 B). The TNFα-infliximab complexes were also dissociated in this MS conditions. In the complex eluted at 6.3 min, we observed high intensities of TNFα monomers and trimers overlapping the denatured infliximab envelop (Figure 3.3.5 C). The complex eluted at 7.2 min dissociated under ESI process release mainly denatured INF and a minor signal of monomer TNFα (Figure 3.3.5 D). These results assessed that mAbs and TNFα are able to interact under the mobile phase conditions optimized for SEC-FLD/MS

#### **III.3.3.4. Analysis of Trastuzumab stressed samples**

The SEC-FLD/MS developed method has been employed to analyze a stressed sample of trastuzumab (1.0 mg.mL<sup>-1</sup>) (storage at 4°C during more than 6 months). In the fresh sample, only one peak of monomer was detected by FLD with a mass spectrum displaying a low CSD centering at 27+ (Figure 3.3.7 A). For the stressed sample, the trimers (t<sub>R</sub> 7.2 min), dimers (t<sub>R</sub> 7.9 min), monomers (t<sub>R</sub> 9.2 min) and fragments (t<sub>R</sub> 11.0 min, MW~ 50 kDa), were detected by FLD (Figure 3.3.6 A) while native MS detects monomers and dimers but no trimers (Figure 3.3.6 B).

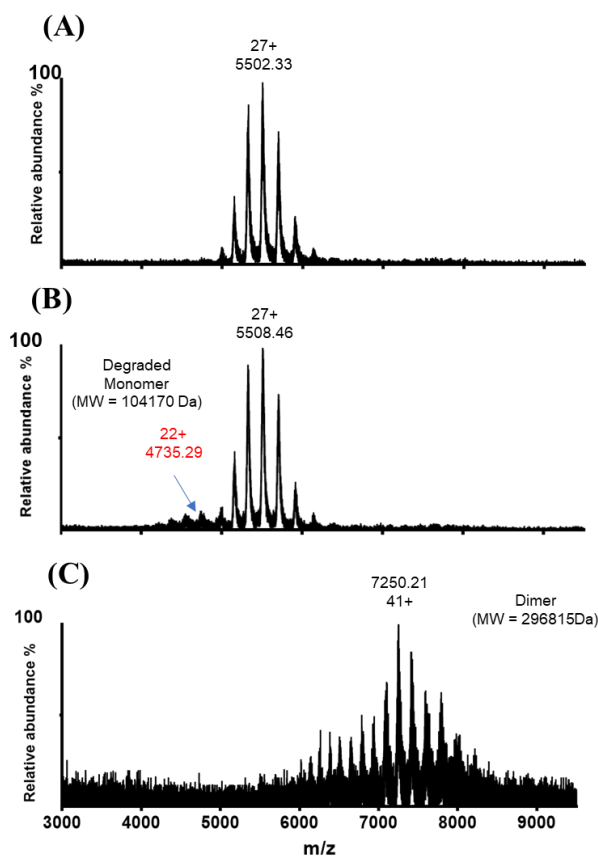


**Figure 3.3.6:** On-line SEC-FLD/native MS analysis of stressed trastuzumab upon long-term storage (4°C during more than 6 months). (A) Fluorescent chromatogram and (B) Total ion current (TIC) of stressed trastuzumab analysis, (C) TIC of monomeric peak (from 9.0 to 10.5 min), (D) XIC profile of native Trastuzumab ( $t_R = 9.2$  min), (E) XIC profile of denatured trastuzumab of monomer peak ( $t_R = 9.8$  min).

Experimental conditions as mentioned in Figure 3.3.5.

In monomer fraction of the stressed sample eluting from 8.8 min to 10.3 min (Figure 3.3.6 C), the total ion current (TIC) showed two peaks ( $t_R$  9.2 and 9.8) corresponding to monomers showing a bimodal mass spectrum with two envelopes by native MS (Figure 3.3.7 C). Considering the elution time of each peak, extracted-ion chromatogram (XIC) profile of the monomer displayed a peak eluted at 9.2 min (Figure 3.3.6 D) with a main envelop exhibiting a mass/charge ratio ranging from 5000  $m/z$  to 6200  $m/z$  and a charge state centered at 27+ that could correspond to the folded one (Figure 3.3.7 B). This is assessed by the similar charge state displayed by the fresh Trastuzumab sample (centered at 27+) (Figure 3.3.7 A). The XIC profile of the peak eluted at 9.8 min (Figure 3.3.6 E) showed a mass spectrum with a major signal corresponding to a degraded monomer with  $m/z$  ranging from 4200 to 5000  $m/z$  with a deconvoluted mass corresponding to 104170 Da (Figure 3.3.7 B). The slightly higher  $t_R$  of the unfolded trastuzumab, could be explained by the

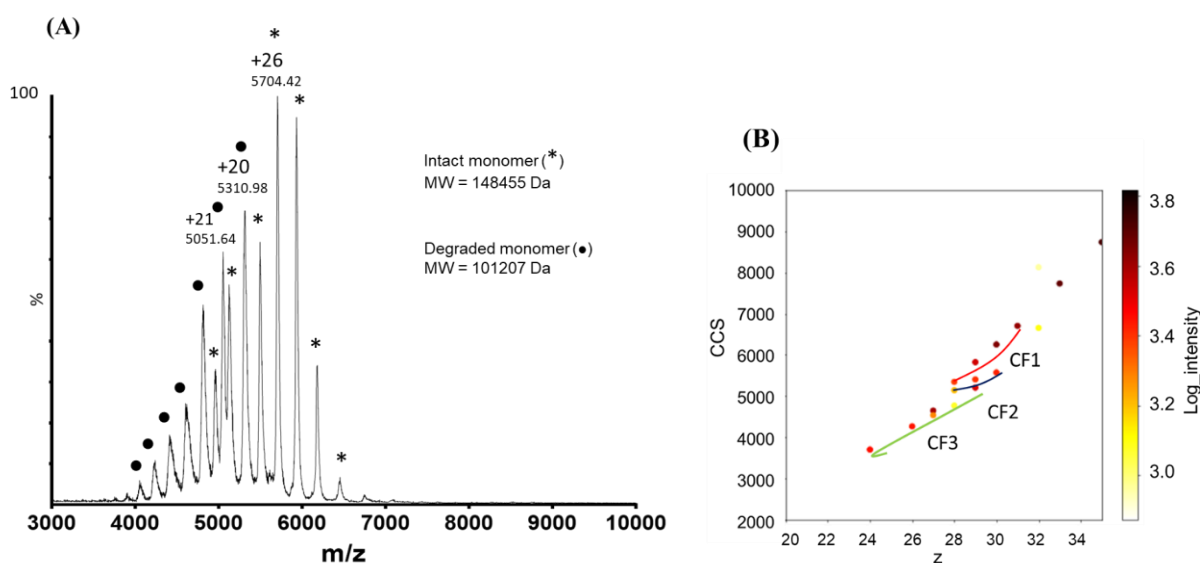
unfolded mAbs exposing charges and hydrophobic moieties rendering them prone to interact with the stationary surface of the column (based on silica coated by a hydrophilic layer). Both species folded and unfolded exhibited a poor chromatographic resolution. The dimers exhibited a mass spectrum ranging from 6000 to 8500  $m/z$  with a deconvoluted mass corresponding to 296 815 kDa with the charges centering at 41+ (Figure 3.3.7 C).



**Figure 3.3.7:** On-line SEC-FLD/MS analysis of trastuzumab (A) mass spectra of fresh sample (B) Mass spectra of stressed trastuzumab - peak monomer at  $t_R$  9.2 min in Figure 3.3.6 D. (C) Mass spectrum of stressed trastuzumab - peak dimer  $t_R$  7.9 min in Figure 3.3.6 B. Experimental conditions as mentioned in Figure 3.3.5.

To better understand the results obtained by SEC FLD native MS, this stressed sample was analyzed by the SEC hyphenated online to ESI-IMS-MS Synapt G2-Si Water. For non-denaturing experiments, instrumental and hardware parameters of IMS-MS were optimized to obtain the best average signal to noise ratio for all the protein complexes while preserving intact the quaternary

structures. In the monomer fraction, mass spectrum showed intact antibody having an average molecular weight of  $148\,455 \pm 40$  Da as well as a degraded form with an average molecular weight of  $101\,207$  Da (Figure 3.3.8 A). Since ion mobility data were recorded in the same time, we were able to describe the conformational landscape of the intact antibody (Figure 3.3.8 B). This plot displays the collisional cross sections (CCS) of the molecule as a function of the charge state ( $\text{CCS} = f(z)$ ). The obtained CCS showed that 3 different conformations (CF1, CF2, CF3) of intact trastuzumab exist in this monomeric fraction (Figure 3.3.8 B). CF3 exhibits a low CCS ( $3800\text{-}5000 \text{ \AA}^2$ ) and low CSD ranging from  $24+$  to  $30+$  which corresponds to folded monomer. Reversely, CF1 and CF2 exhibit higher CCS (more than  $5000 \text{ \AA}^2$ ) and higher charges (from  $28+$  to  $32+$ ) which could correspond to the modified conformational monomer. These results assessed the co-existence in the sample of folded and unfolded mAbs.



**Figure 3.3.8:** (A) Mass spectra monomeric peak of stressed Trastuzumab analyzed by SEC-IM-MS. (B) Collision cross section of intact trastuzumab monomer.

Mobile phase conditions and column as mentioned in Figure 3.3.5. IM-MS conditions as mentioned in experimental section.

### **III.3.4. Conclusion**

Here we developed a method based on online hyphenation SEC-FLD/MS that is suitable for application of therapeutic mAbs quality control. This method allowed characterization of degraded molecules from mAbs (i.e. dimer, fragment, unfolded monomer) in the infusion bag within a single analysis. This is not possible with the methods currently employed in hospital i.e. SEC-UV, visual control or FIA. In-depth studies in analysis condition have been performed to understand the eventual artificial conformational changes of mAbs with this method. This set-up thereby allowed the discrimination of mAbs artificial dimer formed during the MS analysis from aggregate species originally present in the sample. Additionally, an online hyphenation of SEC to IMS-MS was performed to qualitatively confirm the presence of unfolded monomer in trastuzumab stressed sample.



### **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interest.

### **Acknowledgments**

This work has been financially supported by the Doctoral school of Chemical Science of University Paris Saclay.

This work was supported in part by ITAAM project (Grant ANR-10-LABX-33, Laboratory of Excellence LERMIT).

### **Corresponding author:**

Prof. Claire Smadja, Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science, CNRS, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay.

[claire.smadja@u-psud.fr](mailto:claire.smadja@u-psud.fr)

Telephone: 0033146835942

### References of Article 3

- [1] A.S. De Groot, D.W. Scott, Immunogenicity of protein therapeutics, *Trends Immunol.* 28 (2007) 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.011>.
- [2] C. Maas, S. Hermeling, B. Bouma, W. Jiskoot, M.F.B.G. Gebbink, A Role for Protein Misfolding in Immunogenicity of Biopharmaceuticals, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 2229–2236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605984200>.
- [3] K.D. Ratanji, J.P. Derrick, R.J. Dearman, I. Kimber, Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation, *J. Immunotoxicol.* 11 (2014) 99–109. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.821564>.
- [4] A. Konijnenberg, A. Butterer, F. Sobott, Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* 1834 (2013) 1239–1256. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.11.013>.
- [5] J. Zhang, G.R. Malmirchegini, R.T. Clubb, J.A. Loo, Native Top-Down Mass Spectrometry for the Structural Characterization of Human Hemoglobin, *Eur. J. Mass Spectrom.* Chichester Engl. 21 (2015) 221–231. <https://doi.org/10.1255/ejms.1340>.
- [6] A.C. Leney, A.J.R. Heck, Native Mass Spectrometry: What is in the Name?, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 5–13. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1545-3>.
- [7] S. Fekete, A. Beck, J.-L. Veuthey, D. Guillaume, Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011>.
- [8] K. Muneeruddin, J.J. Thomas, P.A. Salinas, I.A. Kaltashov, Characterization of Small Protein Aggregates and Oligomers Using Size Exclusion Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10692–10699. <https://doi.org/10.1021/ac502590h>.
- [9] J. Woodard, H. Lau, R.F. Latypov, Nondenaturing Size-Exclusion Chromatography-Mass Spectrometry to Measure Stress-Induced Aggregation in a Complex Mixture of Monoclonal Antibodies, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6429–6436. <https://doi.org/10.1021/ac401455f>.
- [10] Tassi Marco, Vos Jelle, Chatterjee Sneha, Sobott Frank, Bones Jonathan, Eeltink Sebastiaan, Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products, *J. Sep. Sci.* 41 (2017) 125–144. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700988>.
- [11] G. Terral, A. Beck, S. Cianféroni, Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization, *J. Chromatogr. B.* 1032 (2016) 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.044>.
- [12] A. Ehkirch, O. Hernandez-Alba, O. Colas, A. Beck, D. Guillaume, S. Cianféroni, Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products, *J. Chromatogr. B.* 1086 (2018) 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.010>.
- [13] C. Ren, A.O. Bailey, E.C. VanderPorten, A. Oh, W. Phung, M.M. Mulvihill, S.F. Harris, Y. Liu, G. Han, W. Sandoval, Quantitative determination of protein-ligand affinity by size exclusion chromatography directly coupled to high-resolution native mass spectrometry, *Anal. Chem.* (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03829>.
- [14] G. Van der Rest, F. Halgand, Size Exclusion Chromatography-Ion Mobility-Mass Spectrometry Coupling: a Step Toward Structural Biology, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 2519–2522. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1810-0>.

- [15] A. Ehkirch, A. Goyon, O. Hernandez-Alba, F. Rouviere, V. D'Atri, C. Dreyfus, J.-F. Haeuw, H. Diemer, A. Beck, S. Heinisch, D. Guillarme, S. Cianferani, A Novel Online Four-Dimensional SEC×SEC-IM×MS Methodology for Characterization of Monoclonal Antibody Size Variants, *Anal. Chem.* 90 (2018) 13929–13937. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03333>.
- [16] A. Goyon, S. Fekete, A. Beck, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Unraveling the mysteries of modern size exclusion chromatography - the way to achieve confident characterization of therapeutic proteins, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1092 (2018) 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.029>.
- [17] A. Goyon, S. Fekete, A. Beck, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Unraveling the mysteries of modern size exclusion chromatography - the way to achieve confident characterization of therapeutic proteins, *J. Chromatogr. B.* 1092 (2018) 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.029>.
- [18] J. Fernandez de la Mora, Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism, *Anal. Chim. Acta.* 406 (2000) 93–104. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00601-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00601-7).
- [19] J.B. Hedges, S. Vahidi, X. Yue, L. Konermann, Effects of Ammonium Bicarbonate on the Electrospray Mass Spectra of Proteins: Evidence for Bubble-Induced Unfolding, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6469–6476. <https://doi.org/10.1021/ac401020s>.
- [20] T. Arakawa, D. Ejima, T. Li, J.S. Philo, The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 1674–1692. <https://doi.org/10.1002/jps.21974>.
- [21] P. Lössl, J. Snijder, A.J.R. Heck, Boundaries of Mass Resolution in Native Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25 (2014) 906–917. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0874-3>.

### Conclusion du chapitre III.3

En conclusion, les travaux réalisés nous ont permis d'identifier les conditions expérimentales responsables de la formation artificielles de dimères. Ceci nous a permis pour la suite des expériences de développer la phase mobile suivante ; ammonium acétate 100 mM pH 6.0, 10 % acétonitrile. Cette phase mobile a été choisi en analysant l'influence des différentes phases mobiles à base d'ammonium acétate, bicarbonate ou formiate.

Nous avons également montré que l'infliximab dans les conditions expérimentales ainsi développées conserve sa capacité à interagir avec sa cible biologique le TNF $\alpha$ . Cependant, la méthode ne nous permet pas de déterminer précisément l'affinité de l'infliximab pour le TNF $\alpha$  et donc si la structure tridimensionnelle est totalement conservée dans ces conditions expérimentales.

La méthode a ensuite été appliquée à l'analyse d'un échantillon de trastuzumab stressé, permettant d'identifier la présence de monomères, dimères, trimères et des fragments par SEC-FLD/MS. L'analyse simultanée par spectrométrie de masse en mode native a permis de confirmer la présence de monomères, natifs et dénaturés ainsi que la présence de dimères. En revanche, il n'a pas été possible de confirmer par spectrométrie de masse la présence des trimères. Ceci est lié aux limites de l'appareil de spectrométrie de masse.

Dans le chapitre suivant, nous avons évalué l'impact d'un stress (UV) sur le comportement de différents anticorps thérapeutiques en utilisant le méthode SEC-FLD/MS développé dans ce chapitre.

### III.3.5. Influence of light to degradation and aggregation to multi therapeutic monoclonal antibodies

This study aims at evaluating the influence of environmental factors on the stability of therapeutic mAbs in the hospital context. This is why, the temperature (4°C, 10 days; 20 °C, 7 days and 37°C, 3 days), agitation (horizontal agitation at 1000 rpm during 7 hours) and light (UV 365 nm for 24 hours) have been chosen to induce the degradation of therapeutic mAbs. The developed SEC-FLD/native-MS has been employed to detect the eventual degraded molecules (denatured monomer and aggregates) from stressed samples. The obtained results after heating and agitation did not show any detection of the physical degradation (Data not shown). After UV light, denaturation and aggregation of all the studied mAbs have been observed. Therefore, the experiments presented hereafter are related to UV stress.

Five commercially therapeutic mAbs at different classes and generations were employed for this study (Table 3.3.1): pertuzumab (30 mg/mL, Perjeta) ; infliximab (100 mg, Inflectra) ; nivolumab (10 mg/mL, Opdivo), ipilimumab (5mg/mL, Yervoy) and pembrolizumab (25 mg/mL, Keytruda).

**Table 3.3.1:** List of studied therapeutic mAbs

mAbs	MW (Da)	Class	Generation
<b>Pembrolizumab</b>	149100	IgG4	Humanized
<b>Nivolumab</b>	146221	IgG4	Human
<b>Infliximab</b>	149100	IgG1	Chimeric
<b>Pertuzumab</b>	148088	IgG1	Humanized
<b>Ipilimumab</b>	148000	IgG1	Human

The mAbs solutions were separately compounded using 0.9% NaCl solution to reach a final concentration of 1 mg.mL<sup>-1</sup> (see Experimental section of Article 2). The solutions were aliquoted into Eppendorf protein Lo-bind (200 µL/Eppendorf) and then submitted to the UV 365 nm with the

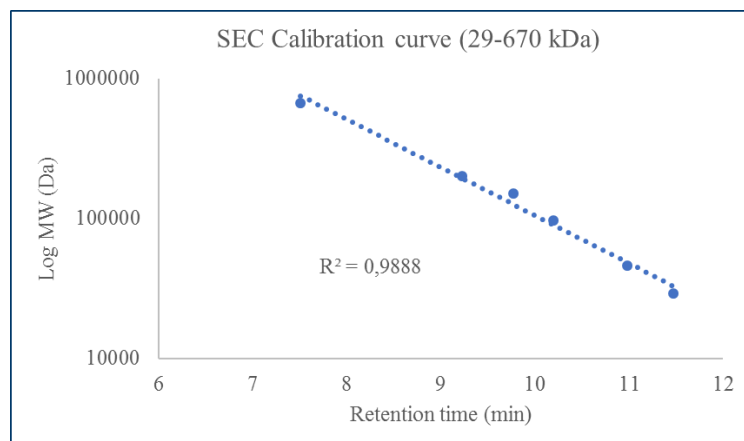
UV BiolinkBLX (Fischer Scientific, MA, USA) for 5, 10, 16 and 24 hours (triplicate at each condition) at room temperature.

The stressed samples were analyzed by SEC-FLD/MS (See experimental section of Article 3). A mobile phase composed by 150 mM ammonium acetate and isopropanol (90/10, v/v) at pH 6.5 has been chosen for Infliximab, Nivolumab and Pertuzumab. With this mobile phase, a broad peak has been observed for Ipilimumab and Pembrolizumab probably related to their high hydrophobic property (See supporting information of Article 2). Therefore, a higher isopropanol percentage in mobile phase has been used for the analysis of Ipilimumab and Pembrolizumab (150 mM ammonium acetate and isopropanol, 85.5/14.5, v/v) at pH 6.5.

The analytical methods have been validated in terms of specificity (FLD and MS signal); repeatability, intermediate repeatability and linearity (only with FLD signal). For repeatability and intermediate repeatability, the relative standard deviation (RSD) of peak area and retention time for mAb were below 2.0 %. An excellent linearity was obtained for peak area for an injected amount of mAbs ranging from 1.0 to 20.0  $\mu$ g. (Table 3.3.2). The amount of monomeric mAb after being stressed will be estimated. Log MW vs retention time of standard proteins (ranging from 29 kDa to 669 kDa) in the column fractionation domain has been performed (Figure 3.3.9).

**Table 3.3.2:** Slopes, intercepts and coefficients of linear regression of mAb monomeric peak area in terms of mAb quantity concentration

	Ipilimumab	Pembrolizumab	Infliximab	Pertuzumab	Nivolumab
Intercept	97.79	43.38	10.53	149.61	160.70
Slope	263.36	132.09	167.62	242.98	201.26
R <sup>2</sup>	0.9987	0.9995	0.9993	0.9963	0.9956

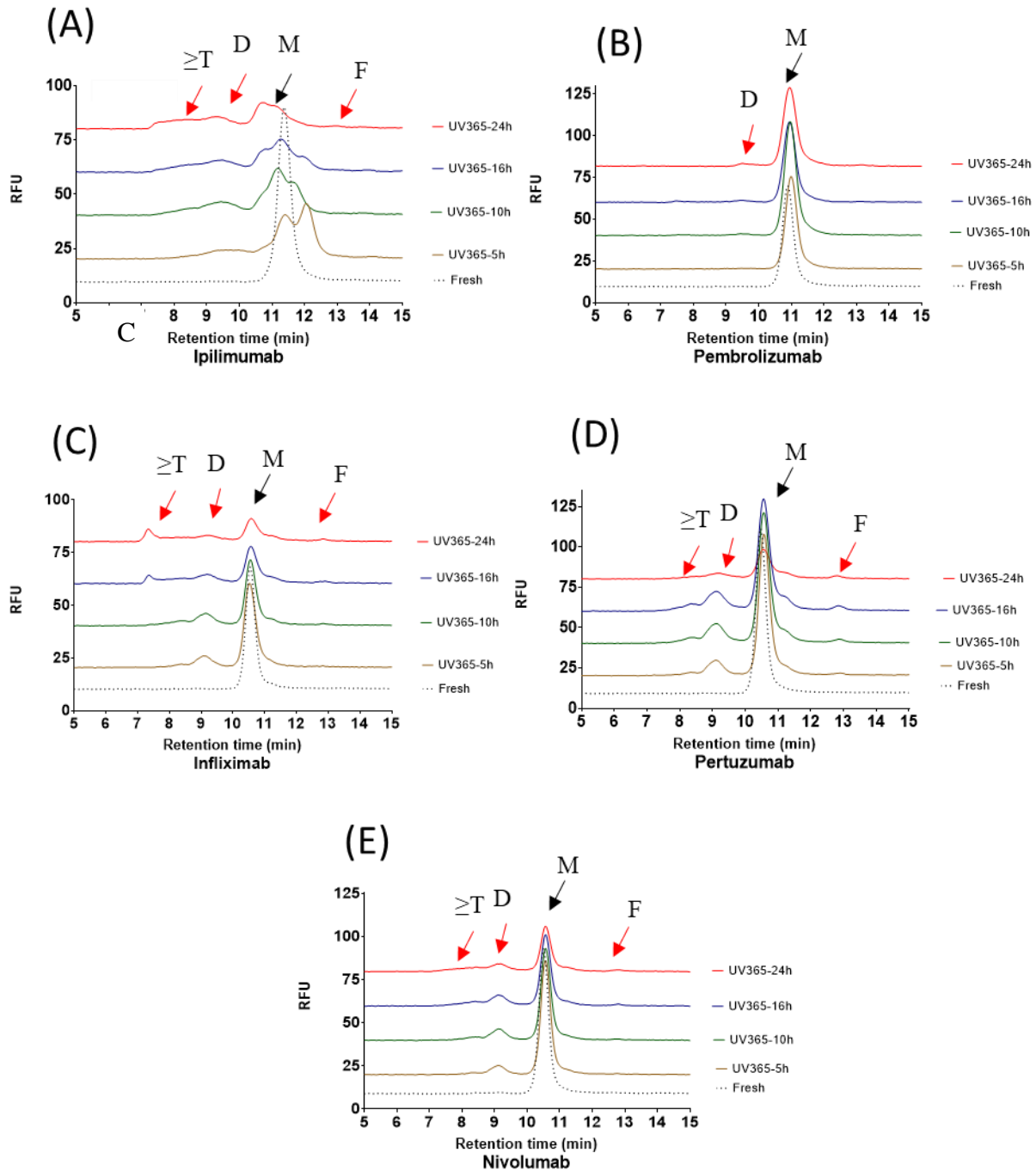


**Figure 3.3.9:** Calibration curve of log MW vs retention time of standard proteins (Carbonic anhydrase, 29 kDa; Ovalbumin, 46 kDa; BSA, 66 kDa; Phosphorylase B, 97 kDa; Alcohol dehydrogenase, 150 kDa;  $\beta$ -Amylase, 200 kDa and Thyroglobulin, 670 kDa)

The obtained results SEC-FLD/native MS showed that (i) the aggregates, fragments have detected by FLD detector (Figure 3.3.10-11); and (ii) denatured monomers by MS (Figure 3.3.12). Moreover, different behaviors of mAbs under light stress have been observed.

- *Aggregation of therapeutic mAbs*

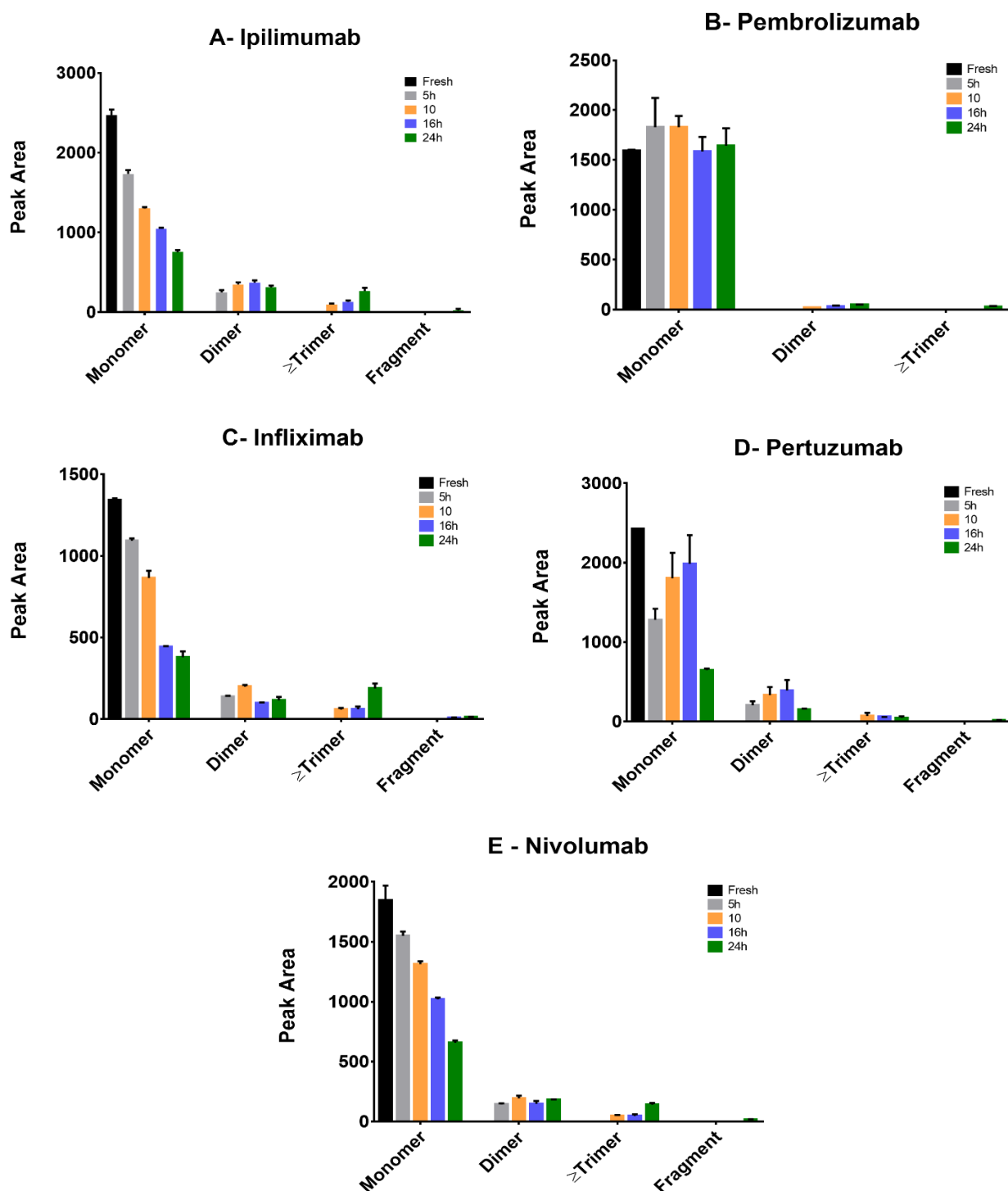
Aggregation profiles were showed in Figure 3.3.10. Pembrolizumab seems to be more stable compared to other antibodies since only small peaks corresponding to dimers and trimers have been detected after a 24 h stress (Figure 3.3.10 B). We have detected higher signals of dimers and trimers (and/or higher molecular weight species) after 5 hours and 10 hours of stress, respectively for Ipilimumab, Infliximab, Pertuzumab and Nivolumab. The fragments were detected after 16 hours of stress for Infliximab and after 24h for Ipilimumab, Pertuzumab and Nivolumab (Figure 3.3.10 A, C, D, E).



**Figure 3.3.10:** Chromatograms (SEC-FLD) of stressed mAbs. On the Figures,  $\geq T$ , D, M and F correspond to trimer and/or higher molecular weight species, dimer, monomer and fragment, respectively. (A) Ipilimumab, (B) Pembrolizumab, (C) Infliximab, (D) Pertuzumab and (E) Nivolumab (Analysis condition: Experimental section).



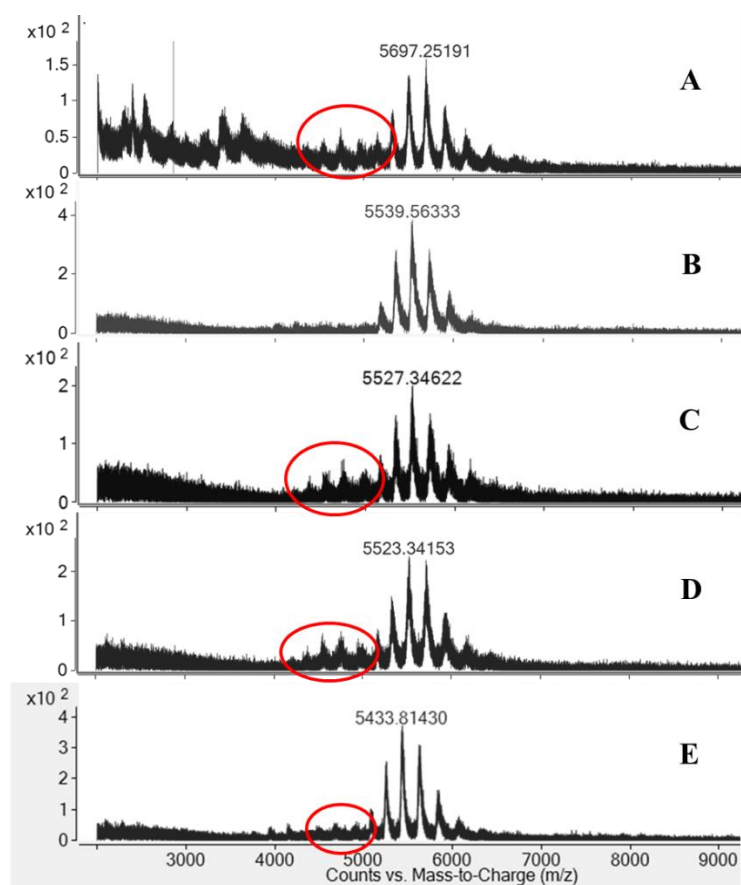
Therefore, the aggregation kinetic could be evaluated. The variations of peak area for monomer and small aggregates vs time under UV light are depicted Figure 3.3.11.



**Figure 3.3.11:** Diagrams of different species obtained from peak area with fluorescence signals of stressed mAbs (A) Ipilimumab, (B) Pembrolizumab, (C) Infliximab, (D) Pertuzumab and (E) Nivolumab

- Denaturation of therapeutic mAbs

SEC coupled to native MS allow discrimination between native and unfolded mAbs. Indeed, a denatured (or unfolded) monomer exhibited a higher charge state distribution and were founded at lower mass-to-charge ratio compared to native/folded monomers. In this study, denatured mAbs have been detected after 5 hours of stress for Ipilimumab, Infliximab, Pertuzumab; and 16 hours for Nivolumab. The signals corresponding to denatured state increased with the time stress duration. We present hereafter the mass spectrum of monomeric fraction after 24 hours of UV stress (Figure 3.3.12). The denatured monomer was not detected in the case of pembrolizumab.



**Figure 3.3.12:** Mass spectrum of monomeric fraction of stressed mAbs. The signals in red circle correspond to the envelop of denatured monomer.

(A) Ipilimumab, (B) Pembrolizumab, (C) Infliximab, (D) Pertuzumab and (E) Nivolumab

We can conclude from these experiment that mAbs exhibit a different behavior under the UV stress. Indeed, the influence of the light to the stability of IgG1 has been reported. A study demonstrated that the light induced the chemical changes by oxidation of tryptophan, tyrosine, phenylalanine or cysteine leading to promote the cross-linking reactions and therefore the aggregation [B.A. Kerwin, et al., J Pharm Sci. 96, 2007]. However, Hernández-Jiménez *et al.* showed that the number of these amino acids in the primary structure could not allow to explain the different profiles of aggregation of five therapeutic studied mAbs [J. Hernández-Jiménez, et al., J Pharm Sci. 105, 2016]. That is why, the photodegradation of the therapeutic mAbs should be related to their higher-order structure and their formulation excipients [J. Hernández-Jiménez, et al., J Pharm Sci. 105, 2016].

## **PARTIE IV : CONCLUSION et PERSPECTIVES**

La détection d'agrégats d'Acm est indispensable pour assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité des Acms thérapeutiques. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux agrégats en phase précoce (dimère, trimère, oligomère) et aux états intermédiaires des anticorps avant le stade de l'agrégation. Des méthodes analytiques utilisant l'approche « native » MS ou les conditions dénaturantes sont limitées couplée avec la CZE et la SEC, ont été donc développées avec succès pour ces objectifs. Avec ces deux méthodes, nous avons détecté plusieurs conformations d'anticorps sous forme monomérique (dénaturés ou non) ou dimérique ainsi que des fragments. En effet, grâce aux conditions presque neutre de MS permettant de conserver la structure, ces conformations ont été séparées et détectées.

La méthode CZE-native MS utilisant le revêtement PB-DS-PB a montré sa capacité à analyser l'infliximab dans ses différents états et à étudier le mécanisme d'agrégation de cet anticorps lorsqu'il est soumis à un stress. Dans un deuxième temps, nous avons identifié un revêtement covalent stable, le DMA-GMA-MAPs neutre, permettant d'analyser des anticorps thérapeutiques. Celui-ci s'est révélé très stable et un grand nombre d'analyses ont pu ainsi être réalisées en CZE-UV. La robustesse de cette méthode CZE-MS utilisant ce capillaire a été confirmée en analysant un échantillon d'infliximab stressé sur deux instruments CE-MS qui se situent dans deux laboratoires différents. Néanmoins, un prétraitement par dialyse de l'échantillon d'infliximab est encore nécessaire pour obtenir une détection sensible en MS. Cependant, nous avons également constaté qu'un tampon d'analyse en condition presque « native » ne permettait pas de réaliser une séparation complète des différentes conformations d'Acm par EC lorsque ce revêtement est utilisé. Récemment, l'équipe de Professeur Neusüss à l'University Aalen (Allemagne) a développé et utilisé l'EC bidimensionnelle couplée à la MS pour l'analyser des glycanes et des protéines intactes. Avec cette technique, la première dimension EC utilise une condition classique pour obtenir une meilleure

séparation dans le capillaire, puis la fraction désirée est piégée puis analysée en deuxième dimension par CE avec une condition compatible à la MS. Ainsi, la méthode CZE-native MS semble très prometteuse pour l'analyse d'anticorps thérapeutiques.

L'intérêt de la SEC-native MS pour le contrôle qualité des Acms thérapeutiques a été également démontrée. Notre double détection FLD et MS ont permis d'étudier plusieurs conformations d'anticorps de manière qualitative et quantitative. Les avantages de cette méthode par rapport à CZE-MS reposent sur la possibilité d'analyser directement un échantillon d'Acm reconstitué sans prétraitement et d'appliquer en routine grâce au grand choix de chaînes LC-MS et colonnes SEC existant à l'heure actuelle. De plus, l'utilisation de la SEC bidimensionnelle-MS est une excellente option pour éviter toute sous-estimation d'agrégats et une mauvaise résolution chromatographique en utilisant les conditions non-dénaturantes. A l'heure actuelle, des chaînes LC-2D sont disponibles chez les fournisseurs Agilent, Waters, etc. Ceci permettrait d'appliquer cette méthode pour le contrôle qualité des Acms thérapeutiques non seulement dans l'industrie pharmaceutique mais aussi à l'hôpital.

Finalement, les altérations conformationnelles ont été détectées par native MS lorsque les anticorps étaient soumis à certaines conditions de stress (e.g. stockage à long terme, UV). Cependant, le niveau de structuration de ces conformations est encore inconnu. Pour cela dans le futur, nous souhaiterions utiliser des méthodes orthogonales afin de trouver une corrélation entre le niveau structurel d'anticorps et les états de charges observés en native MS. Les méthodes permettant l'évaluation de la structuration de protéine comme le dichroïsme circulaire, l'échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS), la calorimétrie différentielle à balayage, la spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pourraient être employées.

**Titre :** Approches analytiques pour l'analyse et la caractérisation d'anticorps thérapeutiques dégradés : intérêt de la spectrométrie de masse en mode non-dénaturant

**Mots clés :** Anticorps monoclonal thérapeutique ; Electrophorèse capillaire ; Chromatographie d'exclusion stérique ; Spectrométrie de masse ; Immunogénicité ; Contrôle qualité

**Résumé :** La manipulation des anticorps monoclonaux thérapeutiques (Acm) reconstitués avant administration aux patients est susceptible d'entraîner leurs dégradations physiques (e.g. dénaturation, agrégation). Ceci peut avoir un impact sur leur efficacité et sécurité. Afin d'étudier la conformation et la stabilité des Acms reconstitués, nous avons développé des méthodes séparatives couplées avec la spectrométrie de masse (MS) en conditions non-dénaturantes (« native »). Une méthode de CZE-native MS utilisant un revêtement constitué d'une triple-couche ionique a été développée pour séparer et détecter les différentes conformations (monomère natifs, dénaturés, dimères) d'Infliximab. Une étude approfondie réalisée en analysant de l'infliximab digéré a permis d'établir que la formation du dimère était liée à la dénaturation du fragment Fab. L'intérêt des revêtements statiques (commerciaux et préparés *in situ*) ont été étudiés pour analyser les

Acms par CZE-UV et CZE-MS. Nos résultats ont montré l'intérêt d'un nouveau revêtement monolithique. Un couplage simultané de la SEC avec la MS et un détecteur de fluorescence a été développé. Nous avons ainsi identifié les conditions expérimentales qui entraînaient des dénaturations et des dimérisations artificielles. Cette méthode a ensuite été également appliquée avec succès pour la caractérisation d'un échantillon de Trastuzumab stressé. Une méthode orthogonale en utilisant la SEC-mobilité ionique-MS a été employé pour évaluer la proportion de monomères dénaturés par rapport aux monomères natifs. La méthodologie ainsi développée permettra la détection de très faibles taux d'anticorps dégradés dans des poches d'infusion. Ceci permettra de définir les paramètres critiques à maîtriser lors de la reconstitution et la manipulation d'anticorps à usage hospitalier.

**Title:** Analytical approaches for the analysis and characterization of degraded therapeutic antibodies: potentials of native mass spectrometry

**Keywords:** Therapeutic monoclonal antibody; Capillary electrophoresis; Size exclusion chromatography; Mass spectrometry; Immunogenicity; Quality control

**Abstract:** Manufacturing and manipulation of therapeutic monoclonal antibodies (mAb) in the hospital before administration to patient is prone to induce their physical degradations (e.g., denaturation, aggregation). This may impact their efficacy and safety. To study the stability of mAbs, capillary zone electrophoresis (CZE) and size exclusion chromatography (SEC), coupled to native mass spectrometry (MS) have been developed.

CZE-native MS method using a triple-layer coating was developed to detect and separate different conformational states (unfolded monomer, dimer) of Infliximab in a single analysis. In-depth study with digested infliximab confirmed that dimer formation was related to the Fab fragment. We also focused on covalent coatings in order to find the more adapted coating to analyze mAbs by CZE-UV

and CZE-MS. We also developed for SEC a simultaneous coupling with MS and a fluorescence detector to detect the degraded mAbs. We have identified the biases inducing conformational changes (e.g. dimerization, denaturation) that may arise during native MS. We also successfully characterized aggregates and denatured monomer in stressed Trastuzumab sample. In addition, the orthogonal method SEC-ion mobility-MS has been employed to separate and measure the denatured monomers compared to their related native conformations. Moreover, the developed system enables the detection of a very low levels of degraded mAbs in infusion bags. It allows to define the critical parameters to be controlled during the reconstitution and manipulation of therapeutic mAbs in hospital.

