

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES

THÈSE

présentée par

Nassur SAID

Soutenue le : **18 Septembre 2017**

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique

**Caractérisation de protéines thérapeutiques par
électrophorèse capillaire (CE) couplée à la
spectrométrie de masse (MS)**

THÈSE dirigée par :

Dr. Emmanuelle LEIZE-WAGNER

Directrice de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. Frédéric AUBRIET

Rapporteur externe, Université de Lorraine

Dr. Reine NEHME

Rapporteur externe, Université d'Orléans

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Maurice MILLET

Président du jury, Université de Strasbourg

Dr Rabbah GAHOUAL

Examineur, Université Paris Descartes

Dr Yannis FRANCOIS

Co-encadrant, Université de Strasbourg

**A ma famille,
A Halima et Liam**

« Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »

Léonard De Vinci

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le professeur Maurice MILLET d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie également le Pr. Frédéric AUBRIET, le Dr. Reine NEHME, le Dr. Rabbah GAHOUAL ainsi que le Dr. Yannis François pour avoir bien voulu évaluer ce travail.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Spectrométrie de masse des interactions et des systèmes (LSMIS) de l'UMR 7140 UDS-CNRS « Chimie de la Matière Complexe » à l'université de Strasbourg sous la direction du Dr. Emmanuelle LEIZE-WAGNER. Je tiens à la remercier pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir encadré et pour toute la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de cette thèse.

Je tiens tous particulièrement à remercier le Dr. Yannis FRANCOIS pour avoir co-encadré ces travaux de thèse, pour tout le soutien qu'il m'a apporté aussi bien au laboratoire qu'en dehors, pour avoir su me motiver et me soutenir dans les durs moments. Un grand merci pour ton aide, tes conseils et ta patience. C'est grâce à toi que j'ai pu mener à terme ce travail de thèse.

Je remercie également le conseil général de Mayotte et plus particulièrement la direction des affaires scolaires et universitaires (DASU) d'avoir financé cette thèse malgré les quelques difficultés rencontrées.

Je tiens aussi à remercier le Dr Alain BECK avec qui j'ai eu la chance de collaborer durant ces travaux de thèse.

Je souhaite remercier toute l'équipe du laboratoire, les anciens, les permanents et ceux qui prennent la relève : Rabbah pour avoir partagé ses connaissances, ses conseils sur le couplage CESI-MS ; Michael pour le soutien et l'initiation au couplage CE-UV/MALDI-MS ; Stéphanie pour ton soutien et tes conseils au laboratoire ; Cecile et Margaux pour votre aide, vos conseils et pour m'avoir supporté tout au long de vos thèse ; Armelle pour son encouragement dans la dernière ligne droite. Je remercie Hélène, Nathalie, Noëlle, Nha-Thi, Jeremy pour leur bonne humeur.

Je souhaite également remercier Laurianne KUHN, Johana CHICHER et Philippe HAMMANN de la plateforme protéomique de l'IBMC pour avoir répondu à mes différentes questions techniques et surtout sur l'utilisation du logiciel Analyst.

Des remerciements tout particuliers à ma famille ; ma mère ma première supportrice qui a toujours cru en moi et m'a toujours soutenue. A ma tante et mon oncle les piliers de ma jeunesse qui m'ont appris à devenir une personne autonome et travailleuse.

A toutes les personnes qui ont de près ou de loin contribué à faire de moi la personne que je suis devenue.

Sommaire général

Introduction Générale.....	1
Partie 1 : Revue Bibliographique....	5
Chapitre 1 : L'électrophorèse capillaire.....	6
1. Introduction	6
2. L'électrophorèse capillaire de zone	7
2.1. Principe.....	7
2.2. L'électromigration.....	7
2.3. L'électroosmose	8
2.4. Les grandeurs caractéristiques	10
3. La chromatographie électrocinétique micellaire	12
4. L'électrochromatographie capillaire	13
5. L'électrophorèse capillaire en gel	14
6. L'isotachophorèse.....	14
7. La focalisation isoélectrique capillaire	16
Chapitre 2 : La spectrométrie de masse au service des complexes biologiques.....	20
1. Introduction	20
2. Les sources d'ionisations.....	21
2.1. L'ionisation électrospray (ESI)	21
2.2. L'ionisation par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)	24
3. Les analyseurs.....	27
3.1. L'analyseur quadripolaire (Q)	28
3.2. L'analyseur à temps de vol (TOF)	29
Chapitre 3 : Les couplages entre l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse: CESI-MS et CE-MALDI-MS	34
1. Introduction	34
2. Interfaces CE-ESI-MS	34
2.1. Interfaces CE-ESI-MS « sheath-liquid »	35
2.2. Interfaces CE-ESI-MS « junction liquid »	36
2.3. Interfaces CE-ESI-MS « sheathless »	37
3. Interfaces CE-MALDI-MS	40
3.1. Interfaces CE-MALDI-MS indirectes	41
Chapitre 4 : L'analyse protéomique par spectrométrie de masse	52

1. Introduction	52
2. Spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique.....	53
2.1. Fragmentation des peptides.....	53
2.2. Stratégie de l'empreinte peptidique massique	54
2.3. Stratégie par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	55
3. Top Down par fragmentation « Ion Source Decay (ISD)».....	56
3.1 Influence de la matrice	56
3.2. Fragmentation des protéines	58
Chapitre 5 : Les anticorps monoclonaux et les anticorps conjugués.....	62
1. Introduction	62
2. Les anticorps monoclonaux	62
3. Traitement thérapeutique à bases de mAbs.....	64
4. Les anticorps conjugués	65
5. Caractérisation des mAbs et des ADCs par CE-MS	67
5.1 Amino acid sequence characterization and peptide mapping.....	68
5.2 Glycosylation characterization.....	69
5.3 Middle-up analysis.....	70
5.4 Intact analysis	71

Partie 2

<i>Caractérisation d'anticorps monoclonaux par approche middle-up et top-down à l'aide du couplage indirect CE-MS.....</i>	<i>75</i>
--	-----------

Chapitre 1 : Séparation et caractérisation de glycoformes de Cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS	76
1. Introduction	76
2. Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-line CZE-UV/ESI-MS	78
2.1. Abstract	78
2.2. Introduction	79
2.3. Experimentals Section.....	80
2.4. Results and discussions	83
2.5. Conclusion	93
2.6. Acknowledgments.....	94
2.7. References	94
3. Conclusion.....	101

Chapitre 2 : Caractérisation de dimères de fragments Fc/2 de cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS	102
1. Introduction	102
2. Characterization of Cetuximab Fc/2 aggregates by Off-line CZE-MS	104
2.1. Abstract	104
2.2. Introduction	105
2.3. Materials and Methods	106
2.4. Results and discussions	108
2.5. Conclusion	116
2.6. Acknowledgments	117
2.7. References	117
3. Conclusion	123
Chapitre 3 : Approche middle-down pour la caractérisation de fragments Fc/2 de cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS	124
1. Introduction	124
2. Top-down and middle-down approach by fraction collection enrichment using Off-line capillary electrophoresis – mass spectrometry coupling: application to monoclonal antibody Fc/2 charge variants	126
2.1. Abstract	126
2.2. Introduction	127
2.3. Experimentals	128
2.4. Results and discussions	130
2.5. Conclusion	137
2.6. Acknowledgments	138
2.7. References	138
3. Conclusion	142
Chapitre 4 : Séparation des variants du cetuximab par CE-ESI-MS	143
1. Introduction	143
2. Résultats	144
2.1 Développement et optimisation de méthodes de séparation par CE-UV :	144
2.1.1 Influence du greffage	144
2.1.2 Influence de l'électrolyte support (BGE)	144
2.1.2.1 Effets de l'acide formique (FA)	144
2.1.2.2 Effets de l'acide acétique (AA)	145
2.1.2.3 Effets de l'acétate d'ammonium (AcONH ₄)	146

2.1.2.4 Effets du pH	148
2.2 Séparation et caractérisation des variantes de charges du cetuximab middle-up par CESI-MS 149	
2.2.1 Séparation du cetuximab en condition dénaturante par CESI-MS.....	150
2.2.2 Séparation du cetuximab en condition « pseudo-native » par CESI-MS.....	151
3. Conclusion	152

Partie 3

<i>Caractérisation structural d'anticorps conjugués par CESI-MS à différents niveaux : intact, middle-up et peptide.</i>	<i>155</i>
---	------------

Chapitre 5 : Caractérisation à différents niveaux d'anticorps conjugués par la combinaison d'approches MS native, middle-up et bottom-up protéomique à l'aide du couplage CESI-MS	156
---	-----

1. Introduction	156
2. Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method	158
2.1. Abstract	158
2.2. Introduction	159
2.3. Materials and Methods	160
2.4. Results and discussions	163
2.5. Conclusion	172
2.6. Acknowledgments.....	173
2.7. References	173
3. Conclusion	178

Conclusion Générale et Perspectives

Introduction générale

Depuis l'approbation du premier anticorps monoclonal en 1986 par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration, FDA), les anticorps monoclonaux (mAbs) et leurs dérivés, tels que les biosimilaires, les anticorps monoclonaux conjugués (ADCs) ou les protéines fusions, occupent une grande place sur le marché des industries biopharmaceutiques. On compte actuellement plus de 60 mAbs thérapeutiques approuvés par la FDA¹ et plus de 50 au dernier stage d'évaluation clinique². Utilisées dans de nombreuses thérapies pour le traitement de nombreux cancers et maladies auto-immunes, ces biomolécules possèdent d'excellentes propriétés thérapeutiques intéressantes telles que la réduction d'effets secondaires ou l'efficacité et la spécificité par rapport à un antigène ciblé. Les mAbs sont des glycoprotéines complexes présentant de nombreuses micro-hétérogénéités pouvant influencer sur leur efficacité dans l'organisme. De ce fait, il convient de développer des méthodes analytiques précises, rapides et robustes afin de les caractériser.

Parmi les différentes techniques analytiques existantes, la spectrométrie de masse (MS) apparaît aujourd'hui comme la technique de prédilection pour l'analyse de ces biomolécules. En effet l'amélioration constante des performances instrumentales en termes de rapidité, de précision de mesure, de résolution ou de sensibilité, permet la caractérisation structurale de biomolécules de plus en plus complexes telles que les mAbs. Cela a été possible grâce au développement de sources d'ionisations douces telles que l'électrospray (ESI) et la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) qui permettent l'analyse d'ions de haut poids moléculaires. Malgré la puissance des MS actuels, ce système de détection est, d'une manière générale, couplée à une méthode séparative telle que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le couplage HPLC-MS, noté aussi LC-MS, apparaît aujourd'hui comme la technique de référence pour l'analyse de mélanges protéiques. En effet ce couplage permet d'obtenir des analyses reproductibles ainsi que des informations structurales de plus en plus précises nécessaires à la caractérisation sans ambiguïté des mAbs³. Toutefois cette technique connaît des limites notamment pour la séparation de variants de charges des mAbs tels que les glycoformes. Ces glycosylations, portées par le mAbs, sont connues pour être une modification importante pouvant influencer sur des propriétés immunogéniques de ces derniers. De ce fait leur caractérisation fine est devenue une nécessité⁴. C'est donc dans ce contexte que des couplages tels que l'électrophorèse capillaire (CE) couplée à la MS ont été développées afin de permettre une caractérisation complémentaire, rapide et à plusieurs niveaux moléculaires.

La CE est une famille de technique séparative permettant la séparation de composés de poids moléculaires très variables, sous l'effet d'un champ électrique, dans un capillaire de faible diamètre interne.

Elle a été principalement utilisée pour la séparation de molécules biologiques telles que les protéines, les peptides, les métabolites et les extraits environnementaux⁵. Les propriétés intrinsèques de la CE comme l'utilisation d'électrolytes support (BGE) de fortes forces ioniques et la nécessité de maintenir le courant électrique tout au long de la séparation avait contraint cette technique principalement à des détecteurs conventionnels tels que la détection UV, électrochimique ou encore la fluorescence induite par laser (LIF). La possibilité d'un couplage CE-MS a considérablement redonné de l'intérêt à cette technique et plus particulièrement pour l'analyse de molécules biologiques.

Depuis les années 1980, un grand nombre d'interface CE-MS ont été développées^{6,7,8}. La source ESI, qui permet l'ionisation en phase gazeuse des composés présents dans un milieu liquide, apparaît comme la source de choix pour le couplage CE-MS puisqu'il permet la détection d'espèces multichargées à haut poids moléculaires. Les molécules peuvent être directement transférées au MS via une interface⁵. La géométrie de l'interface est cruciale puisqu'elle conditionne les performances du couplage CE-MS. Actuellement il existe trois différents types d'interfaces du couplage CE-ESI-MS : l'interface coaxiale à liquide additionnel dite « Sheath liquid », l'interface à jonction liquide et l'interface sans liquide additionnel dite « Sheathless ». Toutefois la majorité des interfaces développées ont tendance à souffrir d'un manque de robustesse et, pour la plupart d'entre elles, impliquent une réduction de la sensibilité. Récemment une interface innovante CE-ESI-MS de type « Sheathless » a été développée par le Dr Mehdi Moini (Smithsonian Institution, Suitland, MD) permettant d'obtenir une excellente robustesse et des nano-débits couplée à une MS à haute sensibilité. Cette interface, notée CESI-MS, est aujourd'hui commercialisée par la société Sciex sous le nom de CESI8000. Les travaux présentés durant cette thèse seront en partie focalisés sur l'application de ce couplage CESI-MS pour la caractérisation fine de protéines thérapeutiques.

Toutefois l'une des limites majeures de ce couplage CE-ESI-MS résulte de la nature physico-chimique du BGE. En effet la présence de sel ou de composés non-volatils dans le BGE peut affecter fortement la stabilité du spray. Le couplage CE-MALDI-MS se présente, de ce fait, comme une bonne alternative à ce couplage CE-ESI-MS puisque la source MALDI-MS est plus tolérante aux milieux salins ou aux détergents. Différentes stratégies permettant le couplage CE-MALDI-MS ont été décrites^{9,10}. La quasi-totalité des interfaces reprennent les principes du couplage CE-ESI-MS, à savoir l'utilisation d'un liquide additionnel coaxial, la jonction liquide ou l'utilisation d'un capillaire conducteur afin de maintenir le courant tout au long de la séparation. En ce qui concerne le dépôt solide, principe fondamental du MALDI, il existe deux types de couplages : le couplage direct qui consiste à réaliser un dépôt à l'intérieur de la source suivi d'une étape de cristallisation intégrée et le couplage indirect, avec une étape de dépôts sur cible hors de la source suivi d'une étape de passage manuel ou automatisé de la cible dans la source. Le couplage indirect, plus facile à mettre en œuvre, est le plus utilisé car il ne demande aucune modification instrumentale du MALDI-MS et offre de nouvelles possibilités quant au traitement de l'échantillon. En effet, le fait de fractionner l'échantillon permet d'enrichir, digérer ou dériver

chimiquement l'échantillon avant l'analyse par MALDI-MS. Lors de ces travaux de thèse, nous nous sommes aussi intéressés à la mise en place, l'évaluation et l'application d'un couplage indirect CE-MALDI-MS totalement automatisables pour la caractérisation fine de protéines thérapeutiques.

Dans ce contexte, les travaux présentés dans ce manuscrit vont s'articuler autour du développement des couplages CE-MALDI-MS et CESI-MS pour la caractérisation de mAbs et d'ADCs. Ils seront structurés de la manière suivante :

- Une première partie sera consacrée à l'étude bibliographique. Elle a pour but de rappeler les principes de l'électrophorèse capillaire, la spectrométrie de masse ainsi que les différentes interfaces développées pour le couplage CE-MS. Une description des techniques de spectrométrie de masse pour la caractérisation de mAbs et leurs dérivés sera aussi développée. Cette partie permettra donc d'avoir les informations nécessaires quant à la compréhension des différentes thématiques et stratégies abordées durant ces travaux de thèse.
- La deuxième partie présentera les différents résultats obtenus quant à la séparation et la caractérisation d'un anticorps monoclonal, le cetuximab, en middle-up et top-down protéomique sur les deux couplages CE-MALDI-MS et CESI-MS. Cette partie sera divisée en quatre chapitres successifs montrant les différentes stratégies abordées sur cette étude.
- Enfin, la troisième partie se focalisera sur la caractérisation à différents niveaux d'un anticorps monoclonal conjugué, le brentuximab, sur le couplage CESI-MS.

références bibliographiques :

- (1) Cai, H. H. *MOJ Immunology* **2017**, 5.
- (2) Reichert, J. M. *mAbs* **2017**, 9, 167-181.
- (3) Fekete, S., et al. *Analytical chemistry* **2016**, 88, 480-507.
- (4) Gahoual, R., et al. *mAbs* **2013**, 5, 479-490.
- (5) Von Brocke, A., et al. *Electrophoresis* **2001**, 22, 1251–1266.
- (6) Olivares, J. A., et al. *Analytical chemistry* **1987**, 59, 1230-1232.
- (7) Suter, M. J.; Caprioli, R. M. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1992**, 3, 198-206.
- (8) Hommerson, P., et al. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20, 1311-1318.
- (9) Stutz, H. *Electrophoresis* **2005**, 26, 1254-1290.
- (10) Huck, C. W., et al. *Electrophoresis* **2006**, 27, 2063-2074.

PARTIE 1 : Revue bibliographique

Chapitre 1 : L'électrophorèse capillaire

Chapitre 2 : La spectrométrie de masse au service des complexes biologiques

Chapitre 3 : Les couplages entre l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse: CESI-MS et CE-MALDI-MS

Chapitre 4 : L'analyse protéomique par spectrométrie de masse

Chapitre 5 : Les anticorps monoclonaux et les anticorps conjugués

Chapitre 1 : L'électrophorèse capillaire

1. Introduction

L'électrophorèse capillaire (CE) représente une famille de technique séparative, complémentaire des méthodes chromatographiques, qui permettent principalement la séparation d'espèces chargées sous un champ électrique. Initialement développée pour l'analyse de molécules biologiques, elle est considérée aujourd'hui comme une méthode de séparation rapide et très performante, couvrant aussi bien l'analyse des petites molécules que des macromolécules biologiques.

Les premières analyses par CE ont été introduites par Hjerten en 1967¹ qui a utilisé des capillaires en quartz de diamètre interne relativement grand (0.3mm). Depuis, et surtout grâce aux travaux de Jorgenson et Lukacs^{2,3} qui utilisaient des capillaires en verre de faible diamètre interne (75µm), la CE a connu un réel développement avec la commercialisation d'instruments performants et automatisables. En effet l'utilisation de capillaire de faible diamètre interne (<100µm) permet de réduire l'échauffement produit par effet joule. De ce fait cela permet, d'une part, d'éviter toutes dégradations des composés à l'intérieur du capillaire, et d'autre part, d'offrir la possibilité d'augmenter l'intensité du champ électrique et de ce fait de donner accès à des séparations plus rapides, plus résolus et d'une grande efficacité de pic.

Grace aux avancées scientifiques, des progrès instrumentaux considérables ont été réalisés sur la CE que ce soit en terme de méthodes d'injection, de modification de la paroi interne des capillaires afin d'éviter d'éventuelles phénomènes d'absorption ou de mode de détection. Ces améliorations ont ouvert la voie au développement de plusieurs mode de séparation électrophorétique et à de nombreuses applications chimiques^{4,5}, pharmaceutiques⁶⁻⁸, agroalimentaires⁹⁻¹¹ et environnementales¹²⁻¹⁴. Ainsi, le champ d'application de la CE s'est considérablement élargi aujourd'hui allant de l'analyse de petites molécules¹⁵, d'ions organiques¹⁶ ou de molécules chirales¹⁷, aux protéines¹⁸ et à l'ADN¹⁹.

La CE regroupe, en effet, plusieurs modes de séparation telles que l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), l'électrochromatographie capillaire (CEC), l'électrophorèse capillaire en gel (GCE), l'isotachophorèse (ITP) et la focalisation isoélectrique capillaire (cIEF). Le choix du mode de séparation électrophorétique dépend naturellement des propriétés physico-chimiques des composés à séparer.

Les travaux de thèse présentés ici ont été réalisés principalement par CZE. De ce fait, j'insisterai plus particulièrement sur son principe contrairement aux autres modes de séparation que j'énoncerai brièvement.

2. L'électrophorèse capillaire de zone

2.1. Principe

L'électrophorèse capillaire de zone, également appelée électrophorèse capillaire libre, représente aujourd'hui le mode de séparation électrophorétique le plus simple et le plus utilisé. Elle permet la séparation des espèces chargées selon leurs tailles et leurs charges électriques à un pH donné. Autrement dit, la séparation des espèces repose sur une différence de vitesse de migration des espèces électriquement chargés sous l'action d'un champ électrique. Cette séparation est possible grâce à deux mécanismes de transport : l'électromigration et l'électroosmose (fig.1).

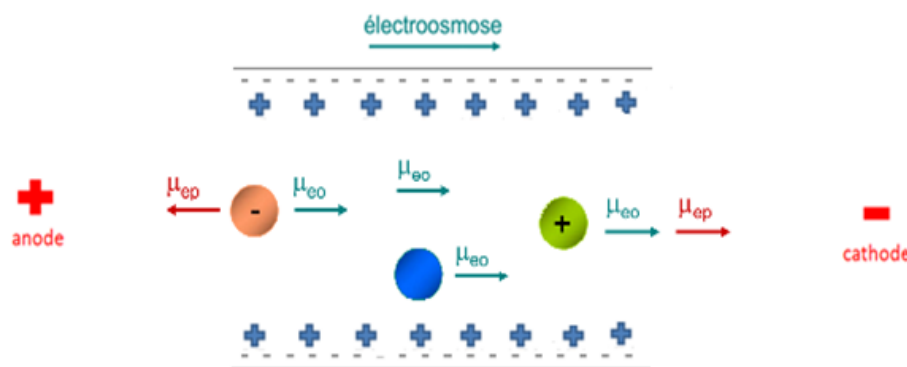


Figure 1 : Représentation schématique du principe de séparation par électrophorèse capillaire de zone

2.2. L'électromigration

L'électromigration correspond au déplacement d'une espèce chargée lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. En CZE, les cations migrent en direction de la cathode tandis que les anions sont attirés vers l'anode. Les espèces se déplacent avec une vitesse qui est fonction de l'intensité du champ électrique appliquée, de la charge de l'espèce et de sa taille. Ainsi, les espèces migrent plus rapidement lorsqu'elles sont de petites tailles et de densité de charge élevée. La vitesse de migration d'une espèce chargée, appelée la vitesse électrophorétique, se définit selon la relation suivante :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \mu_{ep} \frac{V}{L}$$

où v_{ep} la vitesse électrophorétique (cm.s^{-1}) ; μ_{ep} la mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$) ; E le champ électrique (V.cm^{-1}) ; L la longueur du capillaire et V la différence de potentiel appliquée à ses extrémités.

La vitesse électrophorétique, et donc la mobilité électrophorétique, dépend de la longueur du capillaire de séparation (20 à 100 cm), de son diamètre interne (20 à 100 μm), de la différence de potentiel appliquée (10 à 40 kV), du pH, de la composition du BGE (force ionique, viscosité, ajout d'un agent complexant ou d'un

solvant organique) et de la température. La maîtrise de ces différents paramètres est cruciale quant à l'optimisation d'une séparation en CZE.

2.3. L'électroosmose

L'électroosmose se définit comme étant l'écoulement d'un liquide à l'intérieur d'un capillaire dont la paroi interne possède une charge de surface lorsqu'elle est soumise à un champ électrique. La paroi interne du capillaire en silice vierge est recouverte de groupement silanols qui s'ionisent dès que le pH du BGE est supérieur à 2 afin de former une paroi intérieure chargée négativement. Afin de respecter les conditions d'électroneutralité, les cations présents dans le BGE sont donc attirés par les charges négatives de la paroi du capillaire formant ainsi une première couche fixe appelée couche de Stern. Il en résulte d'une modification de la concentration ionique de la solution formant ainsi une deuxième couche plus diffuse, appelée couche de Gouy-Chapmann, constituée majoritairement de l'excédentaire de charges positives opposées à la charge de la paroi du capillaire (fig.2).

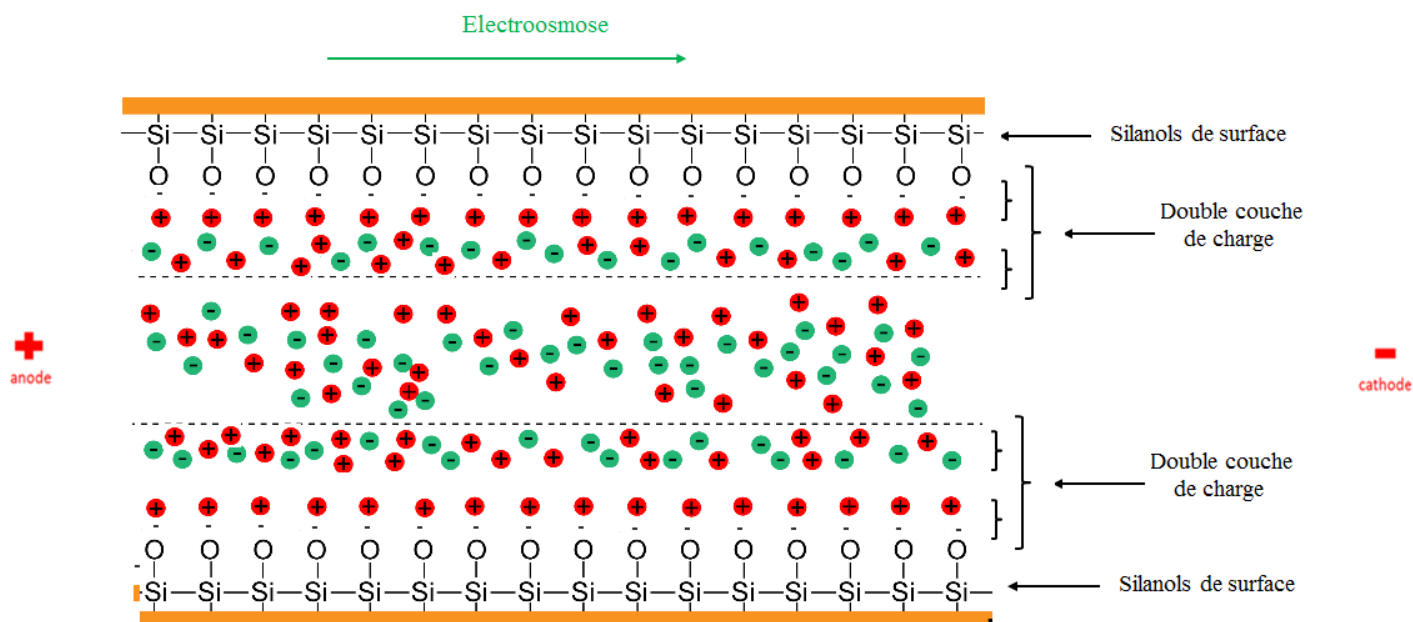


Figure 2 : Représentation schématique de la double couche dans le capillaire à l'origine de l'électroosmose

Cette double couche de charge est caractérisée par un potentiel de surface ou potentiel zeta se définissant de la manière suivante :

$$\zeta = \frac{\delta \sigma}{\epsilon}$$

Avec ζ le potentiel zeta, δ l'épaisseur de la double couche, σ la densité de charges par unité de surface, ϵ la constante diélectrique de l'électrolyte support (BGE).

Dans le cas des capillaires en silice vierge, lorsqu'on applique un champ électrique, la première couche constituée d'interactions fortes reste fixe tandis que la seconde couche migre vers la cathode entraînant par friction avec elle les molécules du solvant. Ce phénomène crée un écoulement de toutes les espèces présentes dans le capillaire appelé écoulement électroosmotique (ou flux électroosmotique, EOF). La vitesse de cet écoulement est proportionnelle à l'intensité du champ électrique comme le définit l'équation de Helmholtz-Smoluchowski :

$$v_{eo} = \left(\frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \right) E$$

Avec v_{eo} la vitesse d'écoulement, ε la constante diélectrique de l'électrolyte support, ζ le potentiel zeta, η la viscosité du BGE, E l'intensité du champ électrique.

L'équation précédente a permis de définir la mobilité électroosmotique μ_{eo} d'après l'équation suivante :

$$\mu_{eo} = \left(\frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} \right)$$

Donc on en déduit que la vitesse d'écoulement est proportionnelle à la mobilité électroosmotique et à l'intensité du champ électrique E :

$$v_{eo} = \mu_{eo} E$$

La mobilité électroosmotique dépend de certains paramètres tels que la nature de la charge surfacique du capillaire de séparation²⁰, du pH²¹ et de la composition du BGE^{22,23} (force ionique, viscosité et l'ajout de tensioactifs ou solvant organique). Ainsi, une espèce qui migre au sein du capillaire a donc une mobilité apparente μ_{app} , reliée à un temps de migration t_{app} que l'on peut mesurer, et qui résulte de la somme algébrique de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électroosmotique :

$$\mu_{app} = \frac{l_d L_t}{t_{app} V} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$$

où l_d est la longueur à la détection et L_t est la longueur totale du capillaire.

La mobilité apparente d'une espèce est donc directement déductible à partir de l'électrophérogramme tandis que la mobilité électrophorétique et la mobilité électroosmotique sont déduites de manière indirecte. L'EOF est accessible via l'ajout d'un analyte neutre, appelé marqueur de flux, lors de la séparation. Celui-ci ne subissant que l'influence de l'EOF, son temps de migration correspond donc au temps nécessaire à l'EOF pour parcourir le volume du capillaire. La plupart de ces marqueurs de flux sont de petites molécules organiques capables

d'être aisément détecté en UV (formamide, méthanol, acétonitrile, acétone...). La détermination de la mobilité électroosmotique μ_{eo} permet d'en déduire la mobilité électrophorétique μ_{ep} propre à chaque analyte en fonction de leur mobilité apparente μ_{app} .

2.4. Les grandeurs caractéristiques

2.4.1. L'efficacité

L'électrophorèse capillaire permet d'obtenir de grandes efficacités de séparation grâce à l'absence de phase stationnaire et du profil plat du flux électroosmotique. En effet l'absence de phase stationnaire permet de s'affranchir des mécanismes de dispersion des bandes tels que la diffusion turbulente (A) et la résistance au transfert de masse (C) définit selon l'équation de Van Deemter, équation permettant de relier les différentes causes d'élargissement de pics en chromatographie à la vitesse de la phase mobile u et à la hauteur équivalente à un plateau théorique :

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Avec H la hauteur de plateau théorique, A la diffusion turbulente, B la diffusion moléculaire, C la résistance au transfert de masse, u la vitesse de la phase mobile.

Le terme H est inversement lié à l'efficacité d'une colonne. En effet plus la hauteur de plateau théorique H est faible, et plus la colonne est efficace. En CZE ce terme H dépend uniquement de la diffusion moléculaire. L'écoulement laminaire du flux électroosmotique²⁴ permet de minimiser cette diffusion moléculaire entraînant par la même occasion une diminution de la valeur de H.

Le phénomène d'élargissement d'un pic électrophorétique par diffusion axiale est donc la principale source de diffusion en électrophorèse capillaire. Celui-ci est défini par l'équation d'Einstein :

$$\sigma^2 = 2D_m t_m$$

Avec σ la diffusion axiale (m), D_m le coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) et t_m le temps de migration (s)

On en déduit l'équation du nombre de plateaux théoriques (N) :

$$N = \left(\frac{L_d}{\sigma} \right)^2 = \frac{(\mu_{eo} + \mu_{ep})}{2D_m} \cdot \frac{L_d}{L_T} \cdot V$$

Avec L_T la longueur totale du capillaire (cm), L_d la longueur de capillaire jusqu'à fenêtre de détection

Au vue de cette équation on peut dire que l'efficacité d'une séparation augmente lorsque la tension appliquée est élevée. Toutefois des tensions importantes entraînent de l'échauffement par effet Joule, ce qui peut influencer la séparation voire même dégrader les analytes.

2.4.2. La résolution

En électrophorèse capillaire, la résolution entre deux pics se définit selon l'équation suivante :

$$R_{1-2} = \frac{1}{4} \cdot \frac{\mu_{ep,2} - \mu_{ep,1}}{\mu_{eo} + \mu_{ep}} \cdot \sqrt{N}$$

On constate qu'il est possible d'augmenter la résolution entre deux espèces en augmentant leurs mobilités électrophorétiques et en augmentant le nombre de plateaux théoriques. Cela revient donc à augmenter la tension ou à modifier la nature du BGE. A contrario, cette équation illustre clairement le fait qu'un flux électroosmotique trop important peut avoir pour effet de diminuer la résolution entre deux espèces.

2.4.3. L'optimisation d'une séparation en CE

Le développement d'une séparation en électrophorèse capillaire revient le plus souvent à trouver l'électrolyte support adapté à la problématique. Toutefois différents paramètres sont à prendre en compte lorsqu'il s'agit d'optimiser une séparation. Ces paramètres influent directement sur la mobilité électroosmotique et électrophorétique des espèces à séparer.

- * Le pH du BGE est l'un des paramètres le plus important car il conditionne l'état d'ionisation.
- * La force ionique influe sur la mobilité apparente de chaque espèce. En effet l'augmentation de la force ionique permet d'augmenter la résolution des analytes. Toutefois cela entraine des temps d'analyses plus long, de courant élevés (effet joule) et une possible perte de sensibilité en fonction du détecteur utilisé.
- * L'ajout d'additifs ou solvant organique peut permettre d'améliorer l'efficacité et la résolution des pics.
- * La tension appliquée et la température influent sur le temps d'analyse et à moindre mesure sur la résolution. Cependant l'importance de ces deux paramètres résulte du fait qu'ils sont liés à l'échauffement par effet joule qui peut, en modifiant les effets de diffusion, influencer de manière significative sur la séparation.
- * La longueur et le diamètre interne du capillaire joue un rôle majeur dans l'efficacité, la résolution, le temps d'analyse et les émissions de chaleur par effet joule. En effet une séparation sera plus efficace et résolue lorsqu'on utilise un capillaire de faible diamètre interne.
- * La nature de la charge surfacique du capillaire (positive, négative ou neutre) détermine la direction du flux électroosmotique. En règle générale, le flux électroosmotique circule toujours vers l'électrode dont le signe est le même que celui des charges présentes sur les parois du capillaire. Par exemple dans le cas du capillaire en silice vierge, la paroi étant chargée négativement par la présence de groupement silanols, le flux électroosmotique circule en direction de la cathode. Toutefois il est préférable dans certaines conditions de

contrôler, d'inverser ou même de supprimer l'EOF, en modifiant la nature de la charge surfacique du capillaire, afin d'éviter tous phénomènes d'adsorption d'analytes sur la paroi du capillaire et de mieux séparer les analytes^{23,25-27}.

Au-delà des problématiques d'effet joule et de la possible adsorption des analytes sur la paroi du capillaire, l'une des problématiques majeures de la CZE résulte de la séparation des composés neutres. En effet, ce mode de séparation électrophorétique ne fonctionne qu'avec des espèces chargées. De ce fait, d'autres modes de séparation ont été développés afin de répondre à cette problématique comme nous le verrons par la suite.

3. La chromatographie électrocinétique micellaire

L'introduction de la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) par Terabe et *al.* en 1984²⁸ a représenté un grand développement de l'électrophorèse capillaire. En effet la MEKC est une technique électrophorétique qui permet la séparation des espèces chargées mais également des composés neutres sur la même injection. Ceci est possible grâce à l'utilisation d'un BGE contenant un tensioactif ionique dont la concentration est supérieure à sa concentration micellaire critique (cmc) afin de former des micelles. En effet les molécules d'un tensioactif possèdent une partie polaire hydrophile et une partie hydrophobe. En milieux aqueux et à une concentration supérieure à sa CMC, on observe la formation d'agrégats de ces molécules appelées micelles. Les parties hydrophobes forment le cœur des micelles tandis que les parties hydrophiles sont en contact avec le milieu aqueux (BGE).

Parmi les tensioactifs utilisés en MEKC^{29,30}, le sodium dodecyl sulfate (SDS), un tensioactif anionique, est le plus couramment mis en œuvre. Lors de la séparation, les micelles SDS anioniques sont électrostatiquement attirées vers l'anode tandis que la mobilité électroosmotique transporte le BGE vers la cathode. Les micelles représentent donc une phase « pseudo-stationnaire » permettant la séparation de composés neutres par différence d'hydrophobicité. L'EOF étant plus fort que la mobilité électrophorétique des micelles, les analytes neutres se distribuent à l'intérieur du cœur des micelles et migrent conjointement vers la cathode. Plus l'espèce sera hydrophobe et plus il aura d'affinité avec le cœur des micelles (fig. 3). La vitesse de migration d'un soluté neutre dépend donc de son coefficient de partage entre le cœur hydrophobe des micelles (phase dite pseudo-stationnaire) et la phase aqueuse ionique³¹. Ainsi l'ordre d'élution des espèces est donné par ordre d'hydrophobicité croissante³⁰.

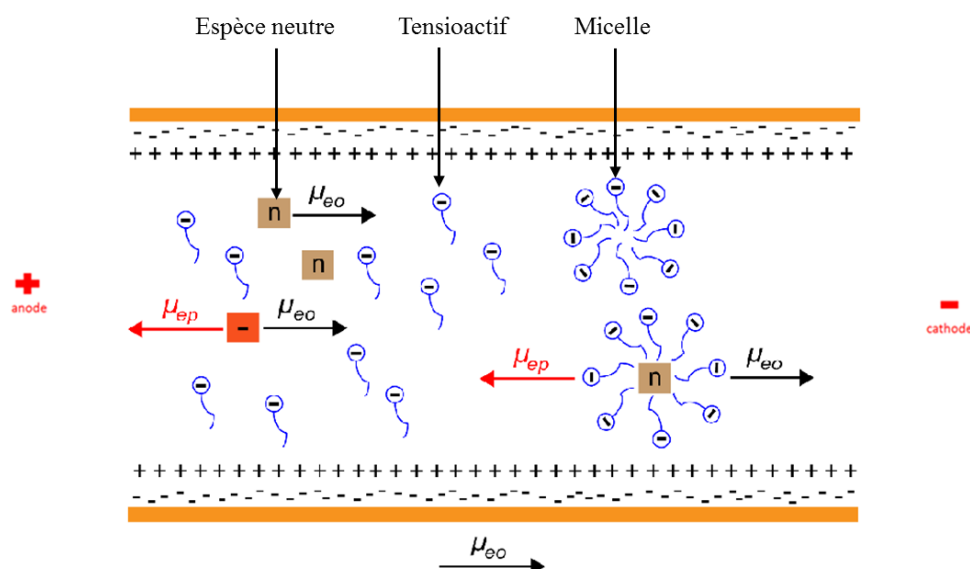


Figure 3 : Représentation schématique du principe de séparation par chromatographie électrocinétique micellaire utilisant un tensioactif anionique et un capillaire en silice vierge.

D'une manière générale, la sélectivité des analytes en MEKC est totalement différente de la CZE. Dans le cas des micelles anioniques, les analytes positifs sont soumis, en plus des mécanismes de la CZE, à des interactions électrostatiques avec les micelles. Ils sortent en premier après l'EOF. Les molécules neutres sont séparées exclusivement en fonction de leur hydrophobicité. Enfin les molécules anioniques sortent en dernier du fait des mécanismes de la CZE et de la répulsion électrostatique avec les micelles. A noter qu'il est possible de modifier ou supprimer le flux électroosmotique par l'utilisation de tensioactif cationique, zwitterionique ou non-ionique en fonction de l'application²⁹.

4. L'électrochromatographie capillaire

L'électrochromatographie capillaire (CEC) est une technique séparative hybride qui combine le principe de l'électrophorèse capillaire, avec la séparation des molécules sous un champ électrique et de celui de l'HPLC, avec l'interaction des molécules avec une phase stationnaire. Cette combinaison permet d'obtenir à la fois les hautes efficacités de la CE et la grande capacité de chargement de l'HPLC sur la même technique³². En CEC, le capillaire est rempli de particules de phase stationnaire généralement constituées de silices greffées et la phase mobile est constituée d'un mélange de BGE-solvant organique capable de conduire le courant. Lorsqu'on applique un champ électrique, le flux électroosmotique permet la mobilité de la phase mobile à travers la colonne. Et la séparation des analytes est basée sur leur mobilité électrophorétique et leur coefficient de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire.

La CEC se présente alors comme une électrophorèse capillaire utilisant un capillaire rempli de phase stationnaire. Elle permet, comme la MEKC, particulièrement la séparation des molécules neutres. Bien que

cette technique présente beaucoup d'avantages tels qu'une grande sélectivité, efficacité et capacité d'injection, elle possède un certain nombre de contraintes tels que la fabrication et la fragilité des colonnes, la difficulté de contrôler le débit de la phase mobile, des temps d'analyse assez long.

5. L'électrophorèse capillaire en gel

L'électrophorèse capillaire en gel (GCE) est une technique basée sur la séparation de biomolécules par exclusion stérique. Elle est principalement utilisée pour la séparation de biomolécules telles que l'ADN^{33,34}, l'ARN^{35,36}, d'oligonucléotide^{37,38} de peptides³⁹ ou protéines dénaturés^{40,41} qui ont une charge spécifique similaire ou identique difficilement séparable en CZE. En GCE, le capillaire est rempli d'un gel de polymère permettant la séparation des analytes selon un principe basé sur le tamisage moléculaire. En effet lorsqu'on applique un champ électrique, les molécules de taille importante sont ralenties par le gel tandis que les molécules de taille plus faible passent à travers les pores du gel (fig.4).

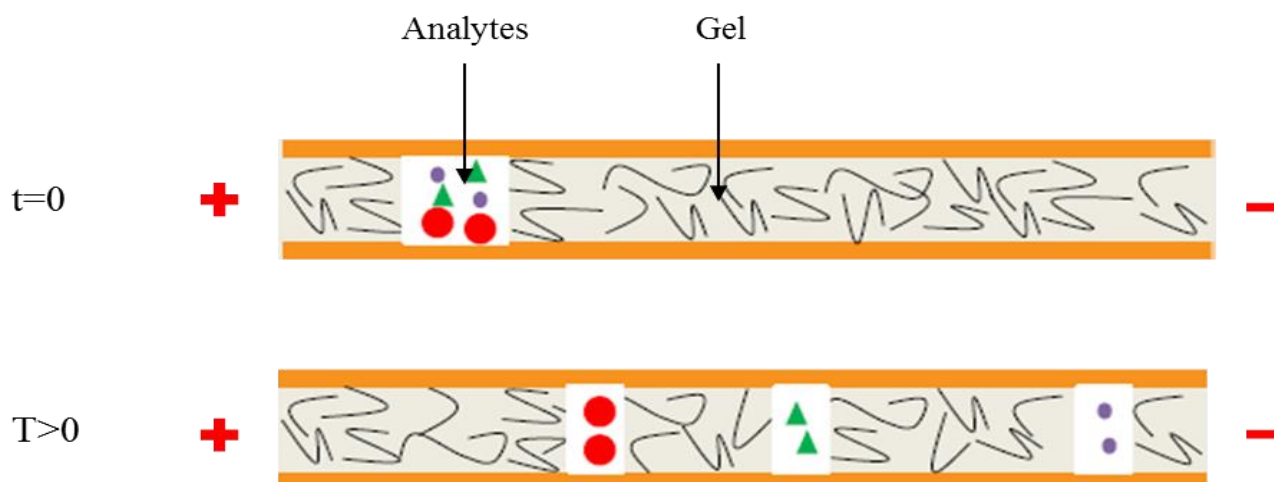


Figure 4 : Représentation schématique du principe de séparation par électrophorèse capillaire en gel

Les gels utilisés en GCE peuvent être, suivant l'application, réticulés de manière covalente comme le bis-polyacrylamide, des solutions de polymères linéaires tels que le polyacrylamide ou la méthylcellulose, ou par liaison hydrogène comme l'agarose. L'utilisation de gel permet de diminuer la diffusion des solutés et d'éviter les phénomènes d'adsorption des solutés sur les parois du capillaire.

6. L'isotachophorèse

L'isotachophorèse (ITP) est un mode de séparation électrophorétique basé sur le même principe que la CZE avec la séparation des espèces chargées en fonction de leurs différences de mobilité apparente lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. Toutefois en ITP, le flux électroosmotique est nul et le BGE est composé d'un mélange hétérogène d'électrolytes. Le capillaire est rempli d'un électrolyte « meneur » qui a une mobilité

électrophorétique plus forte que les analytes. Ensuite l'échantillon est injecté puis l'extrémité du capillaire contenant l'échantillon est placée dans un électrolyte « terminal » qui a une mobilité électrophorétique plus faible que les analytes. L'échantillon est donc pris en sandwich dans une zone entre les deux électrolytes.

Sous l'effet d'un champ électrique, les ions de l'échantillon se séparent selon leur mobilité électrophorétique tout en restant sur la zone entre les deux électrolytes. L'analyte avec la mobilité électrophorétique la plus grande se retrouvera près du « meneur » tandis que celui dont la mobilité électrophorétique est plus faible sera proche du « terminal ». Une fois les analytes ordonnés dans la zone échantillon, le système atteint un état stationnaire dans lequel tous les bandes présents dans le capillaire migrent à la même vitesse et sont focalisés. De ce fait le signal correspondant à chaque analyte ne forme pas des pics mais plutôt des plateaux successifs à la détection.

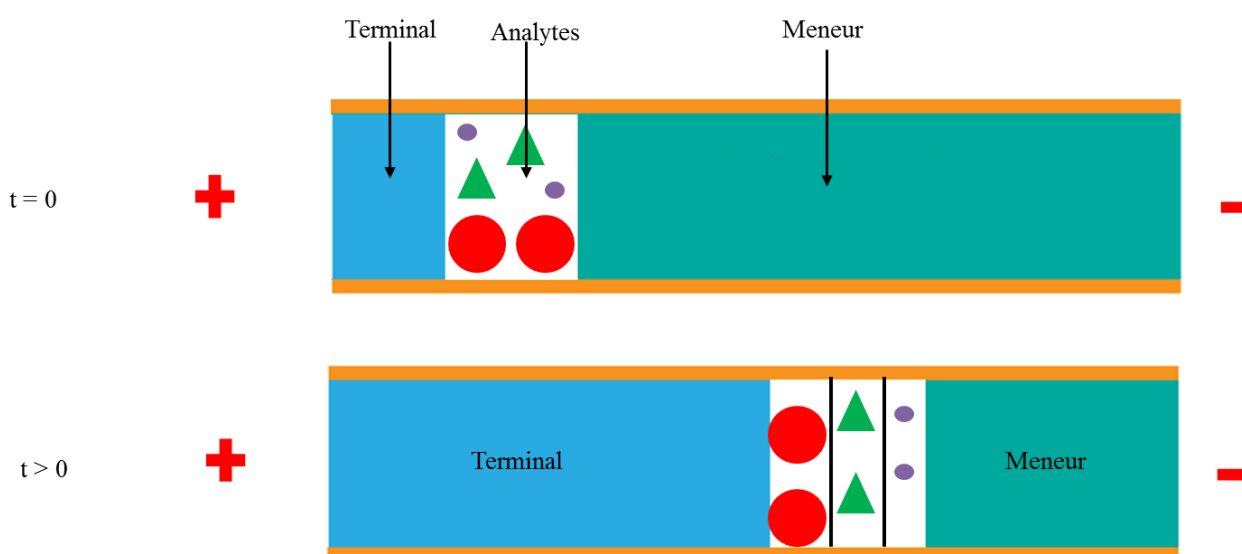


Figure 5 : Représentation schématique du principe de séparation par isotachophorèse

L'ITP présente l'avantage d'être bien adapté à l'analyse d'analytes dilués qui sont focalisés au cours de la séparation. Cependant on peut séparer uniquement soit des cations ou des anions sur la même expérience. Cette technique suscite de l'intérêt dans différents domaines tels que la biopharmacie⁴² ou l'agroalimentaire⁴³ notamment pour la séparation de petites molécules⁴⁴, d'acides nucléiques⁴⁵, de peptides⁴⁶ ou ADN⁴⁷ dans des systèmes micro-fluidiques⁴⁸.

Une variante d'ITP, l'isotachophorèse transitoire (t-ITP) est couramment utilisée en CZE en tant que méthode de pré-concentration d'échantillon. Dans cette variante, le meneur est mélangé, en amont, à l'échantillon puis injecté en CZE dans un BGE qui a une mobilité électrophorétique plus faible que la mobilité du meneur. Sous l'effet d'un champ électrique, le meneur migre plus rapidement que le BGE entraînant de ce fait une focalisation des analytes dans un volume de capillaire de plus en plus faible. Ce procédé permet d'augmenter de manière significative la quantité d'échantillon injecté tout en gardant l'efficacité de séparation

du CZE. La t-ITP a montré un intérêt particulier dans le cadre de couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse (CE-MS)^{49,50}.

7. La focalisation isoélectrique capillaire

La focalisation isoélectrique capillaire (cIEF) est un mode de séparation électrophorétique permettant de séparer des molécules grâce à leur charge et surtout grâce à leur point isoélectrique (pI). Elle est, par conséquent, particulièrement pour la séparation des composés amphotères, c'est à dire des molécules qui se comportent à la fois comme un acide ou une base telles que des protéines ou des peptides.

En cIEF, le capillaire est rempli d'un mélange de solution d'ampholytes, d'électrolyte et de l'échantillon. Le vial à l'anode est constitué d'une solution acide tandis que celui à la cathode contient une solution basique. Lorsqu'on applique un champ électrique. Les ampholytes et les analytes migrent alors dans le capillaire jusqu'à atteindre la zone où leurs charges est nulles, c'est à dire la zone correspondant à leur pI. Il se crée donc un gradient de pH à l'intérieur du capillaire dont la gamme dépend du type d'ampholyte utilisé. A noter que la séparation par cIEF est réalisé dans la plupart des cas avec un capillaire greffé ou en présence de gels afin d'éviter les phénomènes de diffusion et d'adsorption des biomolécules. La séparation comporte deux étapes successives ou simultanées : la focalisation et la mobilisation (fig.6).

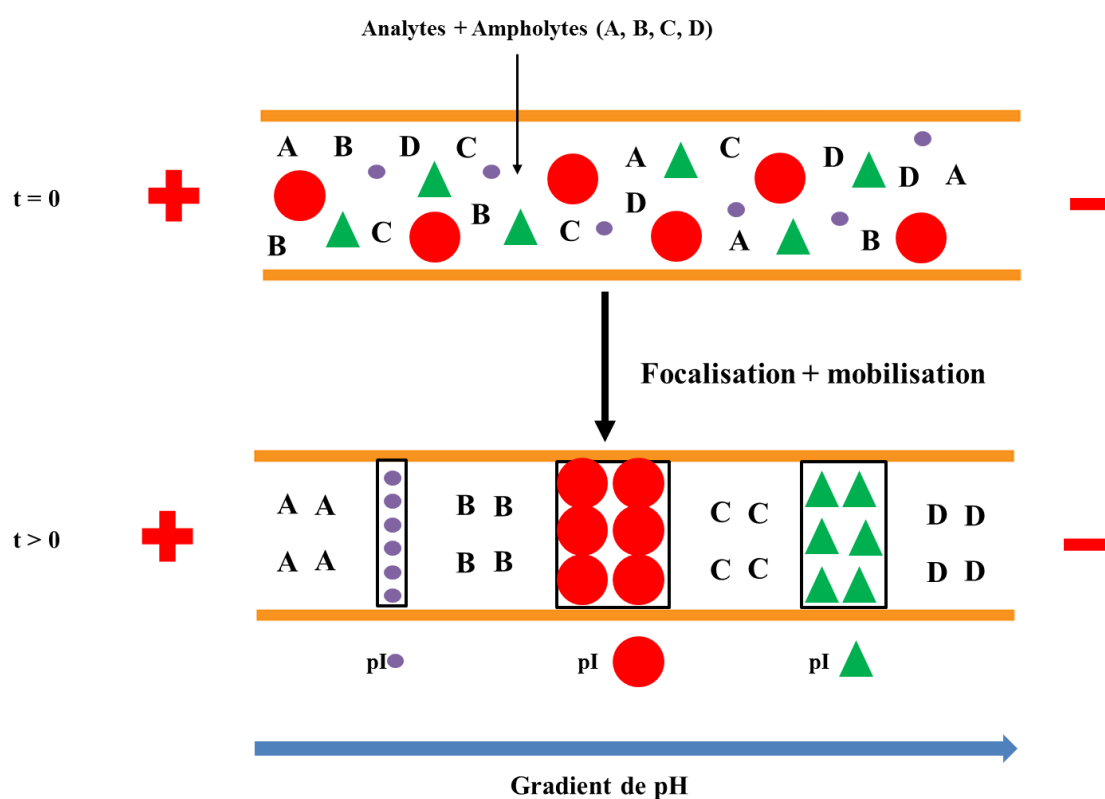


Figure 6 : Représentation schématique du principe de séparation par focalisation isoélectrique

La focalisation est le phénomène qui va permettre aux analytes de se séparer et s'immobiliser dans la zone de pH correspondant à leur pI. Ensuite la mobilisation des zones est réalisée soit par mobilisation hydrodynamique qui consiste à appliquer une pression ou par gravité, ou par méthode chimique afin de déplacer les analytes vers la détection.

La cIEF est un mode de séparation très résolutif. En effet il est possible de séparer deux protéines ayant une différence de pI de 0,05. Cette haute résolution est obtenue grâce à l'utilisation de champ électrique élevé, une pente de mobilité élevée au pI et une faible vitesse de changement de pH. De plus, vu que l'échantillon est chargé dans le capillaire en même temps que la solution amphotère, il est possible de charger des volumes beaucoup plus importants que dans la plupart des autres modes de séparation électrophorétique. Cependant la limitation de la focalisation vient du fait qu'à leur pI, les protéines ont tendances à précipiter entraînant de ce fait le bouchage du capillaire. Il faut donc optimiser les conditions expérimentales, par exemple, en ajoutant des solubilisant ou en limitant le temps de focalisation afin d'éviter ce phénomène.

La cIEF est utilisée pour mesurer le pI des protéines, pour la séparation d'isoformes et d'autres protéines difficilement séparable avec les autres modes de séparation électrophorétique tels que les immunoglobulines et hémoglobines et l'analyse de solutions biologiques diluées⁵¹.

Références bibliographiques :

- (1) Hjerten, S. *Chromatographic reviews* **1967**, 9, 122-219.
- (2) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Clinical chemistry* **1981**, 27, 1551-1553.
- (3) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Analytical Chemistry* **1981**, 53, 1298-1302.
- (4) Timerbaev, A. R. *Talanta* **2000**, 52, 573-606.
- (5) Timerbaev, A. R. *Chemical reviews* **2013**, 113, 778-812.
- (6) Bowman, J., et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2000**, 23, 663-669.
- (7) Altria, K. D.; Simpson, C. F. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **1988**, 6, 801-807.
- (8) Ali, I., et al. *Journal of capillary electrophoresis and microchip technology* **2006**, 9, 85-99.
- (9) Bermudo, E., et al. *Journal of chromatography. A* **2006**, 1120, 199-204.
- (10) Simo, C., et al. *Electrophoresis* **2005**, 26, 1306-1318.
- (11) Garcia-Canas, V., et al. *Electrophoresis* **2014**, 35, 147-169.
- (12) El Rassi, Z. *Electrophoresis* **1997**, 18, 2465-2481.
- (13) Rodriguez Robledo, V.; Smyth, W. F. *Electrophoresis* **2009**, 30, 1647-1660.
- (14) Wen, Y., et al. *Electrophoresis* **2012**, 33, 2933-2952.
- (15) McEvoy, E., et al. *Electrophoresis* **2007**, 28, 193-207.
- (16) Foret, F. *Electrophoresis* **2009**, 30 Suppl 1, S34-39.
- (17) Amin, N. C., et al. *Journal of chromatography. A* **2012**, 1264, 1-12.
- (18) Dolnik, V. *Electrophoresis* **2008**, 29, 143-156.
- (19) Giovannoli, C., et al. *Journal of separation science* **2004**, 27, 1551-1556.
- (20) Hsieh, Y. Y., et al. *Journal of chromatography. A* **2002**, 952, 255-266.
- (21) Hayes, M. A., et al. *Anal Chem* **1993**, 65, 27-31.
- (22) Demana, T., et al. *Anal Chem* **1992**, 64, 390-394.
- (23) Kaniansky, D., et al. *Journal of chromatography. A* **1997**, 792, 483-494.
- (24) Devasenathipathy, S.; Santiago, J. In *Microscale Diagnostic Techniques*; Springer, 2005, pp 113-154.
- (25) Spanila, M., et al. *Journal of separation science* **2006**, 29, 2234-2240.
- (26) Yeung, K. K.; Lucy, C. A. *Anal Chem* **1997**, 69, 3435-3441.
- (27) Smith, J. T.; el Rassi, Z. *Electrophoresis* **1993**, 14, 396-406.
- (28) Terabe, S., et al. *Analytical Chemistry* **1984**, 56, 111-113.
- (29) Muijselaar, P. G., et al. *Journal of Chromatography A* **1997**, 780, 41-61.
- (30) Terabe, S. *Annual review of analytical chemistry* **2009**, 2, 99-120.
- (31) Hancu, G., et al. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **2013**, 3, 1-8.
- (32) Rathore, A. S. *Electrophoresis* **2002**, 23, 3827-3846.
- (33) Swerdlow, H.; Gesteland, R. *Nucleic acids research* **1990**, 18, 1415-1419.
- (34) Holovics, H. J., et al. *Electrophoresis* **2010**, 31, 2436-2441.
- (35) Sobczak, K.; Krzyzosiak, W. J. *Nucleic acids research* **2002**, 30, e124-e124.
- (36) Skeidsvoll, J.; Ueland, P. M. *Electrophoresis* **1996**, 17, 1512-1517.
- (37) Paulus, A.; Ohms, J. I. *Journal of chromatography* **1990**, 507, 113-123.
- (38) Andrus, A. *Methods in molecular biology* **1994**, 26, 277-300.
- (39) Cohen, A. S.; Karger, B. L. *Journal of Chromatography A* **1987**, 397, 409-417.
- (40) Guttman, A. *Electrophoresis* **1996**, 17, 1333-1341.
- (41) Wu, D.; Regnier, F. E. *Journal of Chromatography A* **1992**, 608, 349-356.
- (42) Fanali, S., et al. *Journal of chromatography* **1985**, 330, 436-438.
- (43) Blatny, P.; Kvasnicka, F. *Journal of chromatography. A* **1999**, 834, 419-431.
- (44) Karovicova, J., et al. *Journal of chromatography* **1990**, 509, 283-286.
- (45) Garcia-Schwarz, G.; Santiago, J. G. *Angewandte Chemie* **2013**, 125, 11748-11751.
- (46) Kasicka, V.; Prusik, Z. *Journal of chromatography* **1991**, 569, 123-174.
- (47) Shintaku, H., et al. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 1953-1957.
- (48) Malá, Z., et al. *Electrophoresis* **2015**, 36, 2-14.
- (49) Busnel, J. M., et al. *Anal Chem* **2010**, 82, 9476-9483.

(50) Gahoual, R., et al. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 9074-9081.

(51) David, N. H. *Agilent Technologies* **2000**.

Chapitre 2 : La spectrométrie de masse au service des complexes biologiques

1. Introduction

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique qui permet la détection, l'identification et la quantification d'une ou plusieurs molécules ionisées, à l'état gazeux, par la mesure de leur rapport masse/charge (m/z). Depuis le développement de la MS par J. J. Thomson et F.W. Aston⁵², un développement instrumental important a été réalisé sur cette technique offrant actuellement des MS de plus en plus performantes. En effet les MS actuels permettent d'obtenir de grande sensibilité (de l'ordre de 10^{-12} moles), de très haute résolution et précision de masse (inférieur à 1 ppm), et éventuellement la possibilité d'obtenir des informations structurales des molécules d'intérêts.

L'analyse par spectrométrie de masse se compose de différentes parties qui permettent l'introduction de l'échantillon, la volatilisation, l'ionisation et la transmission des molécules de l'échantillon, la séparation des ions selon leurs masses et leurs charges, la détection et le traitement du signal (fig.7).

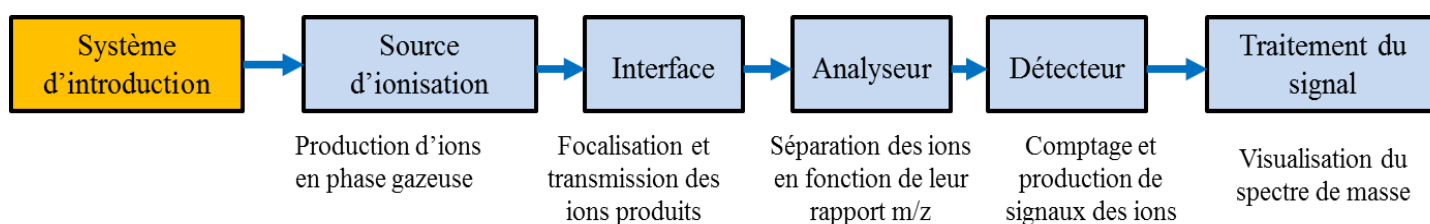


Figure 7 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse

Il existe actuellement une grande variété de spectromètres de masse qui diffèrent principalement selon leur source d'ionisation et le type d'analyseur qui les composent. Toutefois le choix instrumental dépend du type d'échantillon et de l'objectif de l'analyse. Par exemple dans le cas de l'analyse des complexes biologiques, l'utilisation d'une source d'ionisation « douce » de type MALDI⁵³ ou ESI⁵⁴ couplée à des analyseurs tels que l'analyseur en temps de vol (TOF), l'Orbitrap ou un analyseur hybride Q-TOF sera plus adapté pour des analyses de très haute résolution alors qu'il faudra plus privilégier le triple quadripôle pour les analyses quantitatives.

Les travaux de thèse présentés ici mettent en jeu deux types de couplages : le couplage de la CE avec une source d'ionisation MALDI et un analyseur TOF ; et le couplage de la CE avec une source d'ionisation ESI et

un analyseur hybride de type Q-TOF. De ce fait, dans cette revue bibliographique nous nous focaliserons exclusivement sur la description des sources d'ionisations MALDI et ESI, et des analyseurs TOF et Q-TOF.

2. Les sources d'ionisations

2.1. L'ionisation électrospray (ESI)

L'ionisation par électrospray (ESI) est une technique d'ionisation douce introduite par J. B Fenn *et al.* en 1989⁵⁴, prix Nobel de chimie en 2002, qui démontrent l'efficacité de la source ESI-MS pour l'analyse de biomolécules polaires et thermosensibles. En effet l'ESI permet d'obtenir des ions multichargés lors de l'ionisation sans générer de fragmentation des molécules ce qui permet l'analyse des complexes biologiques avec une grande précision de mesure. Le développement de l'ESI a ainsi permis d'élargir le champ d'application de la MS quant à l'analyse d'un grand nombre de molécules biologiques tels que les oligonucléotides et les protéines⁵⁵.

La source ESI permet de produire, à pression atmosphérique, des ions multichargés à partir d'un échantillon en solution. Elle consiste donc à une désolvatation progressive de l'analyte en solution. L'échantillon liquide est introduit dans la source ESI par l'intermédiaire d'un capillaire métallique. Sous l'effet d'un champ électrique intense ($\sim 10^6$ V/m) à l'extrémité du capillaire⁵⁶, les ions sont formés suivant trois étapes successives (fig. 8):

- La production de gouttelettes chargées.
- La fission des gouttelettes, appelée aussi explosion coulombienne, en gouttelette de tailles plus réduite.
- Emission des ions désolvatés en phase gazeuse.

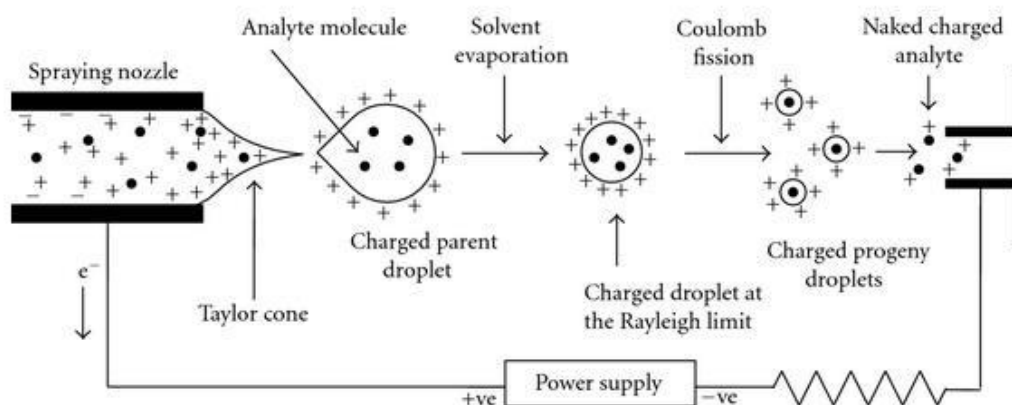


Figure 8 : Représentation schématique du principe de l'ionisation électrospray⁵⁵

2.1.1. La production de gouttelettes chargées

Le processus d'ionisation consiste à appliquer une différence de potentiel (de 3 à 6kV) entre l'extrémité du capillaire et une contre-électrode. En mode positif, le champ électrique induit la migration des ions positifs vers la contre-électrode entraînant, de ce fait, une accumulation de charges à l'extrémité du capillaire. Les charges accumulées à la surface du capillaire sont déstabilisées et sous l'influence du champ électrique, la surface du liquide s'étire et se déforme en un cône appelé cône de Taylor^{57,58}. Ce cône va s'étirer davantage jusqu'à se décomposer en petites gouttelettes hautement chargées en ions positifs.

2.1.2. La fission des gouttelettes

Les gouttelettes produites à partir du cône de Taylor sont progressivement désolvatées grâce à l'application d'un gaz de nébulisation, généralement de l'azote chauffé. Cela entraîne donc une diminution de la taille des gouttelettes et une augmentation de la densité de charge. Lorsque les forces de répulsions électrostatiques sont suffisamment fortes pour dépasser la tension de surface, c'est à dire que le rayon des gouttelettes soit inférieur à une valeur de rayon critique appelé rayon de Rayleigh⁵⁹, les gouttelettes sont alors instables et explosent en plusieurs petites gouttelettes filles. Ces gouttelettes filles vont subir à leur tour une succession d'explosion coulombienne sous l'effet de l'évaporation du solvant jusqu'à la formation des ions en phase gazeuse^{58,60}.

2.1.3. L'émission des ions en phase gazeuse

Les mécanismes qui conduisent à la formation d'ions en phase gazeuse font encore débat à l'heure actuelle^{61,62}. Toutefois deux théories sont proposées : le modèle de Dole et le modèle d'Iribarne-Thomson.

2.1.3.1. Le modèle de Dole

Ce modèle, connue sous le nom du « modèle du résidu chargé » (CRM)^{63,64}, a été le premier proposé pour expliquer ce phénomène. Dole propose un mécanisme basé sur une succession d'explosions coulombiennes qui conduisent à la formation d'une gouttelette fille contenant un seul ion multichargé. L'évaporation du solvant résiduel permet l'émission de l'ion en phase gazeuse (fig. 9a).

2.1.3.2. Le modèle d'Iribarne-Thomson

Ce modèle, appelé « mécanisme d'évaporation de l'ion » (IEM)⁶⁵, suggère que lorsque la densité de charge de la gouttelette est suffisamment importante, celle-ci émet les ions directement en phase gazeuse (fig. 9b).

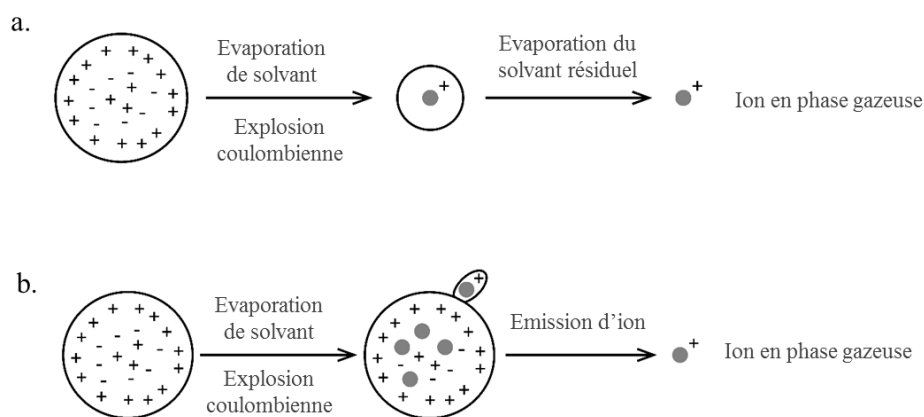


Figure 9 : Représentation schématique du modèle de Dole (a) et du modèle d'Iribarne-Thomson (b)

2.1.4. Vers une miniaturisation des sources électrospray

La source électrospray développée par l'équipe de J. B Fenn a permis d'élargir le champ d'application de la MS notamment quant à l'analyse de biomolécules polaires et thermosensibles⁵⁴. Toutefois elle atteint certaines limites notamment à cause d'un manque de sensibilité. En effet du fait de la géométrie du capillaire d'émission de spray, cette source génère de grandes gouttelettes chargées nécessitant une longue série d'explosions coulombiennes avant la formation d'ions en phase gazeuse, ce qui diminue l'efficacité d'ionisation⁶⁶. La source conventionnelle ESI a donc subi un grand développement permettant de répondre au besoin de sensibilité.

En 1994, M. R. Emmett et R. M. Caprioli⁶⁷ développent une source dite « micro-électrospray » permettant de produire un spray stable avec des débits compris entre 300 et 800 nL/min. Cela a été rendu possible grâce à une diminution du diamètre interne du capillaire passant de 100 μm à environ 50 μm . Ces travaux montrèrent que la mise en œuvre d'une source miniaturisée permet d'augmenter la sensibilité du signal MS dans le cadre d'une étude sur les protéines.

Wilm et Mann^{68,69} ont démontré que la réduction du débit du liquide entraîne une diminution de la taille des gouttelettes émis via le cône de Taylor. Ce fut la naissance de la source nano électrospray (nanoESI). Cette source se diffère des précédentes par l'utilisation d'un capillaire de diamètre interne de 1 à 2 μm capable de produire des débits inférieures à 25 nL/min. De plus cette source génère un tel taux d'ionisation qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser une assistance pneumatique. Ils ont pu démontrer que la réduction du débit du liquide permet d'augmenter de manière significative la sensibilité du signal MS, de réduire la consommation d'échantillon et de diminuer les effets de suppression d'ions dus aux sels présents dans l'échantillon.

2.2. L'ionisation par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

La source d'ionisation par Désorption-Ionisation Laser Assisté par Matrice (MALDI) a été introduite à la fin des années 80 simultanément par deux équipes : Karas et Hillenkamp^{53,70} qui ont démontré qu'une matrice absorbante à 266 nm (tryptophane) peut être utilisée pour volatiliser des petites molécules ainsi que l'équipe de Tanaka⁷¹ qui lui a obtenu le prix Nobel de chimie en 2002 pour avoir montré qu'avec la combinaison appropriée de longueur d'onde (337 nm) et de matrice (30 nm de particules de cobalt dans du glycérol), on pouvait facilement ioniser des protéines de hautes masses moléculaires.

La technique d'ionisation MALDI est une technique d'ionisation douce qui permet l'analyse de molécules thermolabiles de haut poids moléculaires (protéines, peptides) présentes dans un mélange complexe (pouvant contenir des sels, tensioactifs ou toutes autres impuretés à faible concentration). Son principe repose sur l'irradiation par impulsions laser d'un dépôt cristallin qui provient de la co-cristallisation des analytes et d'une matrice organique. Cette irradiation sous vide (10^{-7} bar) induit l'évaporation de la matrice et l'ionisation des analytes en phase gazeuse. Les ions moléculaires produits sont accélérés et analysés par un analyseur généralement à temps de vol (fig.10).

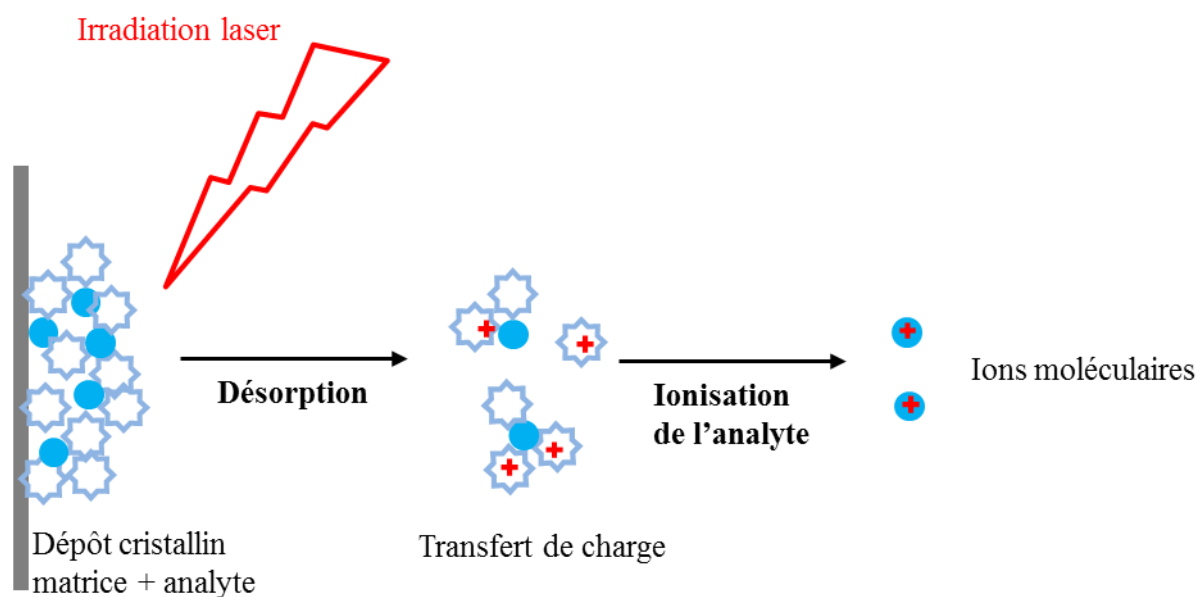


Figure 10 : Représentation schématique du principe d'ionisation MALDI

Les mécanismes d'ionisation par MALDI ne sont pas à l'heure actuelle totalement définis tant elles sont complexes. Les modèles actuels convergent vers une ionisation en deux étapes^{72,73} : L'ionisation primaire qui consiste à exciter et ioniser la matrice par absorption des photons du laser et l'ionisation secondaire qui

correspond au transfert de charge entre la matrice et l'analyte. Toutefois trois paramètres sont cruciaux quant à la précision de mesure de masse des analytes : le laser, le choix de la matrice et la technique de dépôt.

2.2.1. Le laser

Comme expliqué précédemment, l'importance de la longueur d'onde du laser a été démontrée dès le début du développement de la source MALDI⁷⁰. Différents lasers ont été développés par la suite afin d'obtenir les conditions optimales d'excitation^{74,75}. En effet les rendements d'ionisation et la fragmentation des molécules varient en fonction de la longueur d'onde et de la puissance du laser. Il convient donc de choisir avec soin le laser selon la matrice et les analytes. Actuellement le laser le plus utilisé est un laser à azote qui irradie dans le domaine de l'UV à 337 nm.

2.2.2. Le choix de la matrice

Le choix de la matrice est crucial pour le bon déroulement d'une analyse par MALDI. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie du laser pour permettre une bonne désorption-ionisation tout en protégeant les analytes des effets destructeurs du faisceau laser⁷⁶. Son choix se fait en fonction des analytes et suit obligatoirement ces trois critères :

- Co-cristalliser avec les analytes
- Absorber l'énergie du laser permettant ainsi de protéger les analytes
- Favoriser l'ionisation des analytes

Pour une analyse MALDI optimale, la matrice doit avoir une bonne solubilité avec le solvant de l'analyte afin de faciliter la co-cristallisation, la capacité d'absorber à la longueur d'ondes du laser utilisé et la capacité de transférer une ou plusieurs charges à l'analyte. De plus, la matrice doit favoriser la distribution homogène des analytes afin de réduire les interactions moléculaires et produire des ions moléculaires.

F. Hillenkamp *et al.*⁷⁶ ont recensé différentes matrices en fonction de l'application et de la longueur d'onde du laser. Trois matrices permettent de répondre à la plupart des analyses en protéomique, que ce soit pour l'analyse de peptides, de glycopeptides, de protéines ou de glycoprotéines. Le tableau 1 présente ces trois matrices ainsi que leurs applications.

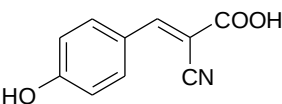
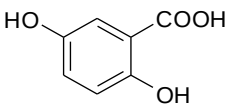
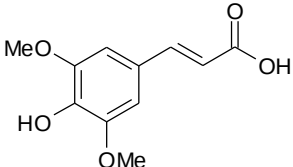
Nom de la matrice	Abréviation	Structure	Principales applications
acide α -cyano-4-hydroxynamique	α -CHCA		Peptides, petites protéines
acide 2,5 dihydrobenzoïque	DHB		Glycopeptides, glycoprotéines
acide sinapinique	SA		Protéines

Tableau 1 : Principales matrices utilisées en protéomiques

Le choix de la matrice dépend de la nature des analytes. Par exemple l'acide α -cyano-4-hydroxynamique sera plus adapté à l'analyse de protéines de faible poids moléculaire tandis que l'acide sinapinique sera couramment utilisé pour les protéines de haut poids moléculaires⁷⁵.

2.2.3. La technique de dépôt

La technique de dépôt utilisée est sans nul doute l'un des principaux facteurs qui influent sur la qualité des spectres MALDI. En effet la manière de mélanger les analytes et la matrice influe sur leur co-cristallisation et par conséquent sur la reproductibilité et la qualité du spectre MS^{77,78}. Plusieurs techniques de dépôt ont été décrites dans la littérature⁷⁹. L'utilisation d'une technique en particulier dépend de l'application et des analytes.

Durant ces travaux de thèse, nous avons privilégié deux méthodes de dépôts : le dépôt en « goutte séchée » et le dépôt en « couche mince ».

2.2.3.1. Le dépôt en goutte séchée

Cette méthode est la plus ancienne et la plus utilisée pour les préparations d'échantillons en MALDI. Elle consiste à mélanger la matrice et l'échantillon dans des proportions le plus souvent équivalentes soit préalablement dans un tube Eppendorf avant d'être déposée sur la cible ou directement sur la cible MALDI. Il se produit alors la co-cristallisation de la matrice et l'échantillon après évaporation du solvant à température ambiante, soit à l'air libre ou sous vide. Les cristaux produits par cette méthode sont grands et hétérogènes ce qui peut influencer sur la reproductibilité des spectres MS. Toutefois cette méthode a l'avantage d'être rapide et facile à mettre en œuvre.

2.2.3.2. Le dépôt couche mince

Cette méthode se fait en deux étapes : la première étape consiste à déposer une goutte de solution de matrice dissoute dans l'acétone sur la cible. Après évaporation du solvant, une couche mince de petits cristaux homogènes est formée. Ensuite l'échantillon est déposé sur cette couche mince qui après séchage reste au-dessus de la matrice. Les avantages de cette méthode résultent de l'homogénéité de la taille des cristaux formés ce qui permet d'améliorer de manière significative la résolution, la sensibilité et la reproductibilité des spectres MS. Cependant l'inconvénient majeur de cette méthode est le nombre très limité de tir laser pouvant être appliqué sur une position d'échantillon.

3. Les analyseurs

L'analyseur permet, d'une manière générale, la manipulation des ions produits dans la source afin de déterminer leur rapport masse/charge (m/z). Il existe une grande variété d'analyseurs tels que les analyseurs à secteur magnétique (B), les analyseurs quadripolaires (Q), les temps de vol (TOF), les analyseurs à piégeage d'ions (IT), et les analyseurs à résonance cyclotronique (ICR) qui diffèrent par leurs propriétés physiques à séparer les ions et à déterminer leur rapport m/z . Chaque analyseur possède des performances différentes définies par la résolution, la sensibilité, la précision de mesure de masse, la gamme de masse détectable ainsi que la vitesse d'acquisition. Le tableau 2 présente, d'une manière générale, les performances des principaux types d'analyseurs.

Type d'analyseur	Gamme de masse (m/z)	Résolution	Précision
Secteur magnétique (B)	10 000	100 000	< 1 ppm
Quadripôles (Q)	4 000	100 - 1 000	100 ppm
Temps de vol (TOF)	>100 000	1 000 - 40 000	5 - 50 ppm
Piège à ions (IT)	4 000	1 000 - 10 000	50 - 100 ppm
Orbitrap	6 000	10 000 - 150 000	2 - 5 ppm
Résonance cyclotronique (ICR)	> 10 000	10 000 - 1 000 000	1 - 5 ppm

Tableau 2 : Performances des principaux types d'analyseurs⁸⁰.

Pour la suite, nous décrirons uniquement les analyseurs utilisés durant ces travaux de thèse : l'analyseur quadripolaire et le temps de vol.

3.1. L'analyseur quadripolaire (Q)

L'analyseur quadripolaire, aussi appelé filtre de masse quadripolaire, est constitué de quatre barres métalliques parallèles de section cylindrique ou hyperbolique reliées entre elles deux à deux. Son principe de fonctionnement a été décrit par W. Paul et H. S. Steinwedel^{81,82}. Un potentiel continu U (DC) et un potentiel radiofréquence $V \cos \omega t$ (RF) est appliqué entre les barres de sorte que les barres adjacentes soient de potentiels électriques opposés (fig.11). Les potentiels électriques appliqués sont la somme algébrique des potentiels DC et RF de la forme $\Phi_0 = U - V \cos \omega t$ et $-\Phi_0 = -U + V \cos \omega t$. Un champ électrostatique est de ce fait créé entre les quatre barres.

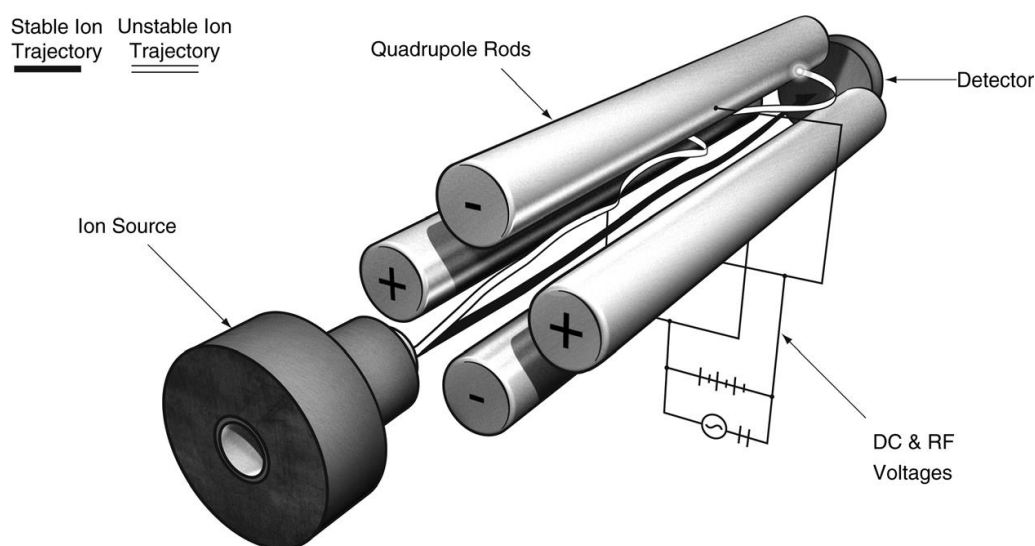


Figure 11 : Représentation schématique d'un analyseur quadripolaire⁸⁰

Les ions formés dans la source entrent dans le quadripôle à une vitesse donnée et subissent l'effet du champ électrostatique. La trajectoire d'un ion m/z est alors conditionnée par la combinaison des tensions RF et DC. L'ion possédant une trajectoire stable traverse les quatre barres métalliques jusqu'au détecteur et génère un courant électrique propre à l'ion. Tandis que les ions possédant des trajectoires instables sont neutralisés par collision sur les barres du quadripôle (fig. 11). La trajectoire des ions dans le quadripôle est décrite par les équations de Mathieu en 1866. Les solutions de ces équations permettent de représenter les zones de stabilité des ions en fonction des composantes U et V selon les axes x et y (fig. 12).

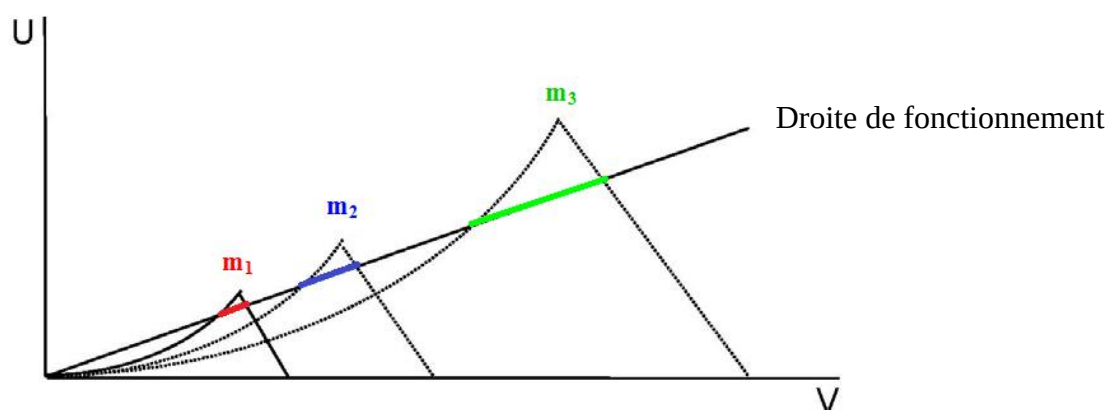


Figure 12 : Diagramme de stabilité d'ions m_1 , m_2 et m_3 différents

Chaque ion (m/z) possède sa propre zone de stabilité en fonction des valeurs de tension U et d'amplitude V représentée sous forme de triangle sur la figure 12. Le quadripôle est donc capable de transférer successivement tous les ions dont la zone de stabilité est coupée par la droite de fonctionnement par balayage de la tension U tout en maintenant le rapport U/V constant (mode Full scan) ou de transférer uniquement un seul m/z en maintenant les valeurs de U et V fixe (mode SIM, Single Ion Monitoring). Dans le cas où la tension U est nulle, tous les ions auront une trajectoire stable et traverseront donc simultanément le quadripôle. Le quadripôle joue alors le rôle de focalisateur d'ions (mode RF only).

La pente de la droite de fonctionnement conditionne la résolution du quadripôle. En effet une forte pente est, par exemple, synonyme d'une haute résolution toutefois au détriment de la sensibilité puisqu'elle coupera qu'une faible partie du diagramme de stabilité des ions.

3.2. L'analyseur à temps de vol (TOF)

L'analyseur à temps de vol (TOF) a été introduit par W. E Stephens en 1946^{83,84}. Toutefois ce n'est que depuis le développement de la technique d'ionisation MALDI dans les années 80 que cet analyseur a connue toute son importance. En effet cet analyseur nécessite un temps de démarrage bien défini et est donc idéalement couplable à une source d'ionisation pulsée⁸⁰. Son principe consiste à mesurer le temps que met un ion, préalablement accéléré dans un champ électrique, pour parcourir un tube de vol dans lequel règne un vide poussé ($\sim 10^{-7}$ mbar).

Un analyseur à temps de vol se compose de deux zones : une zone d'accélération dans laquelle les ions sont accélérés sous l'effet d'un champ électrique et le tube de vol, une zone libre de champs (fig. 13). Les ions sont accélérés grâce à l'application d'une différence de potentiel U leur conférant ainsi une énergie cinétique identique E_c qui s'exprime sous la forme :

$$E_c = \frac{mv^2}{2} = qU$$

Avec $q = Ze$, Z nombre de charges de l'ion, v vitesse de l'ion, m masse moléculaire de l'ion et e la charge de l'ion (1.602×10^{-19} C).

La vitesse v d'un ion s'exprime alors de la manière suivante :

$$v = \sqrt{\frac{2zU}{m}}$$

Le temps nécessaire à l'ion pour traverser un tube de vol de longueur L est de la forme :

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zU}} \quad \text{d'où} \quad \left(\frac{m}{z}\right) = 2U \left(\frac{t}{L}\right)^2$$

Le rapport m/z de chaque ion peut donc être déduit en fonction de son temps de vol. De plus les ions qui possèdent un rapport m/z faible arriveront plus rapidement au détecteur que ceux dont le rapport m/z est grand.

3.2.1 Le mode linéaire

L'analyseur TOF couplé à une source d'ionisation MALDI fonctionne principalement suivant deux modes : le mode linéaire et le mode réflectron. En mode linéaire les ions produits dans la source sont accélérés grâce à l'application de différents champs électrique décroissants dans la zone d'accélération. Ces ions traversent directement le tube de vol jusqu'au détecteur avec la même énergie cinétique (fig. 13).

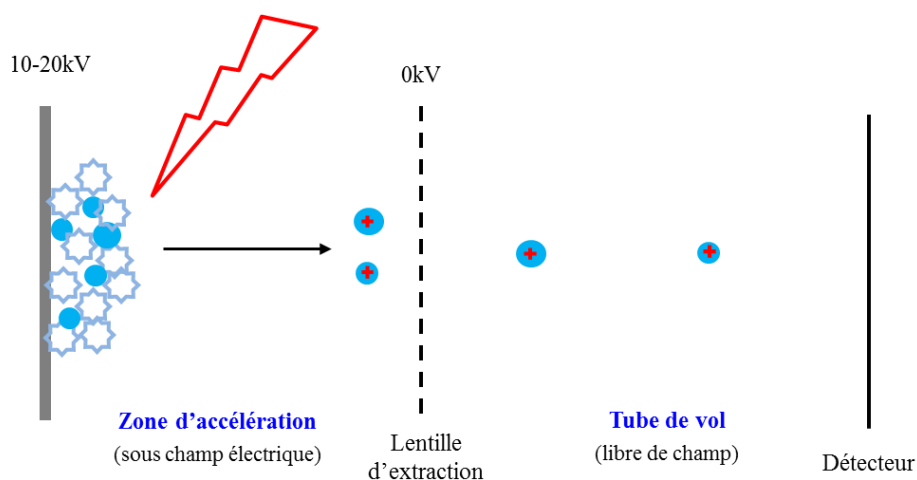


Figure 13 : Représentation schématique du principe du MALDI-TOF en mode linéaire

Le mode linéaire permet d'obtenir une bonne sensibilité au détriment de la résolution (de l'ordre de 1000). Cette faible résolution est due à l'hétérogénéité des dépôts cristallins. En effet les ions de même m/z ont une profondeur différente dans le dépôt ce qui se traduit par une distance plus ou moins grande jusqu'au détecteur⁸⁵. On parle alors de différence de « ligne de départ » des ions de même m/z générant, de ce fait, de faible résolution.

Afin de minimiser cette dispersion spatiale et ainsi augmenter la résolution, il est possible d'utiliser deux méthodes : l'extraction retardée (delay extracted) qui consiste à appliquer avec un temps de retard de quelques centaines de nanoseconde un deuxième potentiel légèrement supérieur à celui appliqué sur la cible afin de refocaliser les ions de même m/z sur une même « ligne de départ »⁸⁶ ou le mode réflectron.

3.2.2 Le mode réflectron

Le mode réflectron consiste à utiliser des miroirs électrostatiques sur lesquelles est appliqué un gradient de potentiel croissant⁸⁷. Les ions précédemment accélérés dans la source entrent plus ou moins profondément dans le réflectron pour être progressivement ralentis par le champ électrique qui y règne jusqu'à ce que leur énergie cinétique initiale soit nulle. Puis ils sont ré-accélérés en sens inverse de telle sorte qu'à la sortie du réflectron, ils aient la même vitesse jusqu'au détecteur. Les ions possédant une plus grande énergie cinétique pénètrent plus profondément dans le réflectron donc auront un trajet plus long que ceux possédant une énergie cinétique faible. De cette manière, les ions de même m/z arriveront en même temps au détecteur (fig.14).

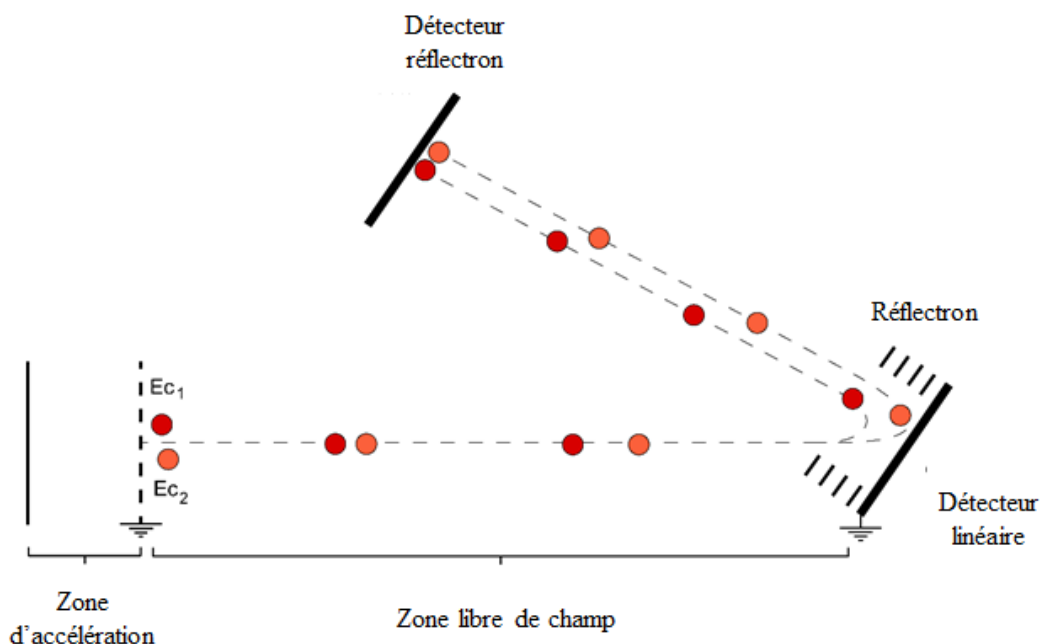


Figure 14 : Représentation schématique du principe du MALDI-TOF en mode réflectron. Les ions représentés possèdent le même m/z et des énergies cinétiques sensiblement différentes ($E_{c1} < E_{c2}$). Adapté des travaux de thèse d'E. Wagner⁸⁸.

Le mode réflectron permet d'obtenir de grande résolution par rapport au mode linéaire toutefois au détriment de la gamme de masse. D'une manière générale, on utilise le mode linéaire pour l'étude de molécules de haut poids moléculaire sur lesquelles on veut une bonne sensibilité et le mode réflectron pour l'étude à « haute résolution » de molécules de poids moléculaires moyennes.

Références bibliographiques :

- (1) Hjerten, S. *Chromatographic reviews* **1967**, 9, 122-219.
- (2) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Clinical chemistry* **1981**, 27, 1551-1553.
- (3) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Analytical Chemistry* **1981**, 53, 1298-1302.
- (4) Timerbaev, A. R. *Talanta* **2000**, 52, 573-606.
- (5) Timerbaev, A. R. *Chemical reviews* **2013**, 113, 778-812.
- (6) Bowman, J., et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2000**, 23, 663-669.
- (7) Altria, K. D.; Simpson, C. F. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **1988**, 6, 801-807.
- (8) Ali, I., et al. *Journal of capillary electrophoresis and microchip technology* **2006**, 9, 85-99.
- (9) Bermudo, E., et al. *Journal of chromatography. A* **2006**, 1120, 199-204.
- (10) Simo, C., et al. *Electrophoresis* **2005**, 26, 1306-1318.
- (11) Garcia-Canas, V., et al. *Electrophoresis* **2014**, 35, 147-169.
- (12) El Rassi, Z. *Electrophoresis* **1997**, 18, 2465-2481.
- (13) Rodriguez Robledo, V.; Smyth, W. F. *Electrophoresis* **2009**, 30, 1647-1660.
- (14) Wen, Y., et al. *Electrophoresis* **2012**, 33, 2933-2952.
- (15) McEvoy, E., et al. *Electrophoresis* **2007**, 28, 193-207.
- (16) Foret, F. *Electrophoresis* **2009**, 30 Suppl 1, S34-39.
- (17) Amin, N. C., et al. *Journal of chromatography. A* **2012**, 1264, 1-12.
- (18) Dolnik, V. *Electrophoresis* **2008**, 29, 143-156.
- (19) Giovannoli, C., et al. *Journal of separation science* **2004**, 27, 1551-1556.
- (20) Hsieh, Y. Y., et al. *Journal of chromatography. A* **2002**, 952, 255-266.
- (21) Hayes, M. A., et al. *Anal Chem* **1993**, 65, 27-31.
- (22) Demana, T., et al. *Anal Chem* **1992**, 64, 390-394.
- (23) Kaniansky, D., et al. *Journal of chromatography. A* **1997**, 792, 483-494.
- (24) Devasenathipathy, S.; Santiago, J. In *Microscale Diagnostic Techniques*; Springer, 2005, pp 113-154.
- (25) Spanila, M., et al. *Journal of separation science* **2006**, 29, 2234-2240.
- (26) Yeung, K. K.; Lucy, C. A. *Anal Chem* **1997**, 69, 3435-3441.
- (27) Smith, J. T.; el Rassi, Z. *Electrophoresis* **1993**, 14, 396-406.
- (28) Terabe, S., et al. *Analytical Chemistry* **1984**, 56, 111-113.
- (29) Muijselaar, P. G., et al. *Journal of Chromatography A* **1997**, 780, 41-61.
- (30) Terabe, S. *Annual review of analytical chemistry* **2009**, 2, 99-120.
- (31) Hancu, G., et al. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* **2013**, 3, 1-8.
- (32) Rathore, A. S. *Electrophoresis* **2002**, 23, 3827-3846.
- (33) Swerdlow, H.; Gesteland, R. *Nucleic acids research* **1990**, 18, 1415-1419.
- (34) Holovics, H. J., et al. *Electrophoresis* **2010**, 31, 2436-2441.
- (35) Sobczak, K.; Krzyzosiak, W. J. *Nucleic acids research* **2002**, 30, e124-e124.
- (36) Skeidsvoll, J.; Ueland, P. M. *Electrophoresis* **1996**, 17, 1512-1517.
- (37) Paulus, A.; Ohms, J. I. *Journal of chromatography* **1990**, 507, 113-123.
- (38) Andrus, A. *Methods in molecular biology* **1994**, 26, 277-300.
- (39) Cohen, A. S.; Karger, B. L. *Journal of Chromatography A* **1987**, 397, 409-417.
- (40) Guttman, A. *Electrophoresis* **1996**, 17, 1333-1341.
- (41) Wu, D.; Regnier, F. E. *Journal of Chromatography A* **1992**, 608, 349-356.
- (42) Fanali, S., et al. *Journal of chromatography* **1985**, 330, 436-438.
- (43) Blatny, P.; Kvasnicka, F. *Journal of chromatography. A* **1999**, 834, 419-431.
- (44) Karovicova, J., et al. *Journal of chromatography* **1990**, 509, 283-286.
- (45) Garcia-Schwarz, G.; Santiago, J. G. *Angewandte Chemie* **2013**, 125, 11748-11751.
- (46) Kasicka, V.; Prusik, Z. *Journal of chromatography* **1991**, 569, 123-174.
- (47) Shintaku, H., et al. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 1953-1957.
- (48) Malá, Z., et al. *Electrophoresis* **2015**, 36, 2-14.
- (49) Busnel, J. M., et al. *Anal Chem* **2010**, 82, 9476-9483.

- (50) Gahoual, R., et al. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, 9074-9081.
- (51) David, N. H. *Agilent Technologies* **2000**.
- (52) Münzenberg, G. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, 349–350, 9-18.
- (53) Karas, M., et al. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, 78, 53-68.
- (54) Fenn, J. B., et al. *Science (New York, N.Y.)* **1989**, 246, 64-71.
- (55) Banerjee, S.; Mazumdar, S. *International journal of analytical chemistry* **2012**, 2012, 282574.
- (56) Kebarle, P.; Tang, L. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 972A-986A.
- (57) Taylor, G. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1964**, 280, 383-397.
- (58) Kebarle, P.; Peschke, M. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 406, 11-35.
- (59) Rayleigh, L. *Philosophical Magazine* **1882**, 14, 184-186.
- (60) Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. *The Journal of Chemical Physics* **1976**, 64, 2287-2294.
- (61) Mann, M. *Organic Mass Spectrometry* **1990**, 25, 575-587.
- (62) Fenn, J. B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, 4, 524-535.
- (63) Dole, M., et al. *The Journal of Chemical Physics* **1968**, 49, 2240-2249.
- (64) Mack, L. L., et al. *The Journal of Chemical Physics* **1970**, 52, 4977-4986.
- (65) Thomson, B. A.; Iribarne, J. V. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, 71, 4451-4463.
- (66) Gibson, G. T. T., et al. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, 28, 918-936.
- (67) Emmett, M. R.; Caprioli, R. M. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, 5, 605-613.
- (68) Wilm, M. S.; Mann, M. *Int. J. Mass Spectrom.* **1994**, 136, 167-180.
- (69) Wilm, M.; Mann, M. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 1-8.
- (70) Karas, M., et al. *Analytical Chemistry* **1985**, 57, 2935-2939.
- (71) Tanaka, K., et al. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, 2, 151-153.
- (72) Knochenmuss, R. *The Analyst* **2006**, 131, 966-986.
- (73) Karas, M.; Krüger, R. *Chemical Reviews* **2003**, 103, 427-440.
- (74) Niu, S., et al. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, 9, 1-7.
- (75) Dreisewerd, K. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2014**, 406, 2261-2278.
- (76) Hillenkamp, F., et al. In *MALDI MS*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, pp 1-40.
- (77) Duncan, M. W., et al. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* **2008**, 7, 355-370.
- (78) Cohen, S. L.; Chait, B. T. *Anal Chem* **1996**, 68, 31-37.
- (79) Keller, B. O.; Li, L. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, 17, 780-785.
- (80) Gene, H.S., Stephen, J.B. *Mass Spectrometry in Polymer Chemistry* **2012**, 5-32.
- (81) Paul, W., Steinwedel, H. *Z Naturforsch* **1953**, 8a, 448-450.
- (82) Paul, W., Steinwedel, H. US patent 2939952 (**1960**), (**1956**).
- (83) Stephens, W.E., *Physical Review* **1946**, 69, 691.
- (84) Wolff M.M., Stephens, W.E. *Review of Scientific Instruments* **1953**, 24, 616-617.
- (85) A. V.S., L. V.S., S. A.N., Formation of molecular ions as a result of irradiation of the surface of molecular crystals by UV laser radiation, *JETP Lett.*, **1980**, 31 441.
- (86) Bahr, U., Stahl-Zeng, J., Gleitsmann, E., Karas, M. *Journal of mass spectrometry* **1997**, 32 1111-1116.
- (87) Mamyrin, B.A., Karataev, V.I., Shmikk, D.V., Zagulin, V.A. *JETP*, **1973**, 64 82-89.
- (88) E. Wagner, Nouvelles approches de la spectrométrie de masse en tandem pour la caractérisation de biomolécules : Applications à la protéomique, Thèse de l'université Louis Pasteur, (**2004**) 224.

Chapitre 3 : Les couplages entre l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse: CESI-MS et CE-MALDI-MS

1. Introduction

Depuis la fin des années 1980, un grand nombre d'interfaces CE-MS ont été développées principalement avec les deux sources MS, (i) ESI et (ii) MALDI. Ce développement a porté essentiellement sur deux procédés d'interfaces, (i) avec liquide additionnel et (ii) sans liquide additionnel, et prouve l'intérêt du couplage CE-MS pour les applications analytiques. Les interfaces CE-MS sont en développement constant et sont commercialisées sous différentes formes.

2. Interfaces CE-ESI-MS

La source ESI permet d'ioniser en phase gazeuse les composés chargés ou polaires présents dans un milieu liquide, comme le BGE. De ce fait, l'ESI est parfaitement adaptée pour le couplage avec la CE et s'impose tout naturellement comme la source d'ionisation la plus employée pour ce type d'association. Afin d'assurer le transfert des analytes issus de la séparation jusqu'à la source d'ESI, le couplage CE-ESI-MS nécessite une interface permettant non seulement d'établir une jonction physique mais surtout de conserver un contact électrique nécessaire à toute séparation électrocinétique. L'interface joue un rôle primordial dans le bon fonctionnement du couplage CE-ESI-MS.

En 1987, Olivares et al. mettent au point la première interface utilisant le processus d'ionisation par ESI¹. L'interface proposée consiste à déposer une couche d'argent à l'extrémité de la sortie du capillaire de séparation² afin de réaliser le contact électrique aux bornes du capillaire et de permettre le principe d'ESI. La formation du spray aidé par un flux d'azote (2,5 L/Min) est réalisée sous pression atmosphérique à 60°C. Malgré de bons résultats en termes de sensibilité de détection, l'instabilité du spray en sortie de capillaire a montré que le débit de l'électrophorèse capillaire était sensiblement inférieur au débit nécessaire à une électronébulisation optimale. De plus, la volatilité ainsi que la présence de sel en forte concentration dans le BGE provoquent des problèmes de formation du spray ainsi que des phénomènes de suppression d'ions. Enfin, des réactions électrochimiques à l'extrémité du capillaire détériorent la couche de métal entraînant ainsi des instabilités voire des pertes de courant.

Depuis la fin des années 1980, de nombreuses équipes de recherche ont développé différentes interfaces au couplage CE-ESI-MS basées sur des principes différents qui peuvent être classées en trois grandes catégories : l'interface coaxiale à liquide additionnel dite « Sheath liquid », l'interface à jonction liquide dite « Junction liquid » et l'interface sans liquide additionnel dite « Sheathless ».

2.1. Interfaces CE-ESI-MS « sheath-liquid »

En 1988, Smith et al. ont proposé une alternative à la métallisation du capillaire. Cette interface consiste à remplacer la couche de métal par une jonction à liquide additionnel coaxial^{3,4}. Cette interface se présente sous la forme d'un enfillement coaxial de trois capillaires (figure 15). Le capillaire de séparation électrophorétique prend la place centrale. Celui-ci est entouré par un capillaire métallique permettant de délivrer un liquide additionnel de manière concentrique au flux arrivant de la CE, avec un débit compris entre 3 et 6 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le troisième et dernier capillaire, également en acier inoxydable, assure l'écoulement d'un gaz nébulisant (air ou azote).

Ce flux de gaz permet de favoriser l'évaporation des solvants lors de l'électronébulisation^{5,6}. Afin de procéder aux phénomènes d'ESI, la tension appliquée à l'extrémité de l'aiguille (ou à l'entrée de l'analyseur)⁷ est de +/- 3 à 8 kilovolts. De ce fait, à l'extrémité de l'interface entre les liquides, provenant des capillaires, et le gaz, apparaît le spray de nébulisation. L'interface coaxiale améliore sensiblement la stabilité du processus d'ESI¹.

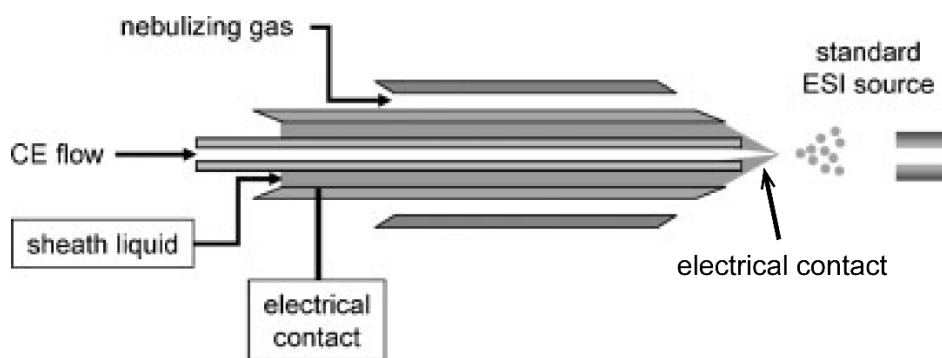


Figure 15. Représentation schématique d'un système d'interfaçage CE-ESI-MS de type sheath-liquid. Adapté à partir de Hommerson *et al.*⁸

Les propriétés physico-chimiques du liquide additionnel ont une grande influence sur l'ionisation des composés en phase gazeuse et, par conséquent, sur l'intensité du signal obtenu. Ainsi, la formation du cône de Taylor est facilitée par l'utilisation de solvants possédant une faible tension de surface. La diminution de la viscosité du solvant utilisé conduit à la diminution de la taille des premières gouttelettes formées ce qui est associé à une meilleure efficacité d'ionisation⁹. Le liquide additionnel est donc généralement constitué d'un solvant organique ou d'un mélange solvant organique/eau.

Ce système a été la première interface CE-ESI-MS commercialisée par la société Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). C'est aussi pour cette raison que cette interface est devenue l'interface la plus utilisée dans les couplages CE-ESI-MS¹⁰.

Plus récemment, l'équipe de David Chen a développé une nouvelle génération d'interface sheath liquid afin de réduire au maximum le débit du liquide additionnel. En effet, Maxwell et al ont proposé de placer le capillaire de séparation dans un fourreau métallique¹² terminé par une cavité s'ouvrant sur un orifice (figure 16). Cette cavité, dans laquelle vient buter l'extrémité du capillaire, fait office de réservoir. Ce fourreau est relié à l'électrode et le réservoir permet d'établir le contact avec la lumière du capillaire. Des débits inférieurs à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, pouvant aller jusqu'à 300 nL/min peuvent être obtenu par ce type d'interface. La société CMP Scientific (Hoboken, USA) s'est très récemment lancée dans la commercialisation de cette interface¹².

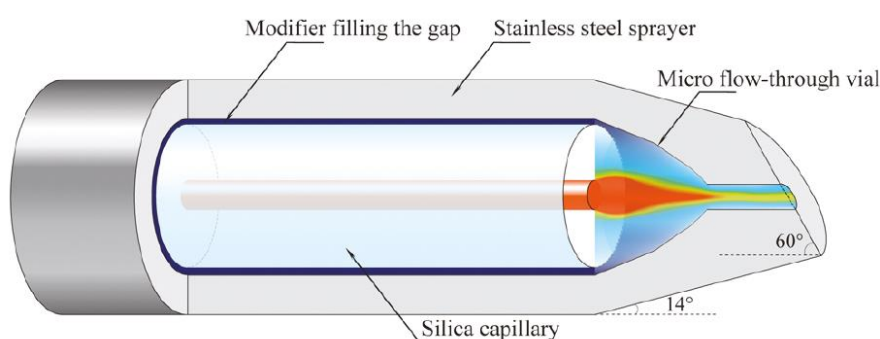


Figure 16. Représentation schématique du montage de la jonction utilisée sur l'interface CE-ESI-MS *liquid junction* à micro vial. Adapté de Maxwell et al.¹².

2.2. Interfaces CE-ESI-MS « junction liquid »

En 1988, Henion et al.^{13,14} ont développé l'interface CE-ESI-MS à jonction liquide dans laquelle le capillaire et le nébuliseur sont connectés par un petit espace de 10 à 20 μm rempli par un liquide de contact (figure 17). Cet espace inter-capillaire doit être suffisamment grand pour permettre au liquide de s'introduire dans le capillaire de transfert, mais aussi suffisamment petit pour éviter toute "fuite" et donc éviter les pertes des analytes¹⁵.

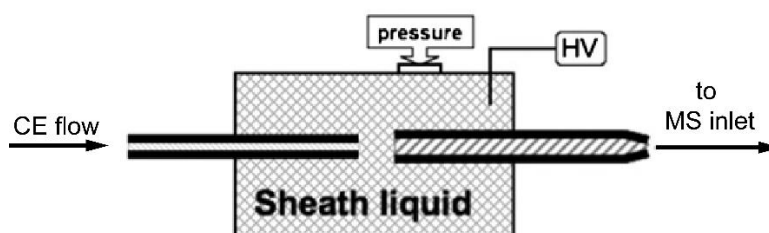


Figure 17. Schéma du principe de l'interface à jonction liquide

Les différentes études réalisées à l'aide de cette interface ont montré que la séparation physique des deux capillaires permet une plus grande souplesse dans le choix du liquide de jonction. Cet avantage s'est révélé efficace dans l'optimisation et l'amélioration du processus d'ESI. Malheureusement l'interface à jonction liquide est délicate à construire. Cette configuration demande une grande rigueur de montage dans l'alignement des capillaires de séparations et de transfert¹⁶.

En effet, de nombreuses études ont mis en évidence des augmentations de bruits de fond significatifs ainsi que des pertes d'efficacité. Ces deux phénomènes sont principalement dus à l'élargissement des pics lors du passage d'un capillaire à l'autre. Malgré le plus large choix de liquide additionnel, la faible ergonomie de mise en place et le manque de robustesse ont fait que cette interface n'a pas supplanté l'interface coaxiale à liquide additionnel.

2.3. Interfaces CE-ESI-MS « sheathless »

Comme nous l'avons vu précédemment, la première interface sans liquide additionnel a été développée en 1987 par Olivares et al.¹. Malgré de nombreuses limitations basées notamment sur des problèmes d'instrumentation, ce type d'interface a toujours suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique¹⁷. En effet, cette interface permet entre autre d'améliorer la sensibilité en minimisant les effets de dilution des analytes en sortie de capillaire engendrés par le liquide additionnel. Cela représente le couplage idéal de la CE avec l'ESI-MS. Cette source fonctionne de manière optimale avec des débits pouvant être inférieur à 20 nL/min qui sont compatibles avec le faible débit de la CE¹⁸. La réduction du débit de solution arrivant dans la source d'ionisation conduit par ailleurs à la formation de gouttelettes de plus petites tailles associées à une meilleure efficacité d'ionisation et se traduit par une amélioration de la sensibilité¹⁹.

En 1997, Kelly et al. ont démontré que l'interface sans liquide additionnel permet l'amélioration de la sensibilité par un facteur 10 par rapport à l'interface coaxiale à liquide additionnel pour une même quantité injectée²⁰.

Plus récemment, Gahoual et al. ont évalué les performances d'une nouvelle interface CE-ESI-MS développée par la société Beckman Coulter (Brea, USA), aujourd'hui Sciex Separation, en tant que nanosprayeur. Ils ont montré dans l'étude de l'infusion de myoglobine en milieu acide acétique à 10%, une augmentation significative de la sensibilité d'un facteur 46 lorsqu'on réduit le débit d'infusion d'une valeur de 460 à 14 nL/min.

Depuis quelques décennies, plusieurs configurations d'interfaces nanosprays ont été développées. La première configuration, la plus répandue, consiste à utiliser un capillaire de silice vierge recouvert à son extrémité d'un matériau conducteur (figure 18). La couche de métal est en contact avec la lumière du capillaire et permet de réaliser le contact électrique²¹⁻²³.

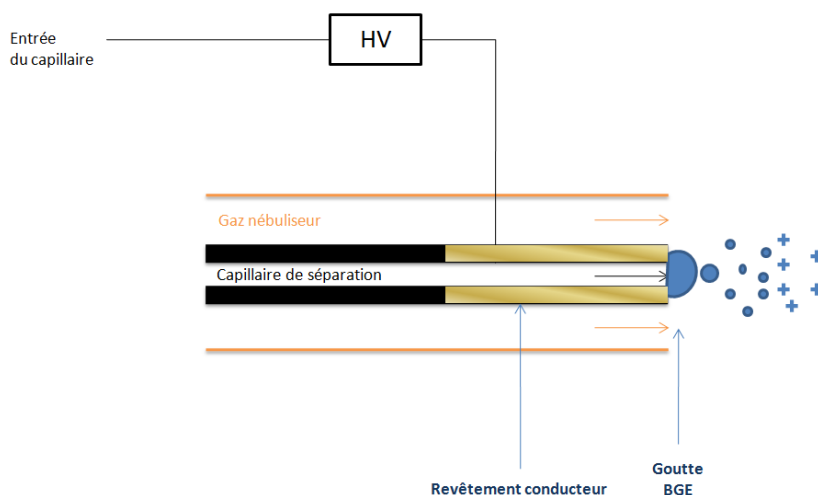


Figure 18. Interface « Sheathless » à connexion par revêtement conducteur.

Ce type d'interface est relativement simple à mettre en place et permet d'obtenir une sensibilité supérieure aux interfaces sheath-liquid. L'inconvénient majeur de ce type d'interface vient de la durée de vie du revêtement métallique appliqué. Les tensions électriques importantes appliquées pour réaliser les séparations entraînent une usure prématurée du revêtement conducteur ce qui peut aboutir à une perte du contact électrique.

Un autre procédé également utilisé pour maintenir le contact électrique est d'insérer un fil conducteur à l'intérieur du capillaire relié à l'électrode de sortie de CE. Lorsque le diamètre interne du capillaire est suffisamment grand, le fil peut être introduit par l'extrémité du capillaire CE ou encore par l'intermédiaire d'un trou par lequel le fil est introduit ce qui lui permet d'entrer en contact avec le BGE contenu à l'intérieur du capillaire et de maintenir le contact électrique²⁴. D'une manière générale, ce système d'interface possède des caractéristiques similaires aux autres interfaces sheathless ainsi il n'est pas nécessaire d'utiliser un gaz de nébulisation. Toutefois la présence du fil à l'intérieur du capillaire tend à perturber le flux électroosmotique, ce qui peut avoir des conséquences négatives sur la séparation (élargissement des pics) et altérer le spray généré.

Dans le but de produire des interfaces sheathless CE-ESI-MS plus robuste et dont les capillaires puissent avoir une durée de vie comparable à celle des capillaires utilisés en CE classique, d'autres moyens de maintenir le contact électrique ont été mis au point. Ainsi l'interface CESI-MS fut introduite postérieurement aux premiers développements réalisés en couplage CE-ESI-MS.

La première des particularités de cette interface est qu'elle met en jeu deux capillaires distincts. Le premier capillaire est défini comme étant le capillaire de séparation car à l'intérieur de celui-ci la séparation électrophorétique est réalisée. L'extrémité du capillaire de séparation, destinée à être placée dans la source ESI, subit une attaque à l'aide d'acide fluorhydrique. Le but de cette attaque est de rendre poreuse la silice au niveau de la partie traitée. Par ce procédé, la porosité acquise par la silice formant les parois du capillaire permet aux électrons et aux ions de faibles diamètres de traverser les parois. Ce capillaire de séparation est positionné à l'intérieur d'une canule en acier inoxydable. Celle-ci est remplie de BGE par l'intermédiaire d'un second capillaire que l'on nomme capillaire de contact. Le capillaire de contact est relié à l'électrode de sortie de la CE (figure 19).

La porosité acquise par la silice, au niveau de la partie traitée à l'acide, tend à laisser passer les électrons et les ions de faibles rayons au travers de la paroi. Le contact électrique est par conséquent maintenu par l'intermédiaire de la partie poreuse du capillaire qui permet de laisser le courant s'établir à travers les parois du capillaire. L'extrémité du capillaire de séparation est positionnée en direction de l'entrée du MS si bien qu'uniquement ce qui est issu du capillaire de séparation est effectivement transféré au spectromètre de masse (figure 19).

Ce design d'interface a la faculté de générer un nanoESI avec une excellente robustesse tout en fournissant une sensibilité optimale. Malgré le fait que le maintien du contact électrique soit conditionné par la porosité des parois du capillaire, le procédé d'attaque acide permet de fournir un contact électrique stable et ainsi éviter les effets d'instabilité du flux électroosmotique.

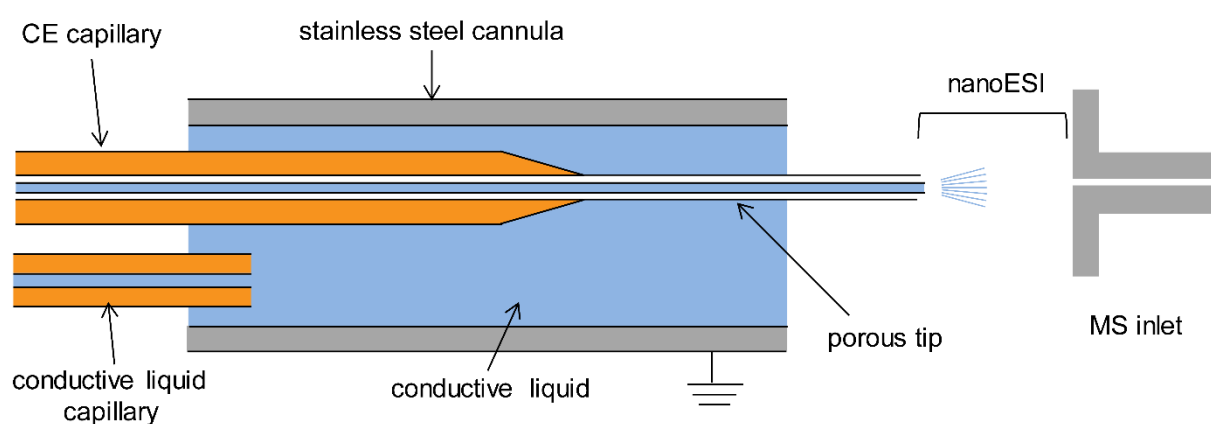


Figure 19. Représentation schématique d'interface sheathless CESI-MS.

Ce design d'interface a été originalement développé par Moini et al²⁵. La société Beckman Coulter a ensuite racheté le brevet concernant ce design d'interface CE-ESI-MS afin de développer une solution commerciale.

La littérature fait ainsi état de l'emploi du couplage CE-ESI-MS utilisant l'interface CESI-MS dans plusieurs thématiques de recherches :

- Analyse de petites molécules organiques thérapeutiques^{26,27}
- Analyse protéomique de type bottom-up²⁸⁻³⁰
- Caractérisation de modifications post-traductionnelles^{31,32}
- Analyse métabolomique³³
- Caractérisation de glycosylations/glycoprofiling^{34,35}
- Caractérisation de structures primaires de protéines³⁶
- Caractérisation de protéines entières^{37,38}
- Utilisation comme plateforme d'infusion nanoESI³⁹

Ces travaux soulignent notamment la robustesse de l'ESI généré par l'intermédiaire de l'interface CESI-MS. Un certain nombre de travaux montrent que la mise en œuvre de l'interface CESI-MS permet de diminuer de manière significative les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) par rapport à l'interface CE-ESI-MS sheath liquid²⁷. A titre d'illustration Busnel et al décrivent la séparation et l'analyse MS/MS par CESI-MS/MS d'un digest tryptique d'albumine de sérum bovin permettant l'identification des peptides qui la compose et d'aboutir à un taux de recouvrement de séquence proche de 80% pour une injection correspondant à seulement 8 fmol de peptides digérés²⁸. Les gains en termes de sensibilité s'expliquent par les propriétés intrinsèques de l'interface qui favorisent une excellente efficacité d'ionisation. Le capillaire de séparation possède un diamètre interne inférieur à 30 µm. Ce faible diamètre interne du capillaire ajouté aux faibles débits générés par l'EOF tendent à former des gouttelettes très fines et donc plus facilement sujettes aux explosions coulombiennes.

3. Interfaces CE-MALDI-MS

Comme nous l'avons vu précédemment, le couplage de la CE avec la MS à source ESI représente aujourd'hui un outil alternatif de choix aux couplages chromatographiques classiques. Grâce à sa géométrie et à sa relative facilité de mise en application, ce couplage est majoritairement mis en œuvre pour les analyses de CE-MS. Cependant, les propriétés intrinsèques de l'ESI imposent l'utilisation de BGE volatile pour la formation d'un spray mais aussi une présence et une concentration maîtrisées en sels et en détergents pour minimiser les phénomènes de suppression d'ions⁴⁰⁻⁴².

En effet, la CE nécessite souvent l'utilisation d'un BGE dont la composition est majoritairement en phase aqueuse et en présence de sels avec une force ionique pouvant atteindre 1 M. De plus, d'autres modes tels que la CIEF ou la MEKC imposent l'utilisation d'ampholytes ou de détergents rendant très complexe voire impossible l'utilisation de l'ESI.

La source MALDI, apparaît donc comme une alternative importante au couplage de la CE avec une source ESI-MS. Le couplage CE-MALDI-MS permet en effet d'allier la rapidité, la haute résolution et la grande efficacité de séparation de la CE avec la sélectivité et la sensibilité⁴³ du MALDI-MS. De plus, comparé à l'ESI, la source MALDI permet une meilleure compatibilité avec les conditions de la CE. En effet, la source MALDI est grâce à son principe d'ionisation plus tolérante envers la présence de sels et/ou de détergents⁴⁴. De plus, l'étape de cristallisation de l'échantillon et de la matrice permet une plus grande malléabilité du traitement de l'échantillon post-séparation. Il est en effet possible d'effectuer des opérations de lavages sur cibles permettant d'éliminer au maximum les sels ou de procéder à des réactions sur cible⁴⁵. Evidemment, ce couplage n'est pas exempt de limitations. Concernant la CE, la limitation majeure est la même que celle du couplage CE-ESI-MS, à savoir le maintien du courant. En effet, toute chute de courant implique des phénomènes de diffusion de l'échantillon à l'intérieur du capillaire provoquant une baisse de l'efficacité et de la résolution de la séparation. Les principes physiques des interfaces CE-MALDI-MS sont en grande majorité identiques aux interfaces CE-ESI-MS, c'est-à-dire basées sur l'utilisation de liquide additionnel, de jonction liquide ou de l'utilisation de capillaires rendus conducteurs.

Concernant la source MALDI, la limitation est propre au principe même du MALDI. En effet, lors de l'étape de désorption/ionisation, l'irradiation laser est réalisée sur un dépôt solide d'un mélange de matrice et d'échantillon ce qui empêche théoriquement tout couplage avec une méthode séparative en veine liquide. Cette limitation a imposé de lourds développements instrumentaux et a conduit au développement de deux types de couplage distincts : le couplage direct, avec un dépôt à l'intérieur de la source suivie d'une étape de cristallisation intégrée et le couplage indirect, avec une étape de dépôt sur cible hors de la source et une étape de passage manuel ou automatisé de la cible dans la source.

Lors de ces travaux, nous avons travaillé sur un couplage indirect développé au laboratoire. Pour cette raison, je décrirai uniquement ce type de couplage dans cette partie.

3.1. Interfaces CE-MALDI-MS indirectes

Les interfaces CE-MALDI-MS indirectes sont toutes basées sur le principe de réaliser l'analyse en deux étapes distinctes : l'étape de séparation électrophorétique avec collection de fractions et l'analyse de l'échantillon par MALDI-MS. Par rapport au couplage direct, les interfaces indirectes apportent quelques avantages.

Le premier, certainement le plus important pour son développement, est qu'il n'y a pas de modification de la source MALDI. En effet, seule l'étape de dépôt sur cible a entraîné des développements instrumentaux. Les instruments commerciaux de MALDI-MS peuvent donc être utilisés dans leur configuration « constructeur ».

Un autre avantage, aussi dû au découplage de la séparation et de la détection MALDI-MS, est le fait que les paramètres d'optimisation de séparation sont plus simples à mettre en place. Le fait de déposer l'échantillon juste après la séparation ouvre la possibilité de réaliser un traitement post-séparation sur cible (lavage, dessalage, dérivation, réaction enzymatique...)⁴⁶. De plus, il est possible de faire varier le support de dépôt comme par exemple l'utilisation de cible MALDI avec différents traitements de membrane^{47,48} ou de plaque PCR. De ce fait, il est possible de réaliser soit un dépôt direct sur cible pour avoir une analyse de l'échantillon rapide, soit un enrichissement sur plaque pour pouvoir concentrer des échantillons⁴⁹. Enfin, ce type d'interface permet aussi de conserver et de ré-analyser des échantillons. C'est une méthode non destructrice.

D'un point de vue pratique, le principe des interfaces indirectes est basé sur le même procédé que les systèmes à collecte de fractions. La collecte s'effectue directement à la sortie du capillaire de séparation. L'expérimentateur déclenche la collecte de manière hydrodynamique (avec pression) ou électrocinétique (sans pression) à la détection du pic ou de la zone d'intérêt.

Cependant, tout comme l'interface directe, la limitation importante au bon fonctionnement de ce type d'interface est le maintien du courant de la séparation électrophorétique. Dans le cas des interfaces indirectes, les solutions proposées reprennent la géométrie des interfaces décrites pour les CE-ESI-MS. En effet, la nécessité de garder un contact électrique tout au long de la séparation malgré la collecte de fraction impose l'utilisation de procédés tels que les interfaces à liquide additionnel⁵⁰, les interfaces à liquide de jonction ou la mise en place de capillaire métallisé⁵¹.

Le premier type d'interface développé est l'interface à liquide additionnel. Ce type d'interface utilisé en couplage CE-MALDI-MS présente deux avantages.

Le premier est de conserver un champ électrique aux extrémités du capillaire que ce soit par l'intermédiaire d'un réservoir ou par le remplissage d'un tube coaxial. Le second avantage est de créer une goutte à la sortie du capillaire dans laquelle diffusera l'analyte lors de la collecte. Dans la majorité des cas, le liquide additionnel est composé de BGE. Cependant, VanVeelen et al. ont montré qu'il était aussi possible d'ajouter la matrice⁵² directement dans le liquide additionnel⁵³. Cette addition permet de mélanger la fraction de l'échantillon directement avec la matrice afin de réaliser un dépôt goutte séchée. Cependant, à cause des propriétés chimiques de la matrice (pH acide, conductivité...), son ajout directement dans le BGE peut modifier le profil électrophorétique, voire détériorer complètement la séparation⁵³.

Une autre limitation au caractère indirecte de l'interface est basée sur le contrôle de la séparation électrophorétique dans l'étape de collecte par un deuxième système de détection. En effet, le fait de découpler l'étape de séparation et l'étape de détection MALDI-MS impose une double détection pour contrôler à la fois l'étape de collecte et la MS. Ainsi l'expérimentateur connaît l'origine du problème dans le cas d'une analyse défectueuse. La totalité des interfaces développées avec une double détection ont été avec un détecteur UV externe^{55,56}. Ceci ajoute une instrumentation supplémentaire et de ce fait limite toute automatisation. Cependant, il est à noter que, dû à leur caractère « homemade », la grande majorité des interfaces développées à ce jour n'utilisent pas de double détection.

3.1.2. Couplage CE-MALDI-MS indirect avec interface à débit de liquide additionnel.

En 2001, Johnson propose l'utilisation d'un système robotisé commercial, Probot (Dionex, BAI) destiné à la collection de fractions en LC-MALDI-MS (Figure 20). L'équipe modifie le robot en intégrant une interface coaxiale en lieu et place du système de dépôt classique. Cette interface consiste à faire passer la sortie du capillaire de séparation dans une aiguille métallique. Cette aiguille métallique joue ainsi le rôle d'électrode⁵⁷. Un système de distribution de liquide additionnel permet de distribuer l'électrolyte support et ainsi de conserver la jonction électrique avec le capillaire. Enfin, le support de dépôt est piloté permettant un déplacement sur trois axes. Ainsi l'aiguille reste fixe et le support vient se positionner afin de « récolter » les fractions. Le système ne prévoyant pas de distribution de matrice, l'expérimentateur doit recouvrir préalablement la cible MALDI avec la matrice ce qui ne permet pas la réalisation du dépôt goutte séchée.

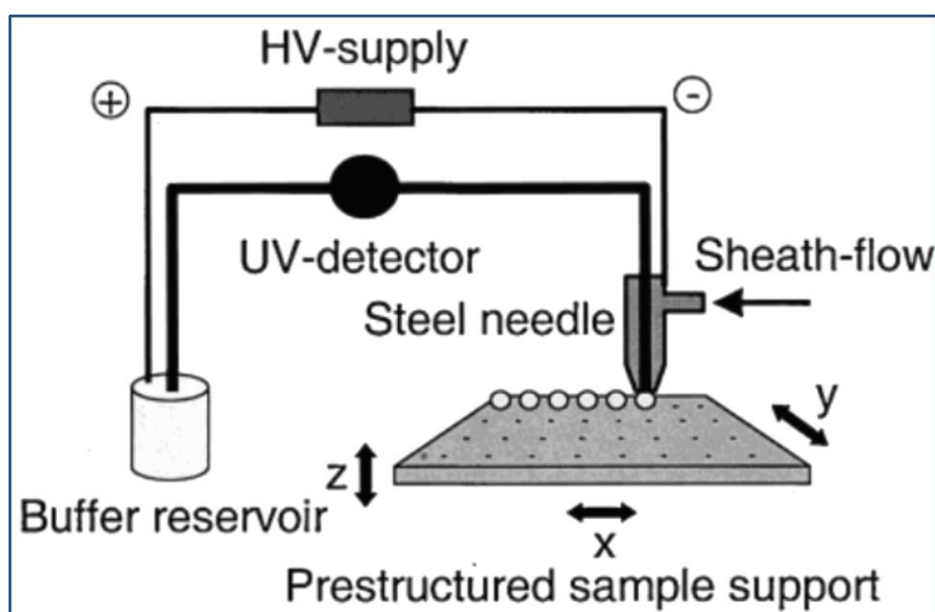


Figure 20. Reproduction du schéma de l'interface CE-MALDI-MS indirecte de la publication de Johnson 2001⁵⁷.

Johnson et al. intègrent une détection UV externe afin de contrôler la séparation électrophorétique pendant la collection de fraction. L'utilisation d'un robot commercial et de son logiciel permet l'automatisation tout au long du processus de séparation et de dépôt. Cependant la détection UV n'est pas intégrée dans l'automatisation. L'absence de contamination d'une fraction à l'autre est évaluée en comparant l'analyse MALDI de spots consécutifs correspondant à un pic sur l'électrophérogramme UV. L'équipe détermine que l'intensité du signal varie en même temps que la définition du pic et que le signal disparaît sur les spots suivants. De plus, ce couplage permet de détecter des concentrations de l'ordre du femtomole de mélange de peptides. Enfin, le couplage décrit par Johnson et al. a montré son intérêt sur un mélange de peptides complexes en permettant une réelle augmentation de peptides détectés par rapport à un dépôt direct.

Plus tard, en 2009, Helmja et al. reprennent la philosophie de l'interface coaxiale⁵⁸ à liquide additionnel. La collection de fractions s'effectue dans une succession de vials. Le débit du liquide additionnel permet d'effectuer une goutte au bout de l'extrémité du capillaire. Lorsque la goutte devient suffisamment volumineuse (12-18 μ l), la tension de surface n'est plus suffisante pour permettre à la goutte (BGE/analyte) d'adhérer à l'aiguille. Ainsi, la goutte tombe dans le vial en passant devant un détecteur à LED.

La détection de la goutte indique au système de déplacer le support de collecte au vial suivant. Le volume et le temps de fractionnement dépendent directement du diamètre externe du capillaire. Ce système est avant tout utilisé comme un système automatisé sans intervention de la part de l'opérateur. Le système a été évalué sur un mélange de protéines standards et montre une absence de contaminations d'un vial à l'autre. De plus, la particularité de la collection de fraction en vial donne la possibilité à l'opérateur de "retravailler" ou d'analyser les fractions sur différents systèmes (ESI-TOF-MS, ICP-MS).

Plus étonnant, Vannatta et al. en 2009, recyclent un système de distribution par valve d'une imprimante jet d'encre⁵⁹. Grâce à l'utilisation d'une valve alimentée par hélium, le système automatisé permet de mélanger et d'insuffler le mélange matrice/effluent directement sur plaque MALDI (Figure 21).

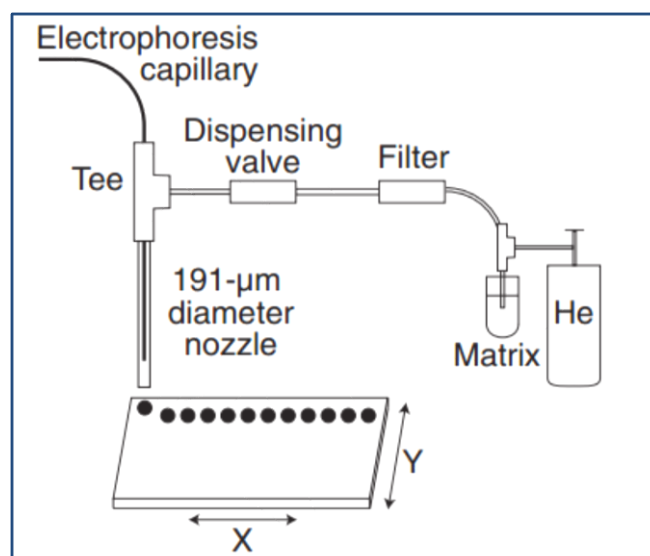


Figure 21. Reproduction du schéma de l'interface CE-MALDI-MS indirecte de la publication de Vannatta 2009⁵⁹.

L'équipe valide le système en séparant un mélange de protéines standards et évalue l'efficacité de la séparation à 40 000 HPT et d'une sensibilité de l'ordre 500 atomoles.

3.1.3. Couplage CE-MALDI-MS indirect avec interface sans liquide additionnel.

Les systèmes sans liquide additionnel dit « sheathless » présentent l'avantage d'avoir une meilleure sensibilité. Néanmoins, la difficulté de conserver le courant électrophorétique durant les différentes phases de la collecte de fraction peut être un frein à leur développement. C'est dans l'optique d'améliorer la sensibilité en ne diluant pas l'analyte fractionné que les interfaces ont été mises au point.

Le premier couplage apparaît en 1996. Zhang et al. proposent un système de dépôt continu sur une membrane de cellulose recouverte de matrice. La plaque et le support de plaque sont reliés à l'électrode⁶⁰. La continuité du champ électrique nécessaire à la séparation électrophorétique peut se réaliser grâce au contact de la sortie du capillaire et de la cellulose (Figure 22). En effet, un angle de 60° entre le capillaire et la plaque assure le contact et le dépôt. Ce système a été évalué sur un mélange de protéines standards et d'un digestat d'apomyoglobine de cheval.

De plus, ce couplage en dépôt continu est dépourvu de détection UV supplémentaire. L'optimisation du système concerne majoritairement les étapes de dépôt et d'analyses MALDI. Néanmoins, la détection UV est effectuée sur un système classique afin d'établir les paramètres de séparations.

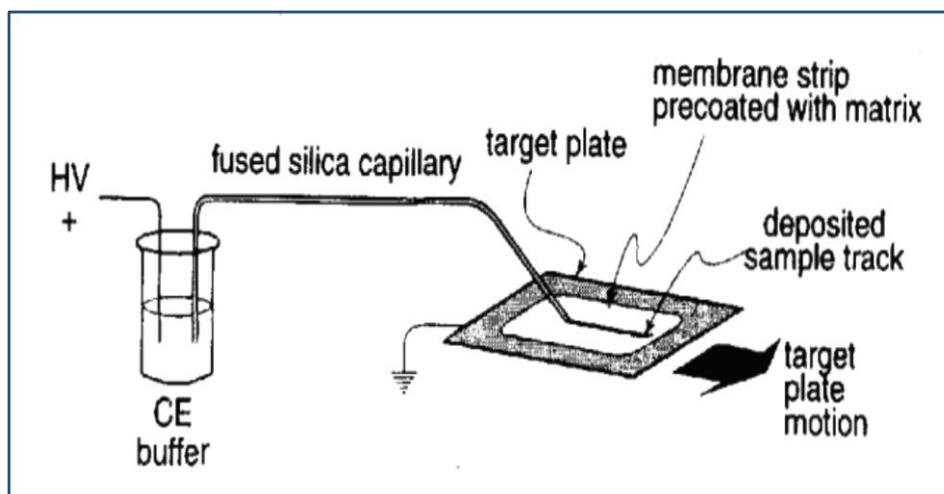


Figure 22. Reproduction du schéma de l'interface CE-MALDI-MS indirecte de la publication de Zhang 1996⁶⁰

Grâce au dépôt continu, les analytes séparés sont déposés en totalité sur le support. Ainsi, les paramètres de résolution et d'efficacité sont établis par la séquence de tir laser tout au long du dépôt. Enfin, l'évaluation a montré que ce couplage à dépôt continu préserve la résolution et l'efficacité de la séparation électrophorétique (70 000 HPT) et permet de détecter des concentrations d'analytes de l'ordre de l'atome.

Plus tard, Ojima et al. en 2001 proposent un système basé sur un électrocouplage par goutte de BGE⁶¹. Afin d'établir une connexion électrique avec la sortie du capillaire, la plaque MALDI est reliée à la masse, jouant ainsi le rôle d'électrode. Afin de compenser le faible débit d'électrolyte support sortant du capillaire, l'opérateur dépose préalablement une goutte de BGE (1 μ L). De plus, la séparation électrophorétique est suivie par un détecteur UV additionnel pendant le processus de dépôt.

Plus tard, en 2004 Wei et al. présentent un système mêlant le principe de l'électronébulisation avec collecte de fractions sur plaque MALDI⁶². Ce système consiste à appliquer une tension entre la plaque MALDI et l'extrémité du capillaire. Ainsi, comme pour l'ESI, la présence d'une différence de potentiel entre l'extrémité du capillaire et la plaque MALDI engendre l'apparition d'un cône de Taylor sur la goutte de BGE. La nébulisation du mélange BGE/analytes s'effectue. Le spray dépose le mélange BGE/analyte sur la cible MALDI. L'optimisation des dépôts consiste à maîtriser le spray en variant la distance capillaire/plaque (100 - 500 μ m) et la différence de potentiel pour l'électronébulisation (1.0 et 1.4 kV). L'équipe a testé ce couplage sur une gamme de concentration de bradykinine et sur un mélange de peptides. Les analyses MALDI ont montré une bonne robustesse du système et un très bon rapport S/N par rapport au dépôt classique. Enfin, la sensibilité du système a permis de détecter des concentrations de neuropeptides de l'ordre de l'atome.

En 2009, Busnel et al. ont proposé un système permettant de s'affranchir de liquide de jonction à l'instar de l'électrocouplage⁶³. Le procédé, appelé iontophorétique, consiste à peindre l'extrémité du capillaire avec une peinture argentée conductrice (figure 23.) L'extrémité argentée du capillaire est reliée à la masse permettant de conserver le courant de séparation fraction après fraction. La collection de fractions s'effectue dans des gouttes de BGE ou de matrice préalablement déposées sur une plaque MALDI mobile permettant la séparation électrophorétique ininterrompue fraction après fraction. Busnel et al. ont compensé la dilution des analytes dans chaque fraction par l'utilisation d'une plaque MALDI préstructurée permettant de déposer l'échantillon.

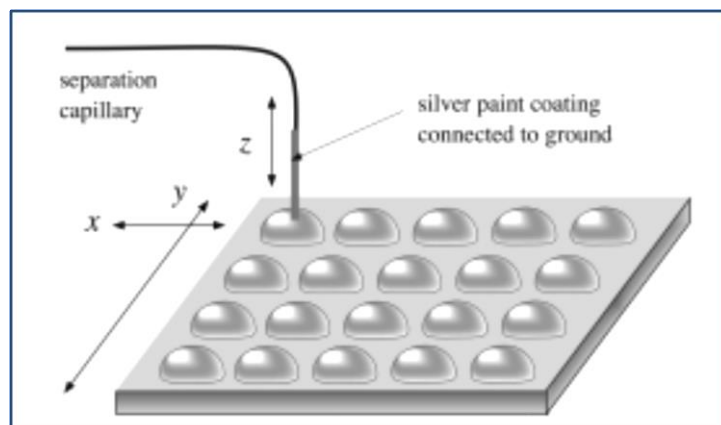


Figure 23. Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication de Busnel 2009⁶³.

Le couplage a été testé sur la séparation d'un digestat tryptique de 8 protéines modèles. Les résultats montrent une augmentation significative de la couverture de séquence de chaque protéine par rapport au dépôt direct.

Références bibliographiques :

- (1) Jose A. OLIVARES, Nhung T. NGUYEN, Clement R. YONKER et Richard D. SMITH, « On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis », *Analytical Chemistry*, avril 1987, vol. 59, no 8, pp. 1230-1232.
- (2) Richard D. SMITH, Jose A. OLIVARES, Nhung T. NGUYEN et Harold R. UDSETH, « Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface », *Analytical Chemistry*, mars 1988, vol. 60, n° 5, pp. 436-441.
- (3) R. D. SMITH et H. R. UDSETH, « Capillary zone electrophoresis-MS », *Nature*, 18 février 1988, vol. 331, no 6157, pp. 639-640.
- (4) Richard D. SMITH, Charles J. BARINAGA et Harold R. UDSETH, « Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry », *Analytical Chemistry*, septembre 1988, vol. 60, no 18, pp. 1948-1952.
- (5) L. W. TETLER, P. A. COOPER et B. POWELL, « Influence of capillary dimensions on the performance of a coaxial capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry interface », Elsevier, 1995, vol.700.
- (6) J. F. BANKS, « Optimization of conditions for the analysis of a peptide mixture and a tryptic digest of cytochrome c by capillary electrophoresis-electrospray-ionization mass spectrometry with an improved liquid-sheath probe », Elsevier, 1995, vol.712.
- (7) A. INGENDOH, A. KIEHNE et M. GREINER, « CE-MS-MS of peptides using a novel orthogonal CE ESI sprayer and ion trap MS », *Chromatographia*, janvier 1999, vol. 49, no S1, pp. S87-S92.
- (8) Hommerson, P., Khan, A.M., de Jong, G.J., Somsen, G.W. *Mass. Spectrom. Rev.* 2011, 30, 1096-1120.
- (9) R B COLE, « Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry », *Journal of mass spectrometry: JMS*, juillet 2000, vol. 35, no 7, pp. 763-772.
- (10) Mehdi MOINI, « Design and Performance of a Universal Sheathless Capillary Electrophoresis to Mass Spectrometry Interface Using a Split-Flow Technique », *Analytical Chemistry*, juillet 2001, vol. 73, no 14, pp. 3497-3501.
- (11) Christian NEUSÜß, Matthias PELZING et Marcus MACHT, « A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry », *ELECTROPHORESIS*, septembre 2002, vol. 23, no 18, pp. 3149-3159.
- (12) E. Jane MAXWELL, Xuefei ZHONG et David D. Y. CHEN, « Asymmetrical Emitter Geometries for Increased Range of Stable Electrospray Flow Rates », *Analytical Chemistry*, 15 octobre 2010, vol. 82, no 20, pp. 8377-8381.
- (13) Edgar D. LEE, Wolfgang MÜCK, Jack D. HENION et Thomas R. COVEY, « On-line capillary zone electrophoresis-ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphins », *Journal of Chromatography A*, décembre 1988, vol. 458, pp. 313-321.
- (14) Edgar D. LEE, Wolfgang MÜCK, Jack D. HENION et Thomas R. COVEY, « Liquid junction coupling for capillary zone electrophoresis/ion spray mass spectrometry », *Biological Mass Spectrometry*, septembre 1989, vol. 18, no 9, pp. 844-850.
- (15) Jianyi CAI et Jack HENION, « Capillary electrophoresis-mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 26 juin 1995, vol. 703, n° 1-2, pp. 667-692.
- (16) Timothy WACHS, Robin L. SHEPPARD et Jack HENION, « Design and applications of a self-aligning liquid junction-electrospray interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry », *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, octobre 1996, vol. 685, no 2, pp. 335-342.
- (17) Haleem J ISSAQ, George M JANINI, King C CHAN et Timothy D VEENSTRA, « Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometric detection advantages and limitations », *Journal of chromatography. A*, 22 octobre 2004, vol. 1053, no 1-2, pp. 37-42.
- (18) Matthias WILM et Matthias MANN, « Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source », *Analytical Chemistry*, janvier 1996, vol. 68, no 1, pp. 1-8.

- (19) Robert A. MEYERS (dir.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, Chichester, UK, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- (20) John F. KELLY, Louis RAMALEY et Pierre THIBAUT, « Capillary Zone Electrophoresis–Electrospray Mass Spectrometry at Submicroliter Flow Rates: Practical Considerations and Analytical Performance », *Analytical Chemistry*, janvier 1997, vol. 69, no 1, pp. 51–60.
- (21) Jon H. WAHL, David C. GALE et Richard D. SMITH, « Sheathless capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry using 10 µm I.D. capillaries: Analyses of tryptic digests of cytochrome c », *Journal of Chromatography A*, janvier 1994, vol. 659, no 1, pp. 217–222.
- (22) M. Scott. KRIGER, Kelsey D. COOK et Roswitha S. RAMSEY, « Durable Gold-Coated Fused Silica Capillaries for Use in Electrospray Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, janvier 1995, vol. 67, no 2, pp. 385–389.
- (23) Yan Zin CHANG et Guor Rong HER, « Sheathless Capillary Electrophoresis/Electrospray Mass Spectrometry Using a Carbon-Coated Fused-Silica Capillary », *Analytical Chemistry*, février 2000, vol. 72, no 3, pp. 626–630.
- (24) Fang, L.L., et al., *ONLINE TIME-OF-FLIGHT MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS OF PEPTIDES SEPARATED BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS*. *Analytical Chemistry*, 1994. 66(21): p. 3696–3701.
- (25) Cao, P. and M. Moini, A novel sheathless interface for capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1997. 8(5): p. 561–564
- (26) Bonvin, G., et al., Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling. *Electrophoresis*, 2012. 33(4): p. 552–562.
- (27) Bonvin, G., J. Schappler, and S. Rudaz, Non-aqueous capillary electrophoresis for the analysis of acidic compounds using negative electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2014. 1323(0): p. 163–173.
- (28) Busnel, J.-M., et al., High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Coupling a Porous Sheathless Interface with Transient-Isotachopheresis. *Analytical Chemistry*, 2010. 82(22): p. 9476–9483.
- (29) Faserl, K., et al., Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2011. 83(19): p. 7297–7305
- (30) Wang, Y., et al., Improving the Comprehensiveness and Sensitivity of Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry for Proteomic Analysis. *Analytical Chemistry*, 2012. 84(20): p. 8505–8513.
- (31) Sarg, B., et al., Comparing and Combining Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Nano–Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of Post-translationally Modified Histones. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013. 12(9): p. 2640–2656.
- (32) Heemskerk, A.A.M., et al., Ultra-Low Flow Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Improved Ionization Efficiency in Phosphoproteomics. *Analytical Chemistry*, 2012. 84(10): p. 4552–4559.
- (33) Ramautar, R., et al., Enhancing the Coverage of the Urinary Metabolome by Sheathless Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2012. 84(2): p. 885–892.
- (34) Heemskerk, A.A.M., et al., Coupling porous sheathless interface MS with transient-ITP in neutral capillaries for improved sensitivity in glycopeptide analysis. *ELECTROPHORESIS*, 2013. 34(3): p. 383–387.
- (35) Haselberg, R., G.J. de Jong, and G.W. Somsen, Low-Flow Sheathless Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Sensitive Glycoform Profiling of Intact Pharmaceutical Proteins. *Analytical Chemistry*, 2013. 85(4): p. 2289–2296.
- (36) Gahoual, R., et al., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *mAbs*, 2013. 5(3): p. 479–490.

- (37) Haselberg, R., et al., Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins. *Journal of Chromatography A*, 2010. 1217(48): p. 7605-7611.
- (38) Haselberg, R., et al., Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2011. 698(1-2): p. 77-83.
- (39) Gahoual, R., et al., Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. 406(4): p. 1029-1038.
- (40) Richard B. COLE, « Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, 1 juillet 2000, vol. 35, no 7, pp. 763-772.
- (41) P. KEBARLE, « A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, juillet 2000, vol. 35, no 7, pp. 804-817.
- (42) Jozef MARÁK et Andrea STAŇOVÁ, « Buffer salt effects in off-line coupling of capillary electrophoresis and mass spectrometry: CE and CEC », *ELECTROPHORESIS*, mai 2014, vol. 35, no 9, pp. 1268-1274.
- (43) Lijuan PENG et Gary R. KINSEL, « Improving the sensitivity of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry by using polyethylene glycol modified polyurethane MALDI target », *Analytical Biochemistry*, mai 2010, vol. 400, no 1, pp. 56-60.
- (44) Nariyasu MANO et Junichi GOTO, « Biomedical and biological mass spectrometry », *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, janvier 2003, vol. 19, no 1, pp. 3-14.
- (45) Hugo M. SANTOS, Petri KOUVONEN, Jose-Luis CAPELO et Garry L. CORTHALS, « On-target ultrasonic digestion of proteins », *PROTEOMICS*, 1 mai 2013, vol. 13, no 9, pp. 1423-1427.
- (46) Yan LI, Bo YAN, Chunhui DENG, Jia TANG, Junyan LIU et Xiangmin ZHANG, « On-plate digestion of proteins using novel trypsin-immobilized magnetic nanospheres for MALDI-TOF-MS analysis », *Proteomics*, octobre 2007, vol. 7, no 20, pp. 3661-3671.
- (47) M ALBIN, S M CHEN, A LOUIE, C PAIRAUD, J COLBURN et J WIKTOROWICZ, « The use of capillary electrophoresis in a micropreparative mode: methods and applications », *Analytical biochemistry*, 1 novembre 1992, vol. 206, no 2, pp. 382-388.
- (48) H.J. BOSS, M.F. ROHDE et R.S. RUSH, « Multiple Sequential Fraction Collection of Peptides and Glycopeptides by High-Performance Capillary Electrophoresis », *Analytical Biochemistry*, septembre 1995, vol. 230, no 1, pp. 123-129
- (49) Hongyan BI, Liang QIAO, Jean-Marc BUSNEL, Valerie DEVAUD, Baohong LIU et Hubert H. GIRAULT, « TiO₂ Printed Aluminum Foil: Single-Use Film for a Laser Desorption/Ionization Target Plate », *Analytical Chemistry*, février 2009, vol. 81, no 3, pp. 1177-1183.
- (50) P.A. VAN VEELLEN, U.R. TJADEN, J. VAN DER GREEF, A. INGENDOHN et F. HILLENKAMP, « Off-line coupling of capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 24 septembre 1993, vol. 647, no 2, pp. 367-374.
- (51) Jason S. PAGE, Stanislav S. RUBAKHIN et Jonathan V. SWEEDLER, « Direct cellular assays using off-line capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *The Analyst*, 2000, vol. 125, no 4, pp. 555-562.
- (52) P. A. VAN VEELLEN, C. R. JIMENEZ, K. W. LI, W. P. M. GERAERTS, U. R. TJADEN et J. VAN DER GREEF, « New advanced analytical tools in peptide/protein research: matrix assisted laser desorption mass spectrometry », *Journal of controlled release*, 1994, vol. 29, no 3, pp. 223-229.
- (53) Christian W HUCK, Rania BAKRY, Lukas A HUBER et Günther K BONN, « Progress in capillary electrophoresis coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry », *Electrophoresis*, juin 2006, vol. 27, no 11, pp. 2063-2074.
- (54) Christian W HUCK, Rania BAKRY, Lukas A HUBER et Günther K BONN, « Progress in capillary electrophoresis coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry », *Electrophoresis*, juin 2006, vol. 27, no 11, pp. 2063-2074.

- (55) Linda H. H. SILVERTAND, Javier Sastre TORAÑO, Gerhardus J. DE JONG et Wouter P. VAN BENNEKOM, « Development and characterization of cIEF-MALDI-TOF MS for protein analysis », *ELECTROPHORESIS*, mai 2009, vol. 30, no 10, pp. 1828-1835.
- (56) Noah G. WEISS, Nicole L. ZWICK et Mark A. HAYES, « Capillary isoelectric focusing coupled offline to matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, janvier 2010, vol. 1217, no 1, pp. 179-182.
- (57) Torbjörn JOHNSON, Jonas BERGQUIST, Rolf EKMAN, Eckhard NORDHOFF, Martin SCHÜRENBERG, Klaus-Dieter KLÖPPEL, Martin MÜLLER, Hans LEHRACH et Johan GOBOM, « A CE-MALDI Interface Based on the Use of Prestructured Sample Supports », *Analytical Chemistry*, avril 2001, vol. 73, no 8, pp. 1670-1675.
- (58) Kati HELMJA, Maria BORISSOVA, Tatjana KNJAZEVA, Martin JAANUS, Urmas MUINASMAA, Mihkel KALJURAND et Merike VAHER, « Fraction collection in capillary electrophoresis for various stand-alone mass spectrometers », *Journal of Chromatography A*, avril 2009, vol. 1216, no 17, pp. 3666-3673.
- (59) Michael W. VANNATTA, Colin D. WHITMORE et Norman J. DOVICH, « CE-MALDI interface based on inkjet technology », *ELECTROPHORESIS*, décembre 2009, vol. 30, no 23, pp. 4071-4074.
- (60) H ZHANG et R M CAPRIOLI, « Capillary electrophoresis combined with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; continuous sample deposition on a matrix-precoated membrane target », *Journal of mass spectrometry: JMS*, septembre 1996, vol. 31, no 9, pp. 1039-1046.
- (61) N OJIMA, T SHINGAKI, T YAMAMOTO et T MASUJIMA, « Droplet electrocoupling between capillary electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectroscopy and its application », *Electrophoresis*, octobre 2001, vol. 22, no 16, pp. 3478-3482.
- (62) Hui WEI, Kerstin NOLKRANTZ, David H. POWELL, James H. WOODS, Mei-Chuan KO et Robert T. KENNEDY, « Electrospray sample deposition for matrix-assisted laser desorption/ionization(MALDI) and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry with attomole detection limits », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 juin 2004, vol. 18, no 11, pp. 1193-1200.
- (63) Jean-Marc BUSNEL, Jacques JOSSERAND, Niels LION et Hubert H GIRAULT, « Iontophoretic fraction collection for coupling capillary zone electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Analytical chemistry*, 15 mai 2009, vol. 81, no 10, pp. 3867-3872.

Chapitre 4 : L'analyse protéomique par spectrométrie de masse

1. Introduction

Le terme de protéome définit l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, un compartiment de cellule (membrane par exemple), tissu, organe, ou fluide à un instant donné et dans des conditions données. Ce terme fut introduit par P. Kahn en 1995¹. Le concept d'analyse protéomique définit d'une manière large l'étude d'un protéome aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

Différentes avancées technologiques ont permis le développement de stratégies d'analyse protéomique. Particulièrement, la spectrométrie de masse a considérablement amélioré la qualité des informations générées en analyse protéomique jusqu'à devenir une méthode de référence. Les évolutions techniques des spectromètres de masse mais également l'évolution des méthodes de préparation d'échantillons ont permis également de diversifier les stratégies d'identification des protéines mise en œuvre en analyse protéomique (Figure 24).

- L'analyse protéomique dite « Bottom Up » est historiquement la stratégie d'identification et de caractérisation de protéines à ce jour la plus largement utilisée. Elle consiste à soumettre une digestion protéolytique aux protéines puis d'identifier les peptides formés par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est utilisée pour l'identification des peptides. Une liste de masses correspondant aux peptides est générée puis comparée à une base de données qui aidera à la reconstruction de la séquence protéique pour l'identification de la protéine initiale².

- L'analyse protéomique dite « Top Down » n'est apparue que très récemment dans les laboratoires de recherche. Dans ce type de stratégie, les protéines sont caractérisées par l'intermédiaire de leur masse totale et des fragments générés par la protéine intacte. Le traitement préalable de l'échantillon est volontairement minimisé. Ces dix dernières années, cette stratégie a favorisé le développement d'un grand nombre de systèmes permettant de réaliser du Top Down suivant la nature du couple source d'ionisation/analyseur du spectromètre de masse. Les ions moléculaires issus de la protéine intacte sont obtenus grâce à une source d'ionisation douce MALDI ou ESI. Ils sont fragmentés soit par capture d'électrons (ECD) ou transfert d'électrons (ETD), par dissociation induite par collision (CID), par absorption de multiples photons infrarouges (IRMPD)³, par dissociation induite par laser (LID), ou une dissociation directe dans la source (ISD)^{4,5}.

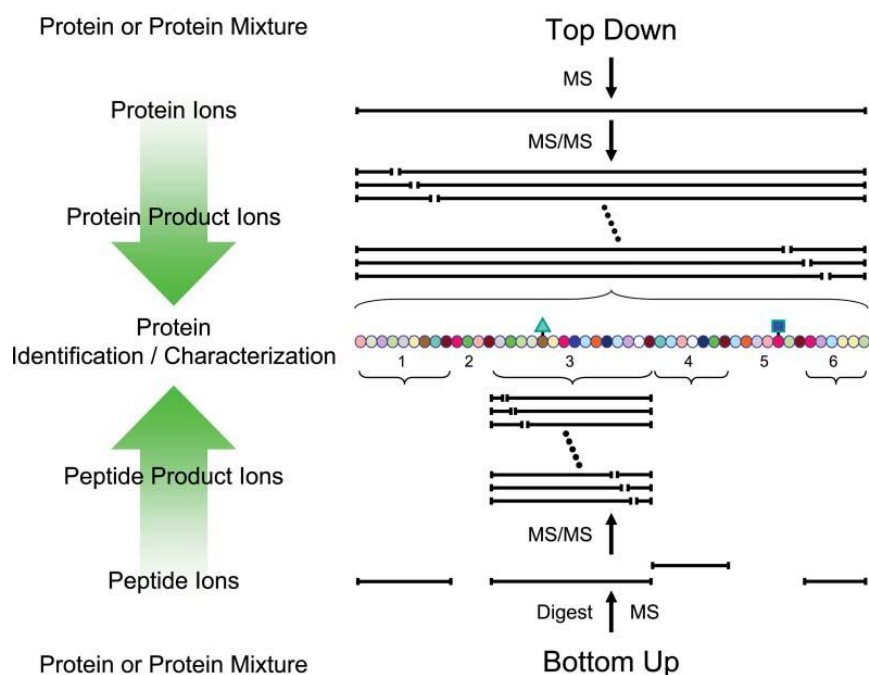


Figure 24. Représentation schématisée des différentes stratégies utilisées en analyse protéomique. Extrait de la publication de Scherperel et al⁶.

2. Spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique

2.1. Fragmentation des peptides

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est basée sur la fragmentation en phase gazeuse des peptides détectés lors de la première analyse MS. La fragmentation des peptides se produit essentiellement au niveau des liaisons amides composant la liaison peptidique. Il est également possible d'observer, de manière marginale, la fragmentation de la chaîne latérale du peptide. Ces ions sont des fragments de deuxième génération ou bien issus de fragmentations de hautes énergies⁷. Il est également commun d'observer la perte de molécules neutres spécifiques durant la fragmentation des peptides : on cite notamment H_2O , NH_3 comme exemple les plus courant.

Roepstoff et Fohlmann ont ainsi établi une nomenclature des fragmentations peptidiques qui fut complétée par Johnson et al à posteriori^{8,9}. On différencie deux types d'ions issus de la fragmentation des peptides en MS/MS (figure 25) :

- Les ions, dont la charge positive, est portée par la partie du peptide comportant l'acide aminé N-terminal : on parle de série a, b, c.
- Les ions, dont la charge positive, est portée par la partie du peptide comportant l'acide aminé C-terminal : on parle de série x, y, z.

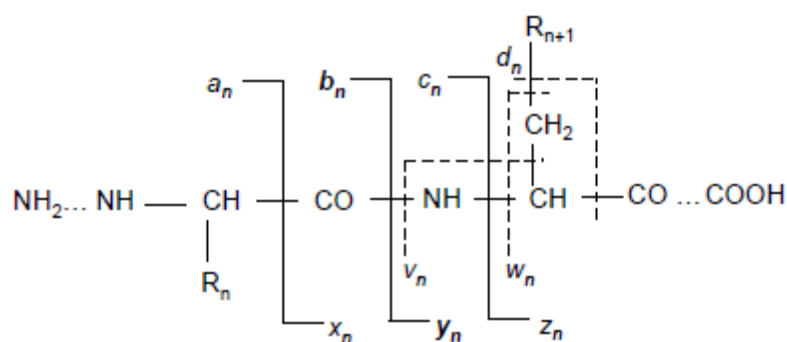


Figure 25. Nomenclature des ions issus de la fragmentation des peptides.

Le type d'ions générés durant la fragmentation est principalement corrélé avec les niveaux d'énergies utilisés, et donc par le type de fragmentation mis en jeu. Les ions y et b sont les plus abondants lors des fragmentations de basses énergies tel que la CID. Les ions issus de la fragmentation de la chaîne latérale du peptide (d, v, w) ne sont obtenus que dans le cadre de fragmentations à hautes énergies.

2.2. Stratégie de l'empreinte peptidique massique

La stratégie d'identification dite de l'empreinte peptidique massique ou peptide mass fingerprinting (PMF) fut introduite simultanément par plusieurs équipes de recherche notamment Yates et al¹⁰, James et al¹¹ ou encore Pappin et al¹².

Dans cette stratégie, les protéines subissent une digestion enzymatique. L'enzyme de loin la plus couramment utilisée étant la trypsine. Le mélange constitué des peptides protéolytiques est ensuite analysé par MS (MALDI-TOF-MS ou bien ESI-MS) afin de déterminer les masses expérimentales des peptides issus de la digestion, ordonnées sous la forme d'une liste. Cette liste de masses expérimentales est comparée aux listes de masses théoriques générées par digestion théorique (in silico) des protéines présentes dans les banques de données. L'identification des protéines est ainsi conditionnée par un certain nombre de critères :

- l'écart entre la mesure du m/z théorique et la mesure expérimentale. La tolérance entre la valeur expérimentale et la valeur théorique est volontairement limitée, notamment en adéquation avec la précision sur la mesure délivrée par l'instrument, afin de limiter la possibilité de faux-positifs.

- Le nombre de peptides identifiés pour une même protéine. L'identification d'une protéine est conditionnée par l'identification de plusieurs peptides correspondant à celle-ci. En effet, l'identification de

plusieurs peptides issus d'une même protéine permet d'améliorer la confiance du résultat en particulier dans le cadre de peptides digérés pouvant correspondre à plusieurs protéines.

- Le recouvrement global de la séquence d'acides aminés. Un recouvrement de séquence élevé justifie ainsi de la confiance au niveau de la protéine identifiée.

Ce type de stratégie nécessite l'utilisation d'outils informatiques adaptés ; ceux-ci prennent la forme de moteur de recherche capable de générer les peptides *in silico* à partir des banques de données et d'effectuer la comparaison avec les données expérimentales. La stratégie PMF possède toutefois un certain nombre de limitations :

- La protéine doit être présente dans les banques de données afin de pouvoir être potentiellement identifiées, ce qui exclue les protéines non séquencées.

- La présence de modification post-traductionnelle (PTM) est généralement inconnue. Ces PTM entraînent le plus souvent des modifications de la masse totale du peptide et donc s'oppose à l'identification des peptides modifiés.

Afin de pallier aux limitations inhérentes à la stratégie PMF et améliorer la confiance des identifications, il est possible de mettre en œuvre des stratégies d'identification mettant à profit la spectrométrie de masse en tandem.

2.3. Stratégie par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

La stratégie d'identification par MS/MS ou peptide fragment fingerprinting (PFF) est dérivée de la stratégie PMF. Il est ainsi nécessaire d'effectuer une digestion protéolytique des protéines contenues dans l'échantillon.

Dans cette stratégie, les ions détectés au cours de l'analyse MS sont isolés et fragmentés à tour de rôle. L'identification des peptides est basée sur la mesure de la masse totale des peptides protéolytiques mais également sur l'identification des fragments de ces peptides obtenus en MS/MS. A partir des données expérimentales, des listes contenant les valeurs des m/z correspondant aux fragments théoriques sont générées pour ensuite être comparées aux données *in silico* générées à partir des banques de données¹³. Ce type de stratégie apparaît donc comme plus fiable que la stratégie PMF puisque l'identification d'un peptide est conditionnée par l'identification d'un maximum de fragments en plus de la masse totale du peptide. L'interrogation des banques de données est également réalisée par l'intermédiaire d'outils informatiques (moteur de recherche notamment) adaptés à ce type d'identification.

L'utilisation de ce type de stratégie d'identification nécessite la mise en œuvre d'instruments adaptés : MALDI-TOF/TOF, ESI-IT, ESI-Orbitrap ou instruments possédant des analyseurs hybrides de masse (Q-TOF par

exemple). En effet, le spectromètre de masse doit alors être capable de réaliser l'analyse MS, la sélection des ions parents, la fragmentation de l'ion sélectionné et l'analyse des m/z des ions fils générés. Ce type d'approche nécessite la mise en place d'une méthode séparative en amont de l'analyse par MS/MS afin d'éviter que la complexité des échantillons n'entraînent des effets de suppression d'ion, diminuant la sensibilité du signal, ou encore pour éviter que le spectromètre de masse n'ait pas le temps de sélectionner l'ensemble des ions pour la fragmentation.

3. Top Down par fragmentation « Ion Source Decay (ISD)».

Entre 1995 et 1996, R.S Brown^{14,15} décrit un phénomène différent de la fragmentation « post source decay (PSD) » en provoquant une fragmentation dans la source : c'est la fragmentation ISD. En effet, la fragmentation ISD se produit après l'étape de désorption/ionisation (<100 ns)¹⁶, lorsqu'une forte puissance laser est appliquée sur le mélange matrice/analytes. Ainsi l'énergie du laser est transférée, augmentant l'énergie interne du mélange. Grâce à l'utilisation d'une matrice redistribuant brusquement l'énergie du laser dite matrice « chaude »^{17,18}, l'augmentation très rapide d'énergie provoque l'augmentation des collisions entre les ions (matrice/analytes). Ces collisions augmentent la probabilité de fragmentation des analytes. La désorption/ionisation/fragmentation se produit dans un laps de temps bien inférieur au délai d'extraction du TOF (<300 ns)¹⁹. Une fois les fragments formés, ils sont accélérés et injectés dans la zone libre de champs du TOF.

3.1 Influence de la matrice

Associée au laser, la matrice est sans doute le paramètre le plus critique pour la qualité du spectre de masse et surtout de la fragmentation²⁰. Des études dans l'article de Calligari et al²¹ ont montré qu'il existe deux voies de fragmentation ISD²² suivant la matrice utilisée (figure 26) :

- La voie radicalaire²³ : elle consiste en un transfert intramoléculaire d'hydrogène de la matrice au carbonyle de la biomolécule. Elle génère majoritairement des ions c_n et z_n .
- La voie thermique²⁴ : elle conduit à la collision des analytes entre eux. Elle génère majoritairement des ions b_n et y_n .

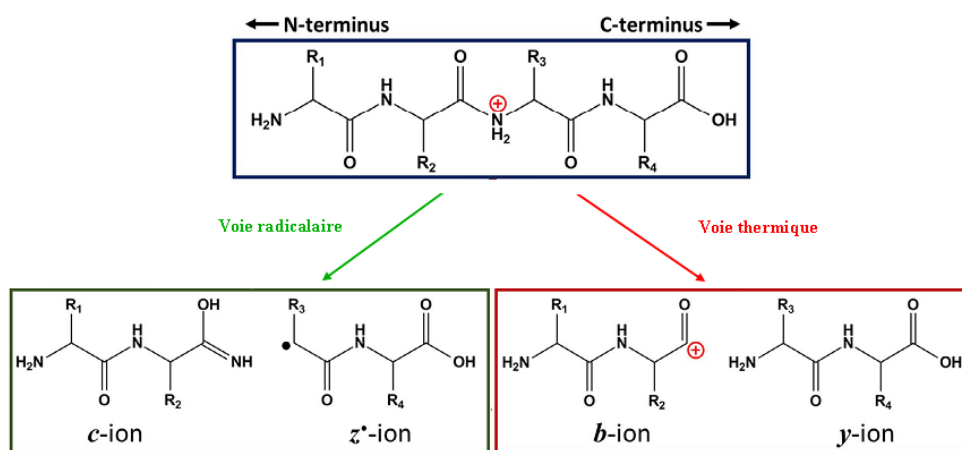


Figure 26. Illustration des ions produits par les deux voies de fragmentation ISD²⁵.

Malgré la singularité des deux voies de fragmentation, la formation des quatre types d'ions n'est pas exclusive aux voies radicalaire et thermique puisqu'une augmentation de la puissance laser peut conduire à la formation en voie radicalaire de séries d'ions b_n , y_n , a_n , et x_n .

Pour exemple, la figure 27 présente les étapes d'une fragmentation de protéines par ISD avec de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) comme matrice. La formation des ions peut être décrite en quatre étapes : l'excitation électronique de la matrice par absorption des photons du laser, le transfert intermoléculaire d'hydrogène de la matrice au carbonyle du peptide, la formation d'un peptide radicalaire et le clivage de la liaison NH-CH pour former des séries d'ions c_n et (z_n+2) ²⁶.

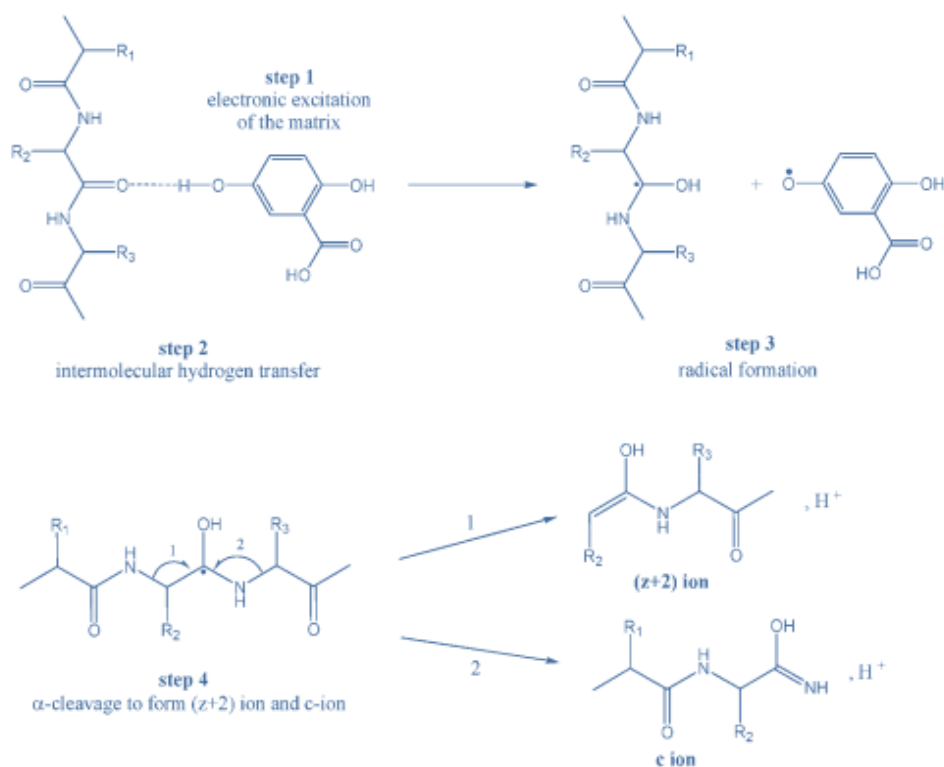


Figure 27. Illustration de la formation d'ions c_n et (z_n+2) par fragmentation ISD²⁷.

3.2. Fragmentation des protéines

La fragmentation ISD conduit au clivage du polypeptide, acide aminé par acide aminé. Cette fragmentation se traduit par une succession de pics sur le spectre de masse (figure 28).

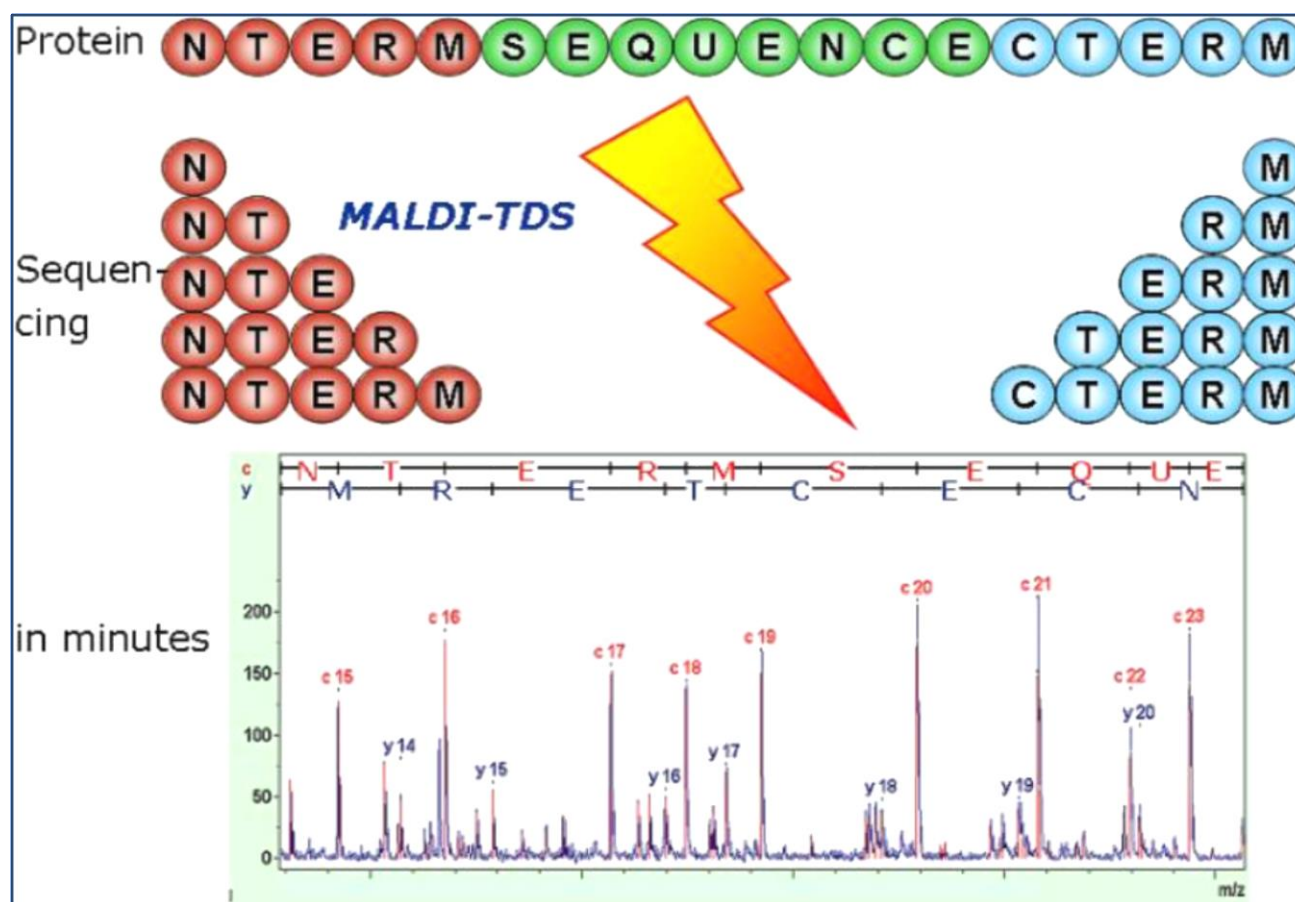


Figure 28. Illustration de la stratégie Top Down par ISD sur une séquence peptidique²⁸.

Ces pics représentent le rapport m/z de la protéine amputée successivement d'un acide aminé. La différence de masse entre chaque pic correspond à l'acide aminé de la séquence protéique.

Statistiquement, la première fragmentation peut s'opérer partout tout au long de la chaîne d'acide aminé. Ainsi, il existe potentiellement dans la source la même protéine clivée à chaque acide aminé. Au fur et mesure du processus ISD, les deux peptides engendrés par la première cassure se cassent à leur tour et ainsi de suite tout au long de la chaîne peptidique.

Lors de l'ISD, on observe surtout une fragmentation commençant par la partie N et C terminale de la protéine. En effet, les extrémités de la protéine sont potentiellement plus faciles à casser. Au fur et à mesure du processus ISD, chaque acide aminé est identifié afin de reconstruire la séquence de la protéine. Actuellement pour des protéines entières, les conditions Top Down par MALDI-MS permettent d'identifier jusqu'à 70 résidus.

Références bibliographiques :

- (1) Patricia KAHN, « From Genome to Proteome: Looking at a Cell's Proteins », *Science*, 20 octobre 1995, vol. 270, no 5235, pp. 369-370.
- (2) John R. YATES, Cristian I. RUSE et Aleksey NAKORCHEVSKY, « Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications », *Annual Review of Biomedical Engineering*, août 2009, vol. 11, no 1, pp. 49-79.
- (3) Daniel P. LITTLE, J. Paul. SPEIR, Michael W. SENKO, Peter B. O'CONNOR et Fred W. MCLAFFERTY, « Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing », *Analytical Chemistry*, septembre 1994, vol. 66, no 18, pp. 2809-2815.
- (4) Neil L. KELLEHER, Hong Y. LIN, Gary A. VALASKOVIC, David J. AASERUD, Einar K. FRIDRIKSSON et Fred W. MCLAFFERTY, « Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry », *Journal of the American Chemical Society*, février 1999, vol. 121, no 4, pp. 806-812.
- (5) Mi Jin XUEMEI HAN, « Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. », *Science (New York, N.Y.)*, 2006, vol. 314, no 5796, pp. 109-12.
- (6) Gwynyth SCHERPEREL et Gavin E. REID, « Emerging methods in proteomics: top-down protein characterization by multistage tandem mass spectrometry », *The Analyst*, 2007, vol. 132, no 6, p. 500.
- (7) Biemann, K., SEQUENCING OF PEPTIDES BY TANDEM MASS-SPECTROMETRY AND HIGH-ENERGY COLLISION-INDUCED DISSOCIATION. *Methods in Enzymology*, 1990. 193: p. 455-479.
- (8) Roepstorff, P. and J. Fohlman, PROPOSAL FOR A COMMON NOMENCLATURE FOR SEQUENCE IONS IN MASS-SPECTRA OF PEPTIDES. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1984. 11(11): p. 601-601.
- (9) Johnson, R.S., et al., Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Analytical Chemistry*, 1987. 59(21): p. 2621-2625.
- (10) Yates, J.R., et al., Peptide Mass Maps: A Highly Informative Approach to Protein Identification. *Analytical Biochemistry*, 1993. 214(2): p. 397-408.
- (11) James, P., et al., Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993. 195(1): p. 58-64.
- (12) Pappin, D.J.C., P. Hojrup, and A.J. Bleasby, Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology*, 1993. 3(6): p. 327-332.
- (13) Yates, J.R., et al., METHOD TO CORRELATE TANDEM MASS-SPECTRA OF MODIFIED PEPTIDES TO AMINO-ACID-SEQUENCES IN THE PROTEIN DATABASE. *Analytical Chemistry*, 1995. 67(8): p. 1426-1436.
- (14) R. S. BROWN et J. J. LENNON, « Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein/peptide ions », *Analytical Chemistry*, 1 novembre 1995, vol. 67, no 21, pp. 3990-3999.
- (15) Robert S. BROWN, Bryan L. CARR et John J. LENNON, « Factors that influence the observed fast fragmentation of peptides in matrix-assisted laser desorption », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, mars 1996, vol. 7, no 3, pp. 225-232.
- (16) Robert S. BROWN, Jinhua FENG et Duane C. REIBER, « Further studies of in-source fragmentation of peptides in matrix-assisted laser desorption-ionization », *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*, décembre 1997, vol. 169-170, no 0, pp. 1-18.300.
- (17) Mahmud HOSSAIN et Patrick A. LIMBACH, « A Comparison of MALDI Matrices », in *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., pp. 215-244.
- (18) Kevin DEMEURE, Loïc QUINTON, Valérie GABELICA et Edwin DE PAUW, « Rational Selection of the Optimum MALDI Matrix for Top-Down Proteomics by In-Source Decay », *Analytical Chemistry*, novembre 2007, vol. 79, no 22, pp. 8678-8685.

- (19) M. L. VESTAL, P. JUHASZ et S. A. MARTIN, « Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1 janvier 1995, vol. 9, no 11, pp. 1044-1050.
- (20) Kevin DEMEURE, Loïc QUINTON, Valérie GABELICA et Edwin DE PAUW, « Rational Selection of the Optimum MALDI Matrix for Top-Down Proteomics by In-Source Decay », op. cit.
- (21) David CALLIGARIS, Claude VILLARD et Daniel LAFITTE, « Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery », *Journal of Proteomics*, 10 juin 2011, vol. 74, no 7, pp. 920-934.
- (22) Kevin DEMEURE, Valérie GABELICA et Edwin Andre DE PAUW, « New advances in the understanding of the in-source decay fragmentation of peptides in MALDI-TOF-MS », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, novembre 2010, vol. 21, no 11, pp. 1906-1917.
- (23) Thomas KÖCHER, Åke ENGSTRÖM et Roman A. ZUBAREV, « Fragmentation of Peptides in MALDI In-Source Decay Mediated by Hydrogen Radicals », *Analytical Chemistry*, janvier 2005, vol. 77, no 1, pp. 172-177.
- (24) Yong Jin BAE, Young Sik SHIN, Jeong Hee MOON et Myung Soo KIM, « Degree of ionization in MALDI of peptides: thermal explanation for the gas-phase ion formation », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, août 2012, vol. 23, no 8, pp. 1326-1335.
- (25) Adam D. CATHERMAN, Owen S. SKINNER et Neil L. KELLEHER, « Top Down proteomics: Facts and perspectives », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, mars 2014, vol. 445, no 4, pp. 683-693.
- (26) Mitsuo TAKAYAMA, « In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, avril 2001, vol. 12, no 4, pp. 420-427.
- (27) Julie HARDOUIN, « Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry », *Mass Spectrometry Reviews*, octobre 2007, vol. 26, no 5, pp. 672-682.
- (28) Anja Resemann DETLEV SUCKAU, « MALDI Top-Down sequencing: calling N- and C-terminal protein sequences with high confidence and speed. », *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 2009, vol. 20, no 5, pp. 258-62.

Chapitre 5 : Les anticorps monoclonaux et les anticorps conjugués

1. Introduction

Les anticorps, ou encore immunoglobulines sont des protéines présentes dans les fluides biologiques ou en tant que récepteurs membranaires à la surface des lymphocytes¹. Ils sont produits par le système immunitaire afin d'identifier et de neutraliser les agents étrangers, appelé antigènes, tel que les virus, bactéries²... Un anticorps est spécifique d'un antigène, la reconnaissance de l'épitope de l'antigène est possible grâce au site complémentaire présent sur l'anticorps appelé paratope. Des études ont ainsi montré qu'un individu produit près de 10 milliards d'anticorps différents, chacun spécifique d'un antigène unique³. Lorsque l'anticorps est en contact avec son antigène associé, il se fixe sur celui-ci afin de faciliter l'élimination de l'agent infectieux par le système immunitaire.

L'utilisation d'anticorps à des fins thérapeutiques a longtemps été limitée par l'absence de méthode de production efficace permettant la production d'anticorps spécifiques à grande échelle mais également la difficulté à identifier un épitope potentiellement d'intérêt. En 1975 Köhler et Milstein décrivirent une méthode permettant de produire en grande quantité un type spécifique d'anticorps prédéfini par hybridation cellulaire entre des cellules de rate de souris et des cellules myéloïdes⁴, ouvrant la voie à la production d'anticorps monoclonaux c'est-à-dire issu d'une unique lignée cellulaire.

Les progrès considérables effectués dans ces domaines ont permis l'introduction depuis environ deux décennies d'anticorps monoclonaux (mAbs) utilisés en tant que traitements thérapeutiques et font que l'emploi de ce type de protéines est aujourd'hui l'un des secteurs de la recherche thérapeutique les plus actifs.

2. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des glycoprotéines de la catégorie des immunoglobulines (Ig), à l'heure actuelle les mAbs produits par l'industrie biopharmaceutique sont essentiellement des immunoglobulines G (IgG). Ils sont composés de deux chaînes lourdes (HC) et deux chaînes légères (LC) identiques. Comme l'illustre la figure 29, chacune des chaînes composant le mAb peut être divisée en deux domaines :

- Une région variable mise en jeu dans la reconnaissance avec l'épitope de l'antigène : VH pour la HC et VL dans le cas de la LC.

- Une région constante, commune à tous les anticorps, impliquée dans la reconnaissance avec le système immunitaire : CH pour la HC et CL dans le cas de la LC.

Les différentes parties variables composant le mAb contiennent des régions dites hypervariables : ces régions (également appelées complementarity determining region, CDR), restreintes et localisées sur la chaîne peptidique sont responsables de la spécificité entre l'épitope et la paratope (Figure 29). Les différentes chaînes sont reliées entre elles par une série de ponts disulfures, ce qui confère à l'anticorps sa flexibilité et lui donne sa forme en Y caractéristique, dont le nombre varie en fonction de la catégorie d'IgG. Les IgG sont divisées en quatre sous-classes en fonction du nombre de pont disulfures liant les deux HC : deux liaisons pour les IgG 1 et IgG 4, quatre liaisons dans le cas des IgG 2 contre quinze pour les IgG 3. Le domaine variable de l'anticorps Fab est situé sur la partie supérieure de la forme en Y tandis que le domaine constant de l'anticorps Fc sur la partie inférieure.

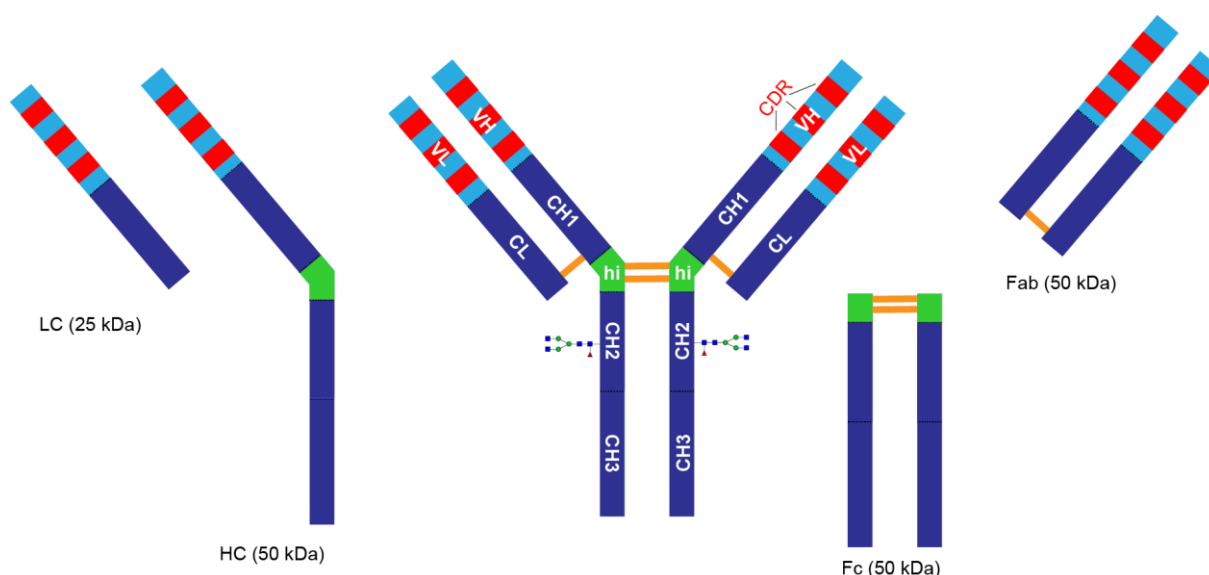


Figure 29. Représentation schématique de la structure d'un mAb et de ces différentes régions. Au centre la structure complète en Y caractéristique des anticorps. Les masses approximatives des différentes régions sont données à titre indicatif.

L'ensemble du mAb a une masse moléculaire proche de 150 kDa. Les mAbs sont des protéines glycosylées. Les glycosylations ne représentent qu'environ 3% de la masse totale du mAb, elles jouent pourtant un rôle important dans leurs propriétés physico-chimiques. La glycosylation des mAbs revêt également un aspect capitale car leur nature influence de manière significative l'activité cytotoxique dépendante des anticorps (antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity, ADCC) et l'activité cytotoxique par l'intermédiaire du complément (complement dependent cytotoxicity, CDC)^{5,6}. Les glycosylations portées par les mAbs actuellement utilisés comme traitements thérapeutiques sont variables au sein même d'une population de mAbs

produit par un unique système d'expression : celles-ci sont généralement de type glycosylations complexes ou de manière plus marginale de type mannoside. Les glycosylations fucosylés sont les plus abondantes mais il est commun de détecter faiblement la présence de glycosylations non fucosylés.

La nomenclature utilisée pour nommer les mAbs traduit directement la technologie utilisée pour produire le dit anticorps : le type de mAb produit (murin, chimérique ou humain) ou encore l'origine de l'anticorps sélectionné (Figure 30).

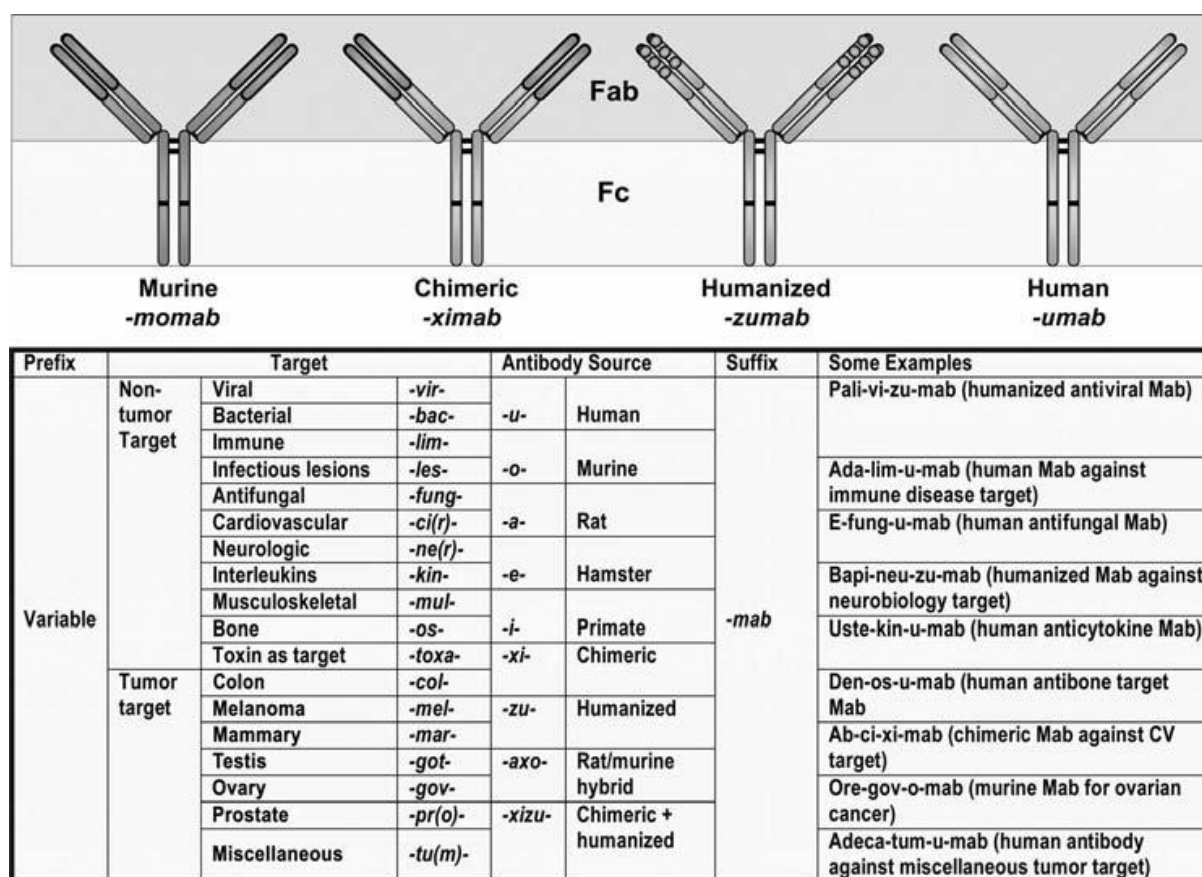


Figure 30. Nomenclature utilisée pour nommer les mAbs.

3. Traitement thérapeutique à bases de mAbs

Le premier mAb approuvé en tant que traitement thérapeutique fut muromomab-CD3 en 1986. Celui-ci fut introduit afin de prévenir les risques de rejet dans les cas de greffes du rein. A l'heure actuelle 43 mAbs sont approuvés en tant que traitements thérapeutiques par les différentes autorités compétentes de par le monde ; la Food & Drug administration (FDA) aux USA et l'European Medicines Agency (EMA) pour l'UE sont en pointe dans ce domaine⁷, tandis qu'environ 30 sont actuellement en phase 3 d'essais cliniques⁸.

Les domaines d'applications thérapeutiques des mAbs se sont largement diversifiés depuis, leur utilisation pour le traitement de plusieurs formes de cancer a notamment permis d'augmenter de manière significative la chance de réussite du traitement. Les mAbs sont ainsi utilisés dans le traitement de certaines formes de cancer du sein (trastuzumab), cancer colorectal (cetuximab) ou cancer de l'estomac (Ramucirumab). Ils sont également employés dans le traitement d'autres pathologies :

- Polyarthrite rhumatoïde
- Maladies cardio-vasculaire
- Leucémies
- lymphome non hodgkinien
- dégénérescence maculaire
- Asthme
- Maladie de Crohn
- Sclérose
- Maladie d'Alzheimer
- Psoriasis

Le succès des mAbs en tant que traitement thérapeutique s'explique par leur grande spécificité permettant de cibler sélectivement un type de cellules par exemple par l'intermédiaire de la reconnaissance d'un épitope spécifique. Les mAbs possèdent également des propriétés pharmacocinétiques (PK) ou pharmacodynamiques (PD) favorables aux traitements thérapeutiques. Ainsi les mAbs sont à l'heure actuelle la classe d'agents thérapeutiques qui enregistre la progression la plus rapide. De plus lors de l'entrée en phase clinique I, le taux de réussite final pour l'approbation d'un nouveau mAb est de 23%⁷ alors que le taux de réussite globale toutes molécules confondues est de 10,4%⁹.

4. Les anticorps conjugués

Les anticorps conjugués (ADCs) sont des composés dérivés des mAbs. La structure d'un ADC est basée sur l'association covalente d'un mAbs et d'une molécule chimique cytotoxique via un bras chimique appelé « linker ». Les ADCs combinent le fort potentiel anti tumoral des médicaments hautement cytotoxiques, aux propriétés de fortes sélectivités, stabilités et de profil pharmacocinétiques des mAbs. La conjugaison covalente d'un mAbs et d'une drogue mettant en jeu un linker est un concept qui a été décrit dans les années 1960 sur un modèle animal. En 1980, les premiers essais cliniques avec des ADCs issus d'immunoglobuline G de souris ont été conduits¹⁰. Le premier ADC (gemtuzumab ozogamicin) développé par le groupe du Prof. Wyeth en 2000 et qui a obtenu l'approbation de l'agence américaine FDA, a été utilisé dans le traitement de patients atteints d'une leucémie myéloïde aiguë (Figure 31.a). Cependant, lors d'une étude post-approbation, cet ADC combiné

à une chimiothérapie n'a pas montré un apport positif au niveau du taux de survivant et à même démontré une augmentation du taux de mortalité par rapport à l'application seule de chimiothérapies. Ces résultats ont poussé la société Pfizer à retirer volontairement cet ADC du marché en 2010¹¹.

En 2011 et 2013, une seconde génération d'ADCs a été approuvée avec le brentuximab vedotin (développé par Seattle Genetics)^{12,13} et le trastuzumab emtansine (développé par Roche)¹⁴. Ces ADCs ciblent les cancers de l'antigène CD30 (aussi connu TNFRSF8) et du récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2) respectivement (Figure 31.b et Figure 31.c). Ils sont, à ce jour, les seuls ADCs approuvés à la fois par la FDA et par l'agence européenne du médicament (EMA).

Depuis 2013, le champ d'application des ADCs est devenu très dynamique. Plus de 30 ADCs sont entrés dans un développement clinique (tous pour une application dans le domaine de l'oncologie) et il y a actuellement plus de 60 ADCs en essais cliniques¹⁵.

Concernant les drogues liées aux mAbs, les deux tiers des ADCs actuellement en essais cliniques sont seulement basés sur deux familles d'agents antimitotique : les auristatines et les maytansinoïdes¹⁶. Ceci indique la très forte difficulté à identifier les molécules cytotoxiques qui remplissent les nombreux critères (parfois contradictoire) permettant une bonne combinaison avec un mAbs. Ces critères comprennent un niveau élevé de cytotoxicité, une hydrophilie relative¹⁷ et un linker chimique approprié pour 'manipuler' la fixation de la drogue sur le mAbs¹⁸. Cependant, pour surmonter la résistance aux médicaments actuels, il existe un besoin constant de nouvelles drogues qui ont différents mécanismes d'action.

L'optimisation du linker est un paramètre important pour le bon développement des ADCs. Le linker doit être stable lorsque l'ADC circule dans le sang pour limiter la toxicité du composé hors cible, mais il doit permettre la libération du médicament une fois qu'il se trouve en contact des cellules cancéreuses ciblées. Plusieurs études récentes sur des analyses métaboliques et pharmacocinétiques ont montré que la stabilité dans le sang des ADCs de seconde génération était limitée¹⁹. De nombreux ADCs de secondes générations, actuellement en développement clinique, sont développés à partir d'un linker de type maléimide et montre des phénomènes de déconjugaison dans le sérum, qui implique une forte cytotoxicité hors-cible. Ce phénomène a particulièrement été observé dans le cas des conjuguations sur les lysines et les cystéines¹⁹.

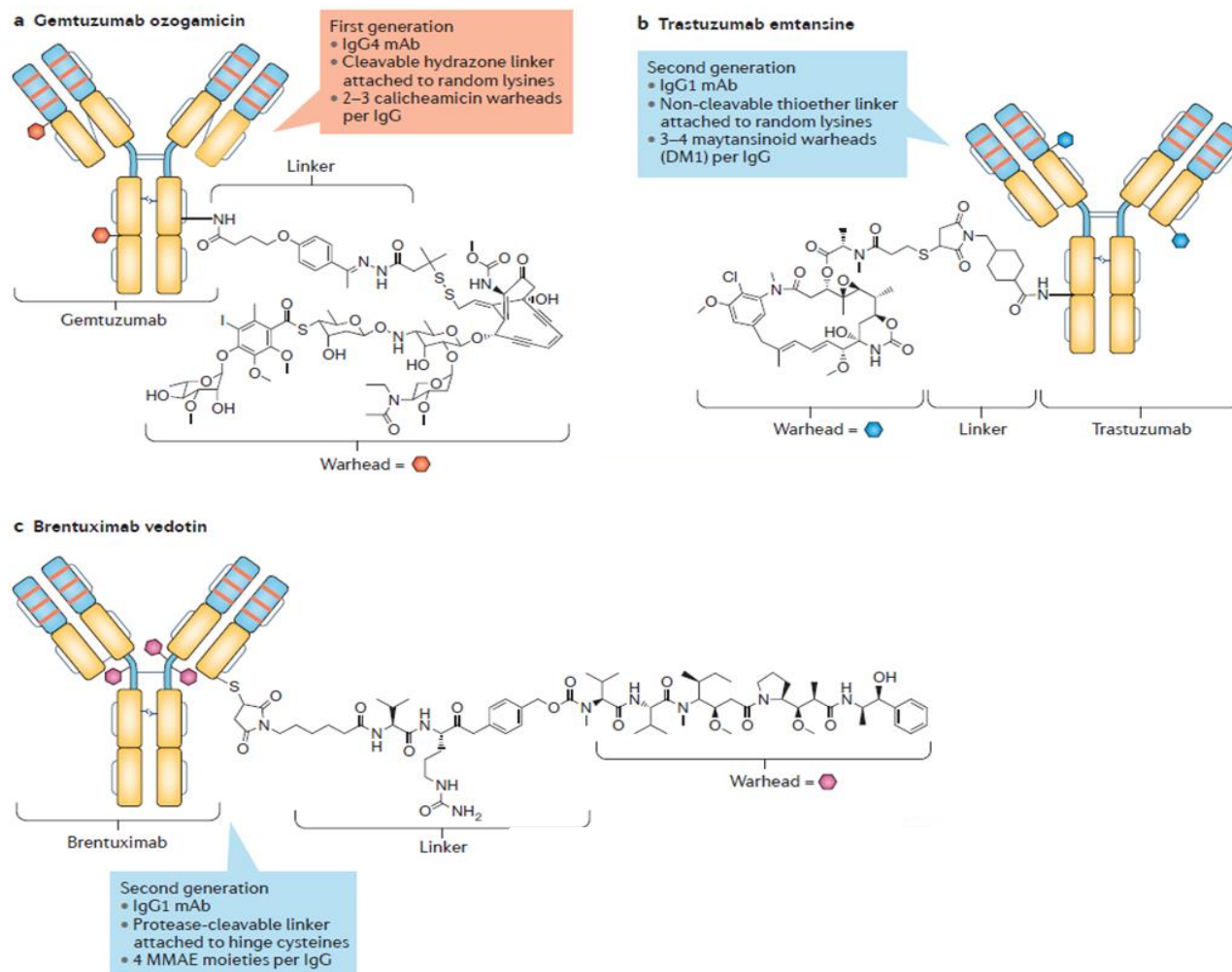


Figure 31. Structures des ADCs de première et deuxième génération. a gemtuzumab ozogamicin b trastuzumab emtansine c brentuximab vedotin²⁰

5. Caractérisation des mAbs et des ADCs par CE-MS

En accord avec mes encadrants de thèse, nous avons décidé d'extraire, pour ce paragraphe, la partie sur la caractérisation des protéines thérapeutique par CE-MS de la revue publiée par le LSMIS dans l'issue spéciale du *Journal of Chromatography B* « Analytical characterization of biopharmaceuticals » intitulée :

“Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of mono-clonal antibodies and related products”

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

5.1 Amino acid sequence characterization and peptide mapping

Although produced using highly accurate recombinant technologies, mAbs amino acid requires to be characterized to ensure the safety of the product and prevent the occurrence of amino acid substitution due to variation during the production or storage process for example. Biacchi et al described the development of an offline CZE-MALDI-MS system allowing the automatic deposition of the CZE outlet directly of the MALDI plate followed by matrix deposition. The CZE-MALDI-MS method developed was used to perform the peptide mapping of trastuzumab showing sequence coverage of 92% and 100% respectively for the heavy chain (HC) and the light chain (LC)²¹. Peptide mapping can also be performed using CZE-ESI-MS, Gennaro et al showed the analysis of Lys-C digest for several mAbs, in combination with LC-MS analysis, to characterize completely the amino acid sequences of the studied mAbs demonstrating the interest of using in concomitance the selectivity of both techniques because of their complementarity²². Whitmore et al used a sheathless CE-ESI-MS analysis to perform the peptide mapping of therapeutic mAbs through tryptic digestion. Results obtained were compared to the peptide mapping results observed using LC-MS and sheath-liquid CZE-ESI-MS. Results reported demonstrate the possibility to obtain the complete sequence coverage using sheathless CZE-ESI-MS. Data generated showed the characteristics of CZE to separate short hydrophilic peptides (down to single amino acids) which tend to be difficult to identify in LC-MS experiments because of their elution in void volume²³. Gahoual et al developed a methodology implementing sheathless CZE-ESI-MS/MS for the characterization of several mAbs including trastuzumab and cetuximab. This method relies on an optimized sample preparation protocol enhancing digestion efficiency and improving sample compatibility with the CZE separation conditions. This method integrates tandem MS to base peptide identification on mass measurement in parallel with fragmentation spectra reinforcing the confidence of the identification and giving precious information regarding the amino acid sequence. Results described proved from a single injection corresponding to 16 ng of digested mAbs to systematically obtained 100% sequence coverage considering strictly peptides without miscleavages²⁴. Also data allowed to characterize simultaneously to the amino acid sequence, different type of post-translational modifications hotspots including glycosylation, N-terminal glutamic acid cyclization, methionine oxidation, asparagine deamidation and aspartic isomerization. Results showed in the case of PTMs characterization, the possibility to separate the modified peptides from its intact homologous due to the separation selectivity of CZE therefore improving sensitivity and enabling confident estimation of modification levels by preventing the occurrence of ion suppression^{25,26}. Similar results were reported by Lew and coworkers attesting the transferability of this methodology²⁷. This CZE-ESI-MS/MS method was applied in the context of biosimilarity assessment. CZE-ESI-MS/MS data from approved mAbs trastuzumab and cetuximab were compared to their respective biosimilar candidates. Results reported the ability in a single injection of each sample to characterize a difference of a single amino acid between trastuzumab and the corresponding

biosimilar candidate. Using the same datasets, every PTMs hotspots reported for these mAbs could be successfully characterized and relative modification levels could be compared²⁸. Recent research demonstrates the relevance of using CZE-ESI-MS analysis to characterize the amino acid sequence of mAbs. CZE selectivity proved to be of interest especially by allowing the separation and successful transfer to the MS of every single peptide generated from tryptic digestion regardless of their chemical structure enabling complete sequence coverage in a robust manner. Results reported using CZE-ESI-MS/MS allow to position this method not solely as a routine analysis to confirm recombinant mAbs production but also as a powerful tool which could improve R&D pipeline by providing comprehensive data regarding the amino acid sequence and post-translational modifications.

5.2 Glycosylation characterization

Glycosylation is one of the major critical quality attribute (CQA) of therapeutic mAbs. Glycosylation can influence different properties of mAbs including solubility, half-life and pharmacokinetic (PK) which are crucial considering their use as therapeutic treatments. Gennaro et al reported the separation and analysis of glycopeptides isolated from Lys-C digest using CZE-ESI-MS. In the same research article, they described the use of CZE-ESI-MS to analyze APTS labeled released glycan in negative ionization mode. Results showed successful characterization of the major N-glycosylations and six O-glycosylation sites with the possibility in some cases to evaluate the site occupancy. Later on the same group reported the development of a method using PVA coated capillary equipped on a CZE-LIF/ESI-MS instrument for the analysis of APTS labeled glycans released from mAbs samples. They demonstrated that the suitability of this method to characterize released glycan as 10 different glycoforms could be identified for the studied mAbs including afucosylated glycans and some containing sialic acid²⁹. Bunz et al recently described the development of a CZE-ESI-MS method using a basic BGE to perform the analysis of released glycans either for charged native glycans as well as APTS labeled glycans in the same experiment. They were able to identify 15 different glycosylations obtained after released from a therapeutic antibody sample showing the relevance of the method to ease characterization of unknown glycosylation. They studied the influence of APTS labeling on ionization intensity determining that labeling decreases by 3 times signal intensity³⁰. In parallel, Bunz and coworkers developed another CZE-ESI-MS employing an acidic BGE. They performed a systematic and quite complete study of the different parameters of the method to determine the parameter influencing significantly glycan separation and proposed optimized conditions. Data obtained from mAbs tryptic digest by Gahoual and coworkers using sheathless CE-ESI-MS/MS were also used to characterize glycosylations. By using fragmentation spectra of tryptic glycopeptides, they could locate the position of each glycosylation sites and perform site dependent characterization integrated in the same experiment as the amino acid sequence characterization. MS/MS spectra recorded allowed to characterize the structure of the different glycosylation identified and intensities enabled estimation of relative

abundance of each glycoform. The same group applied this methodology in the context of biosimilarity assessment and demonstrated the possibility to distinguish faint differences in glycosylation profiles^{38,31}.

5.3 Middle-up analysis

Middle-up characterization is performed by submitting therapeutic mAbs sample to limited digestion prior to analysis. This methodology is meeting recently a growing interest because it gives the opportunity to focus investigation on specific parts of the protein, Fab part or Fc part for example, while limiting the complexity which may arise from the heterogeneity of the rest of the protein. Development of middle-up analysis has been made possible by the introduction of proteolytic enzymes particularly specific for IgG such as streptococcal endopeptidase IdeS³². Limited digestion has also the advantage of not requiring to complete proteolytic digestion which may induce endogenous modifications of the mAbs during the analysis process³³. Due to the absence of stationary phase and the electrophoretic mobilization of analytes during the separation, CE is a technique particularly suitable for the separation of fragments generated from limited digestion of mAbs. Similarly to CZE-UV, one of the major issues for middle-up and intact protein analysis is on the possible protein adsorption on the inner capillary wall due to non-protonated silanol groups remaining. As previously described different approaches were described to reduce protein adsorption (dynamic or permanent coating). Concerning MS detection, permanent coatings as HPC or LPA are preferred. Indeed, to avoid regeneration step and possible release which can compromise the compatibility with MS detection, permanent coating, consisting to covalent linkage to the capillary wall, appears to be the best option.

Based on offline CZE-MALDI/ESI-MS instrumentation implemented, Biacchi et al could demonstrated the separation of the different type of fragments generated consequently from IdeS digestion of cetuximab using HPC capillary. Therefore they were able to characterize independently the N-glycosylation sites present respectively on the Fc and Fd part of the mAb. Identification of 8 glycoforms for Fc fragments and 6 glycoforms for Fd fragments could be achieved. Additionally, described results showed in the case of Fc fragments the complete separation on lysine variant species³⁴. Furthermore using a similar approach, they could demonstrate the formation of dimers due to the IdeS digestion which revealed to be stable enough to be conserved when the analysis was performed in native conditions³⁵. Data recently published from Zhao et al showed the development of a CZE-ESI-MS method applied to the analysis of reduced mAbs. They demonstrated using this method the possibility to separate the HC and the LC. In addition they could successfully identified a mixture composed of several reduced mAbs³⁶. The CZE-ESI-MS method developed by Han and coworkers was used to perform a detailed middle-up characterization of a therapeutic IgG1 using different sample treatment. Data presented proved the separation of the HC and the LC when the sample was undergoing reduction. During the analysis of IdeS digests, the developed method exhibited the separation of the

different fragments generated from the limited digestion with the possibility to distinguish lysine variants. In addition, the same method was applied to analyze mAbs stability samples treated with IdeS followed by reduction. Results obtained for sample experiencing deamidation demonstrated the separation of the Fd fragment bearing a succinimide intermediate on the asparagine of interest therefore revealing the potential of CZE-ESI-MS for the middle-up characterization of therapeutic mAbs³⁷.

5.4 Intact analysis

In depth MS analysis of intact mAbs remains one of the major challenge in the context of analytical characterization of therapeutic mAbs and their related products. CE appears as a technique with significant potential for the characterization of intact mAbs in concomitance with MS due to its separation principle enabling migration of intact proteins. Implementation of CZE-MALDI-MS method developed by Biacchi et al emphasized the possibility to separate intact charge variants of trastuzumab followed by MS identification. Regarding CZE-ESI-MS, Han and coworkers detailed a method for the analysis of intact IgG1. Using PNGase F treated samples, they demonstrated the separation and successful identification of free LC contained in IgG1 reference material³⁷. Another research of interest was reported by Redman et al. They described the preparation of a microchip CZE-nanoESI-MS system enabling the analysis of intact infliximab and showed that lysine variants could be separated and characterized. In addition the system was applied to a IgG1 drug conjugate, their findings proved the possibility to distinguish non conjugated species as well as mono and di-conjugated IgG³⁸. Recently, the same research group used this microchip interface for the characterization of intact ADCs. Results reported show the separation of the charge variants generated from N-terminal pyroglutamic acid formation and decarboxylation for the unconjugated mAb. Additionally, ADC analysis demonstrated the separation of species exhibiting different number of conjugated drugs and the ability to determine antibody-drug ratio (DAR) values in agreement to with ESI-MS infusion and imaging CE analysis³⁹. The introduction of ADCs is adding a layer of complexity, compared to conventional mAbs, regarding analytical characterization. To address the complexity originating from these modified proteins, Said and coworkers developed an analytical methodology combining ADCs analysis on the intact, middle-up and amino acid sequence level⁴⁰. This methodology, alongside to comprehensive peptide backbone characterization, enables to determine the different species generated from the conjugation reaction and locate the position of the drug on the amino acid sequence. From a general point of view, characterization of intact mAbs and their related format using CE-MS analysis is currently generating great expectations therefore driving research into intensive development which may presage the introduction of innovative application in the near future.

Références bibliographiques :

- (1) Von Behring, E. and S. Kitasato, [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890]. *Molecular immunology*, 1991. 28(12): p. 1317, 1319-20.
- (2) Tiselius, A. and E.A. Kabat, AN ELECTROPHORETIC STUDY OF IMMUNE SERA AND PURIFIED ANTIBODY PREPARATIONS. *The Journal of Experimental Medicine*, 1939. 69(1): p. 119-131.
- (3) Fanning, L.J., A.M. Connor, and G.E. Wu, Development of the immunoglobulin repertoire. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1996. 79(1): p. 1-14.
- (4) Kohler, G. and C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975. 256(5517): p. 495-497.
- (5) Dalziel, M., et al., Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science*, 2014. 343(6166).
- (6) Jefferis, R., Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2009. 30(7): p. 356-362.
- (7) Reichert, J.M., Antibodies to watch in 2014: Mid-year update. *mAbs*, 2014. 6(4): p. 799-802.
- (8) Beck, A., et al., Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(5): p. 345-352.
- (9) Hay, M., et al., Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotech*, 2014. 32(1): p. 40-51.143
- (10) Perez, H. L. et al. Antibody–drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discov. Today* 19, 869–881 (2014).
- (11) Beck, A. et al. The next generation of antibody–drug conjugates comes of age. *Discov. Med.* 10, 329–339 (2010).
- (12) Senter, P. D. & Sievers, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat. Biotechnol.* 30, 631–637 (2012).
- (13) Younes, A., Yasothan, U. & Kirkpatrick, P. Brentuximab vedotin. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 19–20 (2012).
- (14) Lambert, J. M. & Chari, R. V. Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1): an antibody–drug conjugate (ADC) for HER2–positive breast cancer. *J. Med. Chem.* 57, 6949–6964 (2014).
- (15) Mullard, A. Maturing antibody–drug conjugate pipeline hits 30. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 329–332 (2013).
- (16) Beck, A. & Reichert, J. M. Antibody–drug conjugates: present and future. *mAbs* 6, 15–17 (2014).
- (17) Salomon, P. L. & Singh, R. Sensitive ELISA method for the measurement of catabolites of antibody–drug conjugates (ADCs) in target cancer cells. *Mol. Pharm.* 12, 1752–1761 (2015).
- (18) Verma, V. A. et al. The cryptophycins as potent payloads for antibody drug conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 864–868 (2015).
- (19) Dere, R. et al. PK assays for antibody–drug conjugates: case study with ado-trastuzumab emtansine. *Bioanalysis* 5, 1025–1040 (2013).
- (20) Alain Beck¹, Liliane Goetsch¹, Charles Dumontet^{2–4} and Nathalie Corvaia Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates, *Nature Reviews Drug Discovery* (2017) online
- (21) M. Biacchi, R. Bhajun, N. Saïd, A. Beck, Y.N. François, E. Leize-Wagner, Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface, *Electrophoresis* 35 (2014) 2986-2995.
- (22) L.A. Gennaro, O. Salas-Solano, S. Ma, Capillary electrophoresis–mass spectrometry as a characterization tool for therapeutic proteins, *Anal. Biochem.* 355 (2006) 249-258.
- (23) C.D. Whitmore, L.A. Gennaro, Capillary electrophoresis-mass spectrometry methods for tryptic peptide mapping of therapeutic antibodies, *Electrophoresis* 33 (2012) 1550-1556.
- (24) R. Gahoual, A. Burr, J.M. Busnel, L. Kuhn, P. Hammann, A. Beck, Y.N. Francois, E. Leize-Wagner, Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 5 (2013) 479-490.

- (25) R. Gahoual, J.-M. Busnel, A. Beck, Y.-N. François, E. Leize-Wagner, Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9074-9081.
- (26) R. Gahoual, A. Beck, Y.N. Francois, E. Leize-Wagner, Independent highly sensitive characterization of asparagine deamidation and aspartic acid isomerization by sheathless CZE-ESI-MS/MS, *J. Mass Spectrom.* 51 (2016) 150-158.
- (27) C. Lew, J.-L. Gallegos-Perez, B. Fonslow, M. Lies, A. Guttman, Rapid Level-3 Characterization of Therapeutic Antibodies by Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J. Chrom. Sci.* 53 (2015) 443-449.
- (28) R. Gahoual, M. Biacchi, J. Chicher, L. Kuhn, P. Hammann, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.N. Francois, Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 6 (2014) 1464-1473.
- (29) L.A. Gennaro, O. Salas-Solano, On-line CE-LIF-MS technology for the direct characterization of N-linked glycans from therapeutic antibodies, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3838-3845.
- (30) S.C. Bunz, F. Cutillo, C. Neususs, Analysis of native and APTS-labeled N-glycans by capillary electrophoresis/time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 8277-8284.
- (31) R. Gahoual, M. Biacchi, J.M. Busnel, A. Beck, Y.F. Francois, E. Leize-Wagner, Comprehensive Multilevel Characterization of Biologics Using Sheathless Capillary Electrophoresis Hyphenated to tandem Mass Spectrometry, *LC GC N. Am.* 13 (2015) 8-15.
- (32) B. Vincents, U. von Pawel-Rammingen, L. Bjorck, M. Abrahamson, Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding, *Biochemistry*, 43 (2004) 15540-15549.
- (33) G. Chevreux, N. Tilly, N. Bihoreau, Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 212-214.
- (34) M. Biacchi, R. Gahoual, N. Said, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6240-6250.
- (35) Y.-N. François, M. Biacchi, N. Said, C. Renard, A. Beck, R. Gahoual, E. Leize-Wagner, Characterization of Cetuximab Fc/2 aggregates by Off-line CZE-MS, *Anal. Chim. Acta* 908 (2016) 168-176.
- (36) Y. Zhao, L. Sun, M.D. Knierman, N.J. Dovichi, Fast separation and analysis of reduced monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry, *Talanta* 148 (2016) 529-533.
- (37) M. Han, B.M. Rock, J.T. Pearson, D.A. Rock, Intact Mass Analysis of Monoclonal Antibodies by Capillary Electrophoresis—Mass Spectrometry, *J. Chrom. B* 1011 (2016) 24-32.
- (38) 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, *Analy. Chem.* 87 (2015) 2264-2272.
- (39) E.A. Redman, J.S. Mellors, J.A. Starkey, J.M. Ramsey, Characterization of Intact Antibody Drug Conjugate Variants Using Microfluidic Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2220-2226.
- (40) N. Said, R. Gahoual, L. Kuhn, A. Beck, Y.-N. François, E. Leize-Wagner, Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis – Tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method, *Anal. Chim. Acta* 918 (2016) 50-59.

PARTIE 2 : Résultats

Caractérisation d'anticorps monoclonaux par approche middle-up et top-down à l'aide du couplage indirect CE-MS

Chapitre 1 : Séparation et caractérisation de glycoformes de Cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS

Chapitre 2 : Caractérisation de dimères de fragments Fc/2 de cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS

Chapitre 3 : Approche middle-down pour la caractérisation de fragments Fc/2 de cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS

Chapitre 4 : Séparation des variants de charge du cetuximab par CE-ESI-MS

Chapitre 1 : Séparation et caractérisation de glycoformes de Cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS

1. Introduction

Depuis 1986 et l'approbation du murumonab-CD3 par l'administration de régulation des aliments et des médicaments américaine (FDA), les anticorps monoclonaux (mAbs) représentent la classe de molécule dont le développement est en constante croissance dans l'industrie pharmaceutique. Les mAbs sont des glycoprotéines complexes potentiellement porteuses de nombreuses micro-hétérogénéités moléculaires dont les sources sont variées (procédés de production inadaptée, conservation prolongée). La complexité de ces protéines et leur utilisation en tant que traitement thérapeutique justifient la nécessité d'améliorer les méthodologies analytiques de caractérisation, ceci de manière à obtenir une caractérisation rapide et précise de ce type de molécules. La spectrométrie de masse (MS) a su rapidement s'imposer comme une méthode de choix pour la caractérisation des mAbs, notamment en raison de son excellente spécificité, sensibilité mais aussi car elle permet d'obtenir des informations structurales dans certains cas. La MS peut ainsi être utilisée dans le développement de nouveaux mAbs ou encore pour suivre différents lots d'un mAb afin de distinguer des différences mineures. L'enjeu dans un tel contexte est de fournir rapidement des informations structurales permettant en amont d'orienter les activités de R&D (optimisation du procédé de production, élimination d'un candidat non satisfaisant) et de production (libération de lots). Les méthodes analytiques utilisées doivent ainsi être capables de couvrir un large champ de la structure des mAbs : séquence d'acides aminés, glycosylation, modifications post-traductionnelles (PTMs), ponts disulfures. Concernant plus particulièrement les glycosylations qui sont connue pour être une classe de modification importante pouvant impacter les propriétés immunogéniques des mAbs, leur caractérisation est réalisée suivant différentes stratégies tel que la mesure de masse intacte, l'analyse middle-up des différents domaines des mAbs ou l'analyse protéomique. Cependant, aujourd'hui, aucune séparation de glycoformes de mAbs n'a encore été décrite à l'aide du couplage de référence LC-MS. L'électrophorèse de zone (CZE) a montré un réel intérêt pour la caractérisation de mAbs. De plus, cette méthode apparaît comme une méthode puissante pour la séparation de protéines entières. Cette technique mise en place avec une détection optique (UV, Fluorescence) est méthode de référence dans les laboratoires de R&D et de qualité-contrôle des industries biopharmaceutiques. Cependant, due à la présence de sels en forte concentration et à la non-volatilité des électrolytes support (BGE) nécessaire pour séparer des variants de charges de mAbs, le développement du couplage de la CZE avec la MS est très limité. En effet, les conditions

décrites dans la littérature permettant la séparation de mAbs intacts en CZE-UV mettent en jeu une forte concentration d'acide ϵ -aminocaproïque ainsi que certains additifs (Triéthylentetramine, Tween 20). Malgré la qualité des séparations obtenues, ces BGE ne sont en aucun cas compatibles avec une détection directe en ESI-MS.

Nous avons donc développé une stratégie pour réaliser un couplage CZE-UV/ESI-MS basée sur l'utilisation de du robot CZE-UV/collection de fraction, précédemment développé au laboratoire, suivi d'une infusion des différentes fractions par CESI-MS utilisé en tant que plateforme nanoESI. Dans le but de minimiser les phénomènes d'adsorption de protéines à la surface interne du capillaire et de réduire le flux électroosmotique (EOF), un greffage hydroxypropylcellulose (HPC) a été réalisé. L'un des objectifs de cette étude a été de rendre le BGE compatible avec la détection ESI-MS. Pour cela, des conditions asymétriques mettant en jeu différents BGE aux extrémités du capillaire ont été développées. Le BGE à l'entrée du capillaire composé de 200 mM d'acide ϵ -aminocaproïque et de 25 mM d'acétate d'ammonium pH 5,70, permet de conserver les performances de la séparation électrophorétique alors que le BGE à la sortie du capillaire composé de 25 mM d'acétate d'ammonium pH 5,70, permet une bonne compatibilité avec la détection ESI-MS. Le mAb étudié est le cetuximab qui est un IgG1 chimérique de type humain/souris principalement utilisé dans le traitement du cancer colorectal. Le cetuximab a pour particularité de contenir deux sites de glycosylation réparties sur la chaîne lourde (HC) : un localisé sur le domaine Fc/2 (Asn299) et le second localisé sur le domaine F(ab')₂ (Asn88). Cela représente un échantillon de choix pour notre étude qui permettra de caractériser ces deux domaines séparément à l'aide d'une stratégie middle-up par digestion IdeS sans réduction. Les performances de notre stratégie seront évaluées sur la caractérisation et la séparation des variants de masses dus à la perte d'une lysine en C-terminal de la HC et sur les variants de charges de glycoformes du cetuximab.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le journal scientifique Analytical Chemistry (ACS Publications 2015).

2. Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-line CZE-UV/ESI-MS

Michael Biacchi, Rabah Gahoual, Nassur Said, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis Nicolas François. *Analytical Chemistry* 2015, 87(12), 6240-6250.

2.1. Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) are highly complex glycoproteins that present a wide range of microheterogeneities that requires multiple analytical methods for full structure assessment and quality control. Capillary zone electrophoresis-Mass spectrometry couplings (CZE-MS), especially by Electrospray (ESI), appear really attractive methods for the characterization of biological samples. However, due to the presence of non- or medium volatile salts in the background electrolyte (BGE), online CZE-ESI-MS coupling is difficult to implement for mAbs isoforms separation. Here we report an original strategy to perform off-line CZE-ESI-MS using CZE-UV/fraction collection technology to performed CZE separation, followed by ESI-MS infusion of the different fractions using CESI interface as nanoESI infusion platform. As the aim is to conserve electrophoretic resolution and complete compatibility with ESI-MS without sample treatment, Hydroxypropylcellulose (HPC) coated capillary was used to prevent analyte adsorption and assymetric CZE conditions involving different BGE at both ends of capillary have been developed. The efficiency of our strategy was validated with the separation of cetuximab charge variant by middle-up approach. Molecular weights were measured for six charge variants detected in the CZE separation of cetuximab subunits. The three first peaks correspond to Fc/2 variants with electrophoretic resolution up to 2.10 and the last three peaks correspond to F(ab')₂ variants with average electrophoretic resolution of 1.05. Two Fc/2 C-terminal lysine variants were identified and separated. Moreover separation of Fc/2 fragments allowed the glycoprofiling of the variants with the characterization of 7 different glycoforms. Regarding F(ab')₂ domain, 8 glycoforms were detected and separated in three different peaks following the presence of N-glycolyl neuraminic acid residues in some glycan structure. This work highlights the potential of CZE technology to perform separation of mAbs especially when they carry sialic acid carbohydrates.

2.2. Introduction

Since 1986 and the approbation of muromonab-CD3 by the US Food and Drug Administration (FDA), monoclonal antibodies (mAbs) have taken a major market share in the pharmaceutical industry and their development is constantly increasing [1,2]. MABs are highly complex glycoproteins potentially displaying many naturally-occurring molecular micro-heterogeneities [3,4]. Patents protecting the first generation blockbuster mAbs will expire in the next 5 years, giving the opportunity to many companies to produce “biogeneric versions”. These copies are referred as biosimilars. Biosimilarity assessment includes extensive physicochemical characterization likewise pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) study, performed in a comprehensive manner. Analytical high similarity is the most robust scientific basis for comparing independently sourced biologics [5]. As different structural heterogeneities emerged from comparison of a biosimilar candidate with the reference molecule, more complementary studies should be performed in order to demonstrate the absence of toxicological and negative clinical outcome [6].

As a consequence, there is a continuous need for improvement of analytical methods to enable fast and accurate characterization. Mass spectrometry (MS) generally coupled with separation methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC), plays a key role in the characterization of therapeutic mAbs [7]. Many levels of characterization are performed following different strategies as intact molecular weight (MW) measurement, top-down, middle-up and bottom-up approaches [7-9]. Concerning glycosylation variants which is known as an important class of modification that can significantly impact the immunogenic properties of mAbs [10], intact MW, middle-up on domain level, as well as bottom-up techniques were also performed [11-14]. However, at this point, no separation of mAbs glycoforms was obtained by HPLC-MS with intact MW or a middle-up approach [15-17]. As an alternative to HPLC, capillary zone electrophoresis (CZE) has been demonstrated to be an useful and powerful separation method for the characterization of intact proteins [18,19]. CZE and related methods using optical detections were fully established at all stages of mAbs discovery. However, due to the presence of high concentration of non-volatile salts in the background electrolyte (BGE) necessary for mAbs variants separation, development of CZE coupled with MS detection have been limited. Recently we published several research papers on bottom-up characterization of mAbs and biosimilars highlighting the potential of CZE-ESI-MS to obtain full primary structure and microvariant characterization as well as biosimilarity assessment [12-14]. However, in bottom-up approach, BGE is totally compatible with ESI-MS, whereas for an intact MW or a middle-up approach, BGE involves high concentration in non-volatile salt or detergent which preclude the use of ESI-MS [20-22]. To our knowledge, some groups defined CZE-UV conditions for the separation of intact mAbs involving always high levels of ϵ -amino-caproic acid (EACA) and the addition of triethylenetetramine (TETA) or Tween 20 [23-27]. Despite very interesting results in the separation of charge variants, BGEs are totally incompatible with ESI-MS [28]. In 2014, we developed the first analysis of intact

mAb charge variant by CZE using a matrix-assisted laser desorption/ionization-MS (MALDI) detection [29-31]. Unfortunately, limitation of MALDI-MS resolution does not allow to measure the exact mass of the charge variants. More recently, Redman et al published an important paper on the first characterization of intact mAb variants using microfluidic CZE-ESI devices [28].

In this work, we developed a strategy to perform off-line CZE-UV/ESI-MS with the use of CZE-UV/fraction collection technology to perform CZE separation, followed by ESI-MS infusion of the different fractions using CESI interface as nanoESI platform. Hydroxypropylcellulose (HPC) coating was used to minimize analyte adsorption on the capillary wall and reduce electroosmotic mobility (EOF). As one of the aim is to be compatible with ESI-MS, assymetric CZE conditions bringing into play different BGE at the ends of capillary have been developed. Inlet BGE composed of EACA 200 mM and ammonium acetate 25 mM, pH 5.70, allowed to conserve performance of CZE separation while outlet BGE composed only of ammonium acetate 25 mM allowed to be compatible with ESI-MS. Based on the work of Gahoual et al we used CESI interface as nanoESI infusion platform allowed us to generated stable spray at 100 nL/min with sample consumption of 2 μ L per fraction avoiding dilution effect [32]. The mAb selected was cetuximab which is human/murine chimeric IgG-1 directed against the epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpressed in advanced-stage EGFR positive colorectal cancer [33]. Cetuximab was approved in the US and EU in 2004 and 2005, respectively and will be off-patent soon. Cetuximab contains two sites of glycosylation on the HC: one is located in the Fc/2 domain (Asn299) and the second is located in the F(ab')₂ domain on Asn88 [7] (Figure 1). It is an ideal sample for the evaluation of our strategy by middle-up approach. Indeed, cetuximab subunits characterization allowed to locate and to identify glycoforms. The performance of our strategy is demonstrated by the characterization of C-terminal lysine variants and the first separation of glycoforms of cetuximab subunits using CZE-UV off-line hyphenated to ESI-MS after fraction collection.

2.3. Experimentals Section

2.3.1. Materials. Methanol (HPLC gradient grade) and acetic acid (100%) were obtained from VWR (Radnor, PA, USA). Ammonium acetate (>98%), sodium hydroxide, ϵ -Amino-caproic acid (>98%), hydroxypropylcellulose Mw 100000 (HPC) and formic acid (>98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). IdeS (Immunoglobulin-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*) also named FabRICATOR was purchased from Genovis (Lund, Sweden). Cetuximab (Erbix[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) is a sterile, preservative-free solution for intravenous infusion containing 5 mg/mL of cetuximab. The other ingredients are sodium chloride, glycine, polysorbate 80, citric acid monohydrate, sodium hydroxide and water for injections.

2.3.2. Middle-up sample preparation. Cetuximab was cleaved in the hinge region using limited proteolysis by IdeS (FabriCATOR, Genovis) to obtain two Fc/2 fragments (calculated pI 7.74) and one F(ab')₂ fragment (calculated pI 7.78) (Figure 1). Sample was diluted using 147.25  L of 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 6.60, to a final concentration of 1   g/  L. A volume of 2.25   L of IdeS (67 units/  L) was added to the sample which was left at 37  C for 30 min. After digestion completion, sample was desalted using Amicon centrifugal filters (cut off = 10,000 Da) in pure water at 10  C and 14,000 g for 20 min. After desalted step, sample volume was reduced to around 10   L. Sample was finally diluted to an assumed final concentration of 5   g/  L in a total volume of 30   L of pure water.

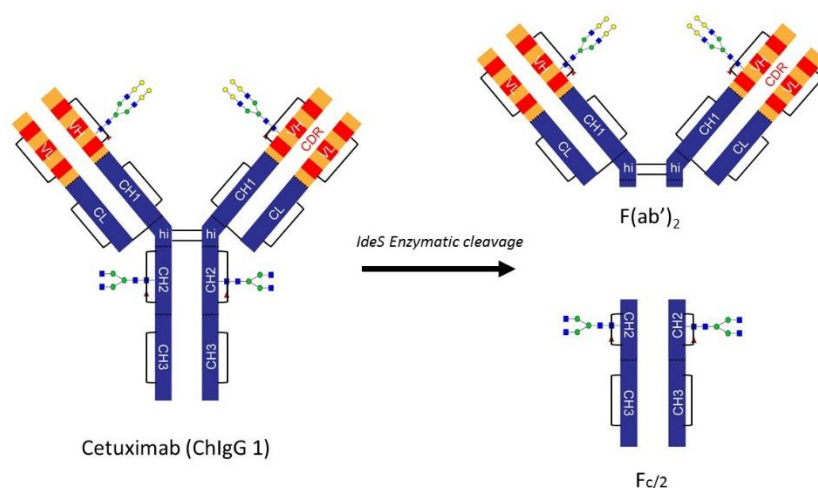


Figure 1. Schematic representation IdeS enzymatic cleavage of cetuximab. Cetuximab is a chimeric IgG: human amino acids are high-lighted in blue (constant domains), murine amino acids in orange (frameworks) and in red (the complementary determining region)

2.3.3. Capillary electrophoresis. The CZE experiments were carried out on a P/ACE MDQTM CE system from Sciex Separation (Brea, CA) equipped with a UV detection, a temperature controlled autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. A 32 KaratTM 8.0 (Sciex Separation, Brea, CA) was used for instrument control, data acquisition and data handling. Polymicro bare fused-silica capillaries of 75   m i.d., 375 o.d. (75.5 cm effective length, 82 cm total length) were obtained from Photonlines (St-Germain-en-Laye, France). New capillaries were conditioned by successive flushes with 1.00 M and 0.10 M NaOH and then with water under a pressure of 30 psi for 10 min each. The temperature in the capillary cartridge and autosampler were set at 25   C. The acquisition rate was 10 points / s. Capillaries were rinsed with water and dried by air when not in use. UV absorbance fixed at 200 nm. Voltage applied at 20 kV with a ramp of 0.17 and injection sample condition was 0.5 psi for 50s. Concerning modified capillaries, capillaries were coated in laboratory with hydroxypropylcellulose Mw 100000 (HPC) following the protocol described by Shen et al [34]. 5% HPC in pure water (w/v) was prepared to perform capillary coating. Durability of coating is around 20 runs without recoating step. For Cetuximab separation, inlet BGE 200 mM   -Amino-caproic acid (EACA)-ammonium

acetate 25 mM pH 5.70 and outlet BGE ammonium acetate 25 mM pH 5.70 have been used as separation condition. Injection volumes have been calculated using CEToolbox application (Pansanel, GooglePlay).

2.3.4. CZE/Collection Fraction Interface. This interface is describe in a previous study [31]. Briefly, automated off-line coupling of CZE to MS was performed by using a homemade modified automatic spotting device Proteineer FC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for the sheath flow-assisted spotting from the CZE capillary end onto a fraction collection target. The original set up of the UV cell in the P/ACE MDQTM (Sciex Separation, Brea, CA) was modified in order to allow the simultaneous UV detection and fraction collection. Hystar 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used for Proteineer FC control.

2.3.5. CESI as nanoESI infusion platform. The infusion experiments were carried out with a PA 800 plus capillary electrophoresis (CE) system from Sciex Separation (Brea, CA) equipped with a temperature controlled autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. Prototype fused-silica capillaries (total length 95 cm; 30 μ m i.d.) whose outlet end (about 3 cm) was etched with hydrofluoric acid were used for all related CESI experiments and initially provided by Sciex Separation (Brea, CA, USA). It is certainly noteworthy to precise here that the inner lumen of these capillaries is not tapered and presents an i.d. of 30 μ m throughout its entire length. New capillaries were initially conditioned by flushing them for 10 min with MeOH, 10 min with 0.10 M sodium hydroxide, 10 min with 0.10 M hydrochloric acid and finally with water for 20 min each flushing step being conducted at 75 psi (5.17 bar).

2.3.6. MALDI-TOF-MS. The matrix was prepared by dissolving 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (2g/L) in 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile (TFA/ACN) (30/70)(v/v). Fraction collection was realized using Ground Steel MALDI target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Mass spectra of the CZE fractions were recorded using an Autoflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), operating in reflector mode and with FlexControl software. Positively charged ions were detected and sums of 1500 single-shot spectra were acquired automatically from each sample by using the AutoXecute software. Data processing was performed with FlexAnalysis 3.0 provided by the mass spectrometer manufacturer. All spectra were calibrated according an external calibration using Protein calibration standard I (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for intact protein separation.

2.3.7. ESI-TOF-MS. For sheathless CZE-ESI-MS experiments the CE system was coupled to a maxis 4G (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). MS transfer parameters were optimized using the actual sample directly infused via the CE system using a pressure of 5 psi (340 mbar). MS parameters were optimized so that high m/z ions could be properly transferred to the TOF analyzer while avoiding fragmentation. In the case of the maxis 4G, ion funnels were set at values of 300 Vpp and 400 Vpp. The electrospray voltage (capillary voltage) was typically ranging from -1.2 to -1.8 kV. Dry gas was set at 1.5 L/min and source temperature at 180 C. Data processing was performed with DataAnalysis 4.0. Deconvolution of the mass spectra was performed based on maximum entropy analysis using ESI Compass 1.3 Maximum Entropy Deconvolution Option in DataAnalysis

4.0. All spectra were calibrated by external calibration using Pepmix (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and CsI from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

2.4. Results and discussions

2.4.1. Optimization of CZE separation conditions

As the aim is to develop a procedure for the middle-up characterization of cetuximab using the potential of CZE separation method and suitable for ESI-MS direct infusion, we have optimized BGEs as mixtures of components that facilitate isoforms separation and allow the use of ESI ionization process. First we based our research on the study developed by the group of Pr. Somsen on the glycoform profiling of interferon- β -1a and erythropoietin [19]. However, using condition based on HPC coated capillary and 50 mM acid BGE, no separation of cetuximab isoforms had been obtained. To our knowledge, some groups defined CZE-UV conditions for the separation of intact mAbs involving always high levels of EACA and the addition of TETA or Tween 20 [23-27]. EACA is a zwitterion which can be used to create high ionic strength and low conductivity buffers that minimize the electroosmotic flow (EOF) and improve electrophoretic mobility differences. TETA and Tween 20 behave as a modifier in BGE for dynamic coating to reduce prevent analyte adsorption in the capillary wall [35-37]. Despite very interesting results in the separation of charge variants due to the presence of these modifiers, the major issue of these BGE conditions is the incompatibility with ESI-MS detection. The first step of our optimization consisted to eliminate Tween 20 and TETA of the BGE. Indeed, following the results described by Gassner *et al*, we minimize analyte adsorption only by the use of a HPC coating [25]. This allows to remove the use of additional detergent or oligoamine, and it additionally presents the advantage of being a static coating that avoid potential polymer release for ESI-MS infusion. In a previous work, we demonstrated the high repeatability and the good robustness obtained with HPC-coated capillary for the separation of intact mAbs (RSD<0.5%, migration time) [31]. The second step of our BGE screening concerned the use of high level of EACA. He *et al* demonstrated the influence of pH and EACA concentration on the mAb separation [23]. Concerning EACA concentration, they demonstrated that increasing EACA concentration may improve separation efficiency and electrophoretic resolution. However, due to zwitterionic properties, EACA based BGE involve significant interference with the sample in the ionization process of ESI-MS. Despite this, the presence of EACA in the BGE remains essential to maintain the separation efficiency particularly due to the low conductivity. Based on the results of Ruesch's team [23] and some difficulties of matrix/sample crystallization for MALDI-MS experiment observed in previous study, we decided to reduce the EACA concentration from 400 mM to 200 mM and to add ammonium acetate at a pH of 5.70. Ammonium acetate is usually employed with ESI-MS mainly for volatility properties of the ammonium ion and good compatibility with the process of ionization. To perform separation we used our homemade CZE-UV/fraction

collection described in a previous work [31]. BGEs are placed in the inlet and outlet vials of the CE apparatus. Due to the modification of CE cartridge, outlet BGE has been used as sheath liquid with a flow rate of 0.5µL/min. Fraction collection was directly deposit on a target plate. Each peak is collected on the basis of its apparent mobility described by the equation:

$$\mu_{app} = \frac{Ll}{t_m V}$$

with μ_{app} the apparent mobility which is the sum of effective mobility and residual EOF, L and l the total capillary length and length to detection window, respectively, V the applied voltage and t_m the migration time. Deposition time t_d is then calculated by the equation:

$$t_d = \frac{L^2}{\mu_{app} V}$$

The results presented Figure 2 show the CZE-UV separation of cetuximab IdeS fragments (Figure 1) with different BGEs at pH 5.70 composed by the mixture of EACA 200 mM and various concentration of ammonium acetate from 5 mM to 50 mM. Electropherograms presented Figure 2 show a drastic decrease of electrophoretic resolution with lowest concentration of ammonium acetate until complete loss of separation with 5 mM ammonium acetate (electropherogram A). These results confirm the trend in loss of electrophoretic resolution with the decrease of the ionic strength. Electropherogram D corresponding to BGE composed by EACA 200 mM ammonium acetate 50 mM pH 5.70, show the best separation with electrophoretic resolution up to 1.63 for peak 1-3 corresponding to Fc/2 variants and an average electrophoretic resolution of 1.02 for peak 4-6 corresponding to F(ab')₂ variants.

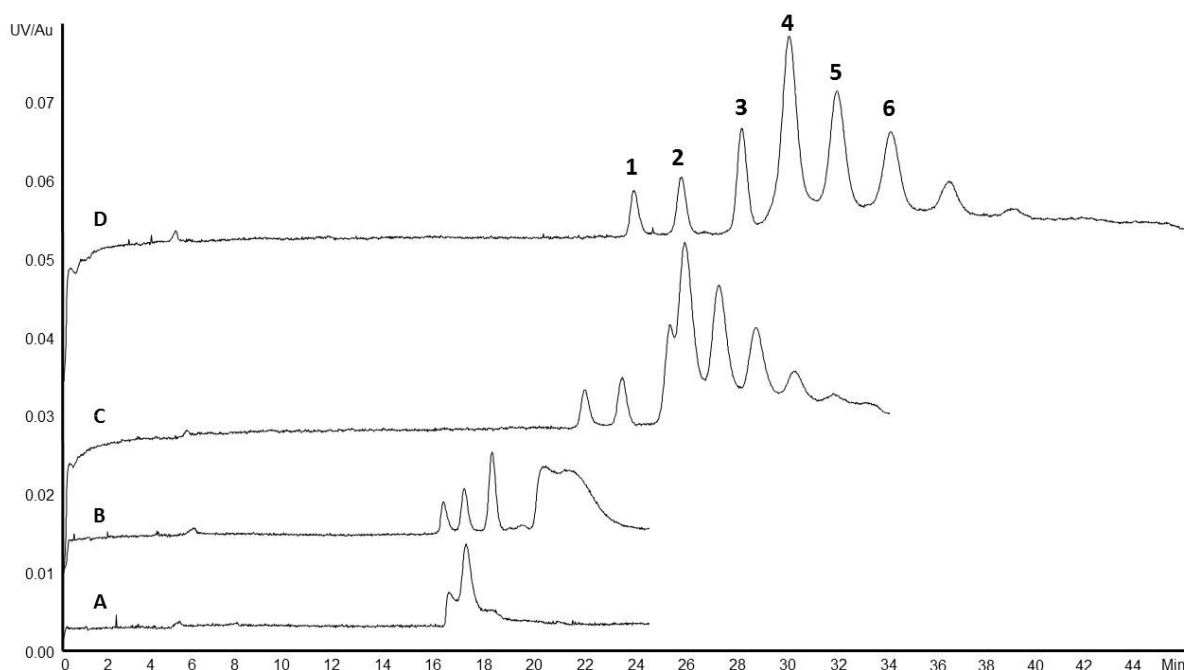


Figure 2. Impact of ammonium acetate concentration in BGE on electrophoretic resolution. BGE composed by a mixture of EACA 200 mM and acetate ammonium (A) 5 mM, (B) 10 mM, (C) 25 mM and (D) 50 mM, at pH 5.70. Peak 1-3 correspond to Fc/2 variants and peak 4-6 correspond to F(ab')₂ variants. Experimental conditions: HPC-coated capillary, total/effective length 82/75.5 cm x 75 µm i.d.; voltage, 20 kV; UV absorbance at 200 nm; sample, IdeS digest of cetuximab (5 µg/µL); sample injection 0.5 psi 50s.

However, outlet BGE which plays the role of sheath liquid is composed of 200 mM EACA which can compromise the ESI-MS ionization process. Indeed, to verify the impact of the presence of EACA in the BGE, we perform MALDI-MS mass spectra of the different fractions corresponding to the six major peaks. No signals were observed by MALDI-MS because of the lack of crystallization of the sample with the DHB matrix (Figure S-1 part A). Presence of EACA in the BGE gives white homogenous deposit totally different of the spangled classical one. MALDI-MS detection failure and the experimental ESI-MS infusion of fraction 3 without any MS signal (data not shown) allows us to conclude that direct ESI-MS infusion is completely impossible in these conditions.

Based on the CZE-ESI-MS sheath liquid interface described by the group of Smith [38], and the fact that additional liquid is usually different of BGE composition, we decided to develop asymmetric conditions between the inlet BGE and the outlet BGE. As the aim of the study is to conserve the electrophoretic resolution of the separation, to allow ESI-MS detection and to avoid the Joule heating effect, inlet BGE has been chosen as EACA 200 mM and ammonium acetate 25 mM pH 5.70. A different BGE, placed in the outlet vial, is composed only with ammonium acetate at pH 5.70.

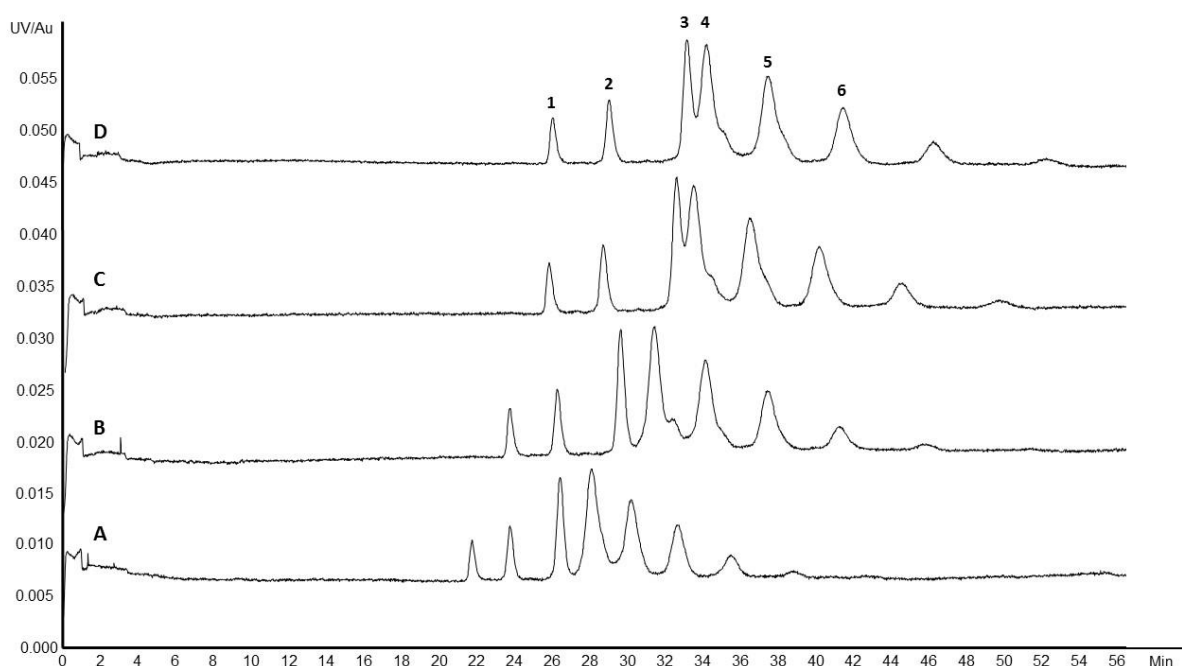


Figure 3. Impact of ammonium acetate concentration in outlet BGE on electrophoretic resolution. Inlet BGE composed by a mixture of EACA 200 mM and acetate ammonium 25 mM pH 5.70 and outlet BGE by ammonium acetate (A) 12.5 mM, (B) 25 mM, (C) 50 mM and (D) 100 mM, at pH 5.70. Peak 1-3 correspond to Fc/2 variants and peak 4-6 correspond to F(ab')₂ variants. Experimental conditions: HPC-coated capillary, total/effective length 82/75.5 cm x 75 µm i.d.; voltage, 20 kV; UV absorbance at 200 nm; sample injection 0.5 psi 50s.

To optimize the separation, different concentration of ammonium acetate from 12.5 to 100 mM have been tested as outlet BGE. Results are presented in Figure 3. Electropherogram C and D show a loss of

electrophoretic resolution between peak 3 and peak 4 corresponding to the last peak of Fc/2 variants and the first peak of F(ab')₂ variants. Electropherogram B corresponding to outlet BGE composed by ammonium acetate 25mM pH 5.70, show the best separation with electrophoretic resolution up to 2.10 for peak 1-3 corresponding to Fc/2 variants and an average electrophoretic resolution of 1.05 for peak 4-6 corresponding to F(ab')₂ variants. These results show no loss of electrophoretic resolution using electropherogram B conditions as compared to the Figure 2 experiments. This demonstrates that the presence of high concentration of EACA in the outlet BGE is not necessary to achieve the separation. As the aim was to verify the impact of the absence of EACA in the outlet BGE, we performed a MALDI-MS detection of the different fractions corresponding to the six major peaks. First of all, we observed a good crystallization of sample with DHB matrix (Figure S-1 part B) which confirms no contamination of EACA during deposit process. Figure 4 emphasizes mass spectrum of each peak. Moreover, the CZE-MALDI-MS (Fig. 4b) confirms the good agreement between the UV detection and the deposition time in terms of Fc/2 and F(ab')₂ separation.

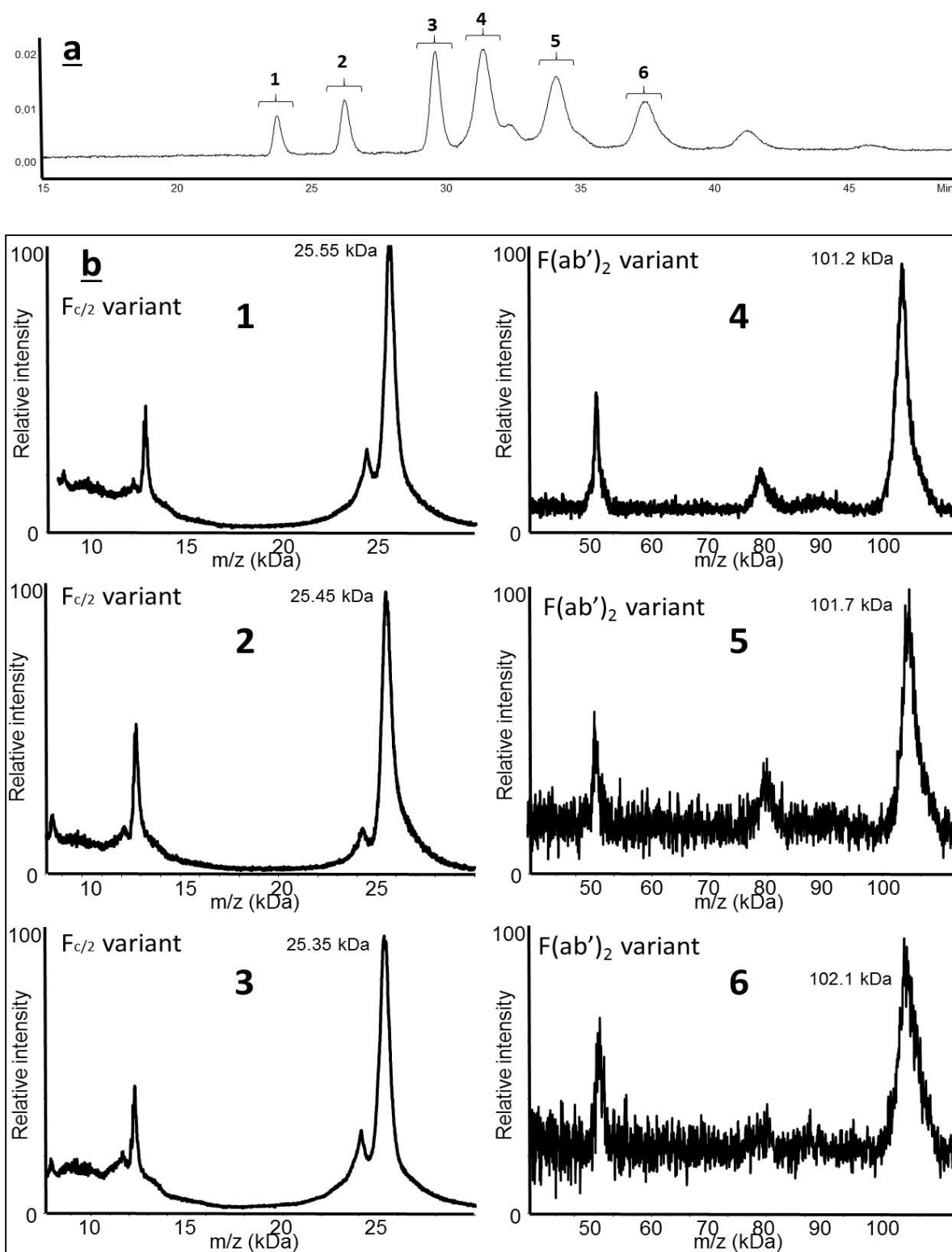


Figure 4. CZE-UV off-line coupled to MALDI-MS via fractionation for a middle-up characterization of Cetuximab charge variants. (a) CZE-UV electropherogram. (b) Analysis of CZE-UV fractions by MALDI-MS. Mass spectra of the six major peaks. CE Experimental conditions: Inlet BGE: EACA 200 mM acetate ammonium 25 mM pH 5.70 and outlet BGE: ammonium acetate 25 mM pH 5.70; other conditions: See Figure 2, MS Experimental conditions: See Experimental section; sample, IdeS digest of cetuximab (5 µg/µL); sample injection 0.5 psi 50s.

This also confirms the absence of carryover effect and diffusion phenomenon. Unfortunately, limitation of MALDI-MS resolution for molecules up to 20 kDa does not allow to measure the exact mass of the charge

variants and then to characterize thoroughly these glycoproteins. Thus, to reach higher MS resolution at comparable separation efficiency, we switched to ESI-MS detection using CESI as nanoESI infusion platform. This strategy of collection fraction followed by nanoESI infusion opens the way for a deeper characterization of Fc/2 and F(ab')₂ domains without sample treatment and with minimum sample volume (2 µL).

2.4.2. Middle-up characterization of cetuximab

Cetuximab is a chimeric mouse-human IgG1 known to bear 2 N-glycosylation sites on each heavy chain (HC) [11]. Moreover, cetuximab has a large number of microheterogeneities such as PTMs including methionine oxidation, asparagine deamidation or isomerization of aspartic acid. Furthermore, this mAb also has one C-terminal lysine truncation. These features make cetuximab an ideal sample for the evaluation of a middle-up approach using CE-MS coupling. In order to simplify the location of N-glycosylation, IdeS enzymatic reaction (Figure 1) cleaves cetuximab in the middle of HC to obtain two types of fragments each carrying one N-glycosylation site. Direct ESI-MS infusion of IdeS fragments of cetuximab proved equal signal abundances for C-terminal lysine variants which involves two distinct profiles for the Fc/2 domains, and a complex glycoprofiling for the F(ab')₂ domain (Figure S-2). With this knowledge, we can expect to observe few peaks corresponding to Fc/2 fragments due to a loss of a +1 charge associated with C-terminal lysine truncation. In addition, we also expect few peaks for F(ab')₂ fragments because of the ability of CZE to resolve glycoforms with acidic glycans, due to a reduction in net charge by addition of negatively charged sialic acid compound. Preliminary MALDI-MS results presented in Figure 4 confirmed these predictions with peak 1-3 corresponding to Fc/2 fragments and at least peak 4-6 corresponding to F(ab')₂ fragments.

To enhance MS resolution, the same experiment was performed to collect fractions of each peaks and to analyze them by nanoESI-MS using CESI interface as infusion platform. After deposition, each fraction was collected and evaporated. No special treatment was made on collected fractions. Before infusion, dry samples were reconstituted in 2µL of 50%/49%/1%, acetonitrile/water/formic acid (v/v/v) in order to enhance sample ionization. Thus, each fraction was infused into the MS using a flow rate of 100 nL/min in order to enhance sensitivity. The total volume of sample infused to perform one acquisition was about 600 nL which represents a 100 times reduction in terms of sample consumption as compared to standard ESI-MS. This point is critical as the volume of each fraction does not expect few µL to avoid dilution effect.

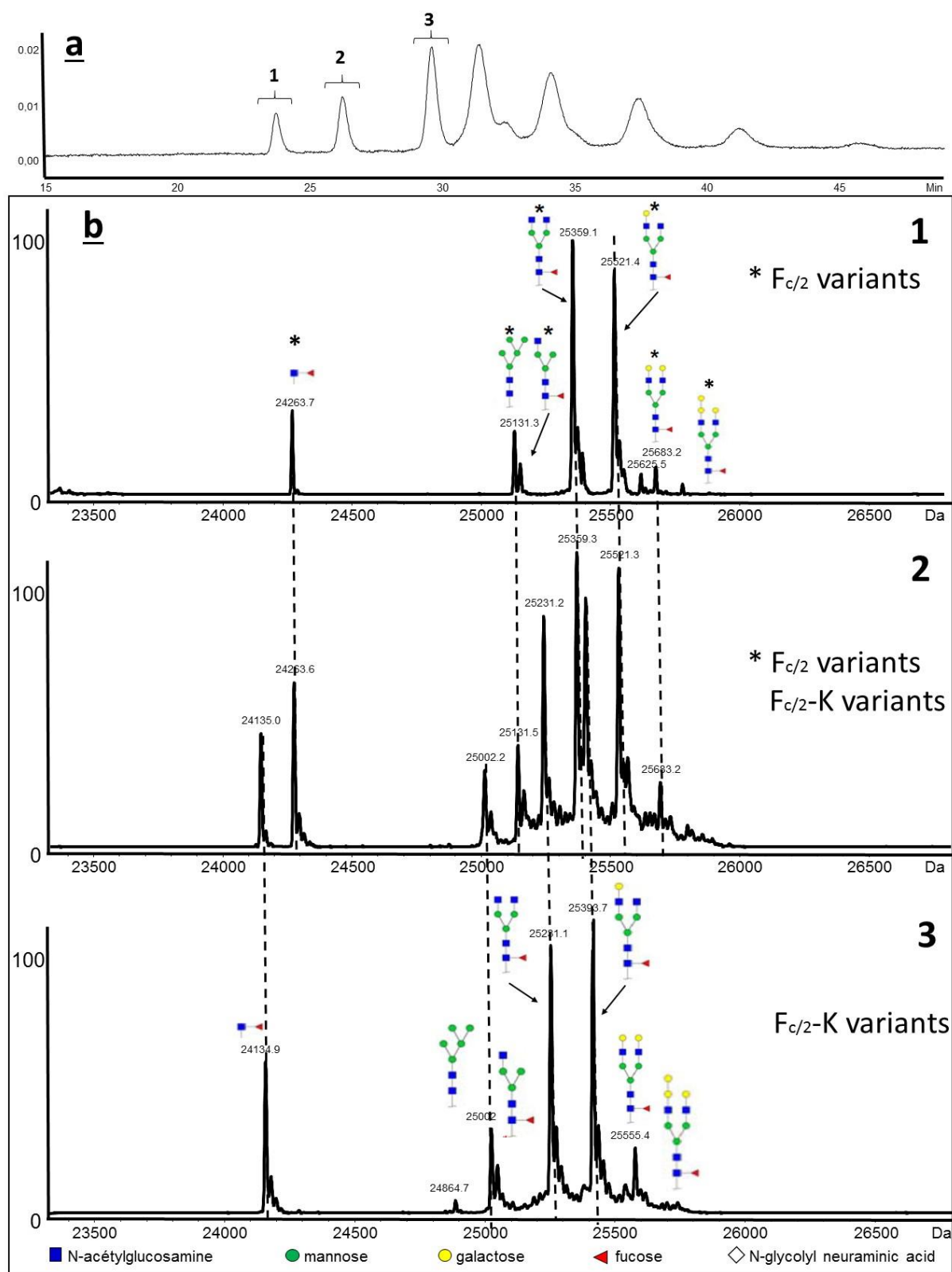


Figure 5. (a) Off line CZE-UV/ESI-MS separation of middle-up cetuximab charge variants. (b) Deconvoluted mass spectra for each Fc/2 variant. The MS peak were labeled with the correspondent glycoform. Experimental conditions: Inlet BGE: EACA 200 mM ammonium acetate 25 mM pH 5.70 and outlet BGE: ammonium acetate 25 mM pH 5.70; other conditions: See Figure 2, MS Experimental conditions: See Experimental section; sample, IdeS digest of cetuximab (5 µg/µL); sample injection 0.5 psi 50s.

Deconvoluted charge variant mass spectrum of fractions from peak 1 to peak 3 generated multiple masses corresponding to the expected presence of neutral glycosylation variants of Fc/2 fragments (Figure 5). In

addition, the comparison with the direct infusion experiment (Figure S-2) shown us that the two Fc/2 fragments corresponding to intact and with one lysine truncation are detected and separated. Deconvoluted mass spectra corresponding to peak 1 and peak 3 show a difference of 128 Da between mass peak 25359.1 Da corresponding to the most abundant Fc/2 glycoform (G0F) and mass peak 25231.1 Da corresponding to G0F for Fc/2-K. Thus, we obtained the complete separation of these two fragments (Figure 5-b 1 and 3). In agreement with Ayoub et al and with the comparison of direct infusion of cetuximab IdeS subunits (Figure S-2), only one possibility of C-terminal lysine loss was expected. Regarding, deconvoluted mass spectra of peak 2, it shows a nearly equal abundance mixture of Fc/2 and Fc/2-K variants. These peaks deconvolute to the same MWs founded to peak 1 and peak 3 and could be interpreted by an overlap during the deposit process. However, regarding the MS signal of raw data used to generate deconvoluted spectra of peak 1, peak 2 and peak 3, and considering a potential equivalent ionization efficiency of all Fc/2 variants, intensity of peak 2 is higher than that of peak 1 and less than that of peak 3 (Figure S-3) following the CZE separation pattern. This observation should eliminates a potential carryover effect (peak broadening, excessive diffusion) which should show a concomitant decrease of peak 1 MS intensity and increase of peak 2 MS intensity. In addition, to exclude carryover effect, we performed infusion of fractions corresponding to peak 4 and to a period of 2 min before detection of peak 1. No ESI-MS spectra have been detected corresponding to Fc/2 fragment (data not shown). Cetuximab, as other mAbs, is known to have a large number of microheterogeneities commonly found in proteins which are reflected by differences in mass, charge or conformation and then differences in effective mobilities. Moreover, it is plausible that several cumulative modifications could lead to a variation of conformation without mass shifts. Although further work is required to identify these modifications.

An important class of modification that can significantly impact the immunogenic properties of cetuximab in terms of PK and PD is glycosylation [10]. Cetuximab contains two sites of glycosylation on the HC: one is located in the Fc/2 domain (Asn299) and the second is located in the F(ab')₂ domain on Asn88 [7]. Cetuximab has been widely described in terms of glycan characterization [4,39]. In 2013, Janin-Bussat et al used a middle-up approach similar to the one described here but using HPLC-MS method, and identified 17 different glycoforms distributed on the two glycosylation sites [40]. In 2013, team of Dr. Beck characterized 24 different glycosylation using the combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI-MS techniques [11]. More recently Gahoual et al characterized 15 glycopeptides using a bottom-up approach by CESI-MS/MS [13]. In our work, we could identify a total of 15 glycans divided among 7 for the Fc/2 N-glycosylation and 8 for the F(ab')₂ N-glycosylation (Table S-1 and Table S-2). Regarding Fc/2 domain, branched glycan structures are primarily composed of fucose, N-acetylglucosamine, and mannose but can differ in the number of terminal galactose, mannose or N-acetylglucosamine residues. Glycan structure with the addition of galactose moieties involves a mass increase of 162 Da but does not induce a change in net charge [41,42]. Gahoual and coworkers demonstrated that particular glycopeptides having a difference of one

galactose could be baseline separated [13] whereas Redman et al did not observed mobility shifts between intact mAb glycoforms due to the low impact of 162 Da on the mass of intact mAb ($\approx 0.1\%$) [28]. Our work demonstrated that concerning glycoform with a difference of one galactose residue, middle-up approach does not allow to observe baseline separations. The mass of galactose moiety accounts for $\approx 0.6\%$ of the Fc/2 domain and $\approx 0.2\%$ of the F(ab')₂ domain. Following the conclusion of Redman et al, to induce effective mobility shift, the mass increase would have to be much greater or induce a significant change in conformation. However, CE has the potential to separate glycoforms bearing acidic residues, due to a reduction in net charge from the addition of negatively charged sialic acid [41]. In this point, cetuximab appears to be an ideal sample.

Indeed, regarding F(ab')₂ domain, Ayoub et al identified glycosylations with 41% glycans bearing N-glycolyl neuraminic acid (NGNA) in their structures. NGNA glycoforms result from the SP2/0 murine expression system used to produce cetuximab [43]. When produced in CHO cells, biobetter version exhibit N-acetylneuraminic acid (NANA) glycoforms [9]. Despite the high proportion of the NGNA glycan, no separation of F(ab')₂ variants was obtained using HPLC-MS [11]. As shown in Figure 6, electrophoretic peaks from 4 - 6 correspond to different F(ab')₂ variants. Deconvolution of each charge variant mass spectrum generated multiple masses, corresponding for peak 4 to the expected presence of neutral glycosylation variants. Following the theory developed previously for the Fc/2 variants, neutral residues did not allow effective mobility shift of F(ab')₂ glycoforms due to the small impact of galactose mass residue in the F(ab')₂ mass. The mass ascribed to the most intense mass peak 101924 Da (Figure 6b-4) correspond to the most abundant F(ab')₂ glycoform (G2FGal2/ G2FGal2). Four other less abundant F(ab')₂ glycoforms are labeled each one bearing galactose residues (Figure 6b-4). Deconvoluted mass spectra presented in Figure 6b-5 correspond to the F(ab')₂ glycoforms contained in peak 5. In this fraction the most abundant mass peak 102069 Da present a mass difference of 145 Da compared to GF2Gal2/ GF2Gal2 which corresponds to the presence of a NGNA residue instead of a galactose residue. This mass peak corresponds to the second most abundant F(ab')₂ glycoform (GF2Gal2/ GF2GalNGNA). Another mass peak at 102592 Da has been labeled in the mass spectra. This corresponds to a less abundant F(ab')₂ glycoform also bearing one NGNA residue in the glycan structure. We note that common mass peaks are detected in fraction 4 and 5. Indeed, the electrophoretic resolution of 1.05 does not allow the complete separation however we observe an important decrease of intensity for the glycoforms detected in fraction 4.

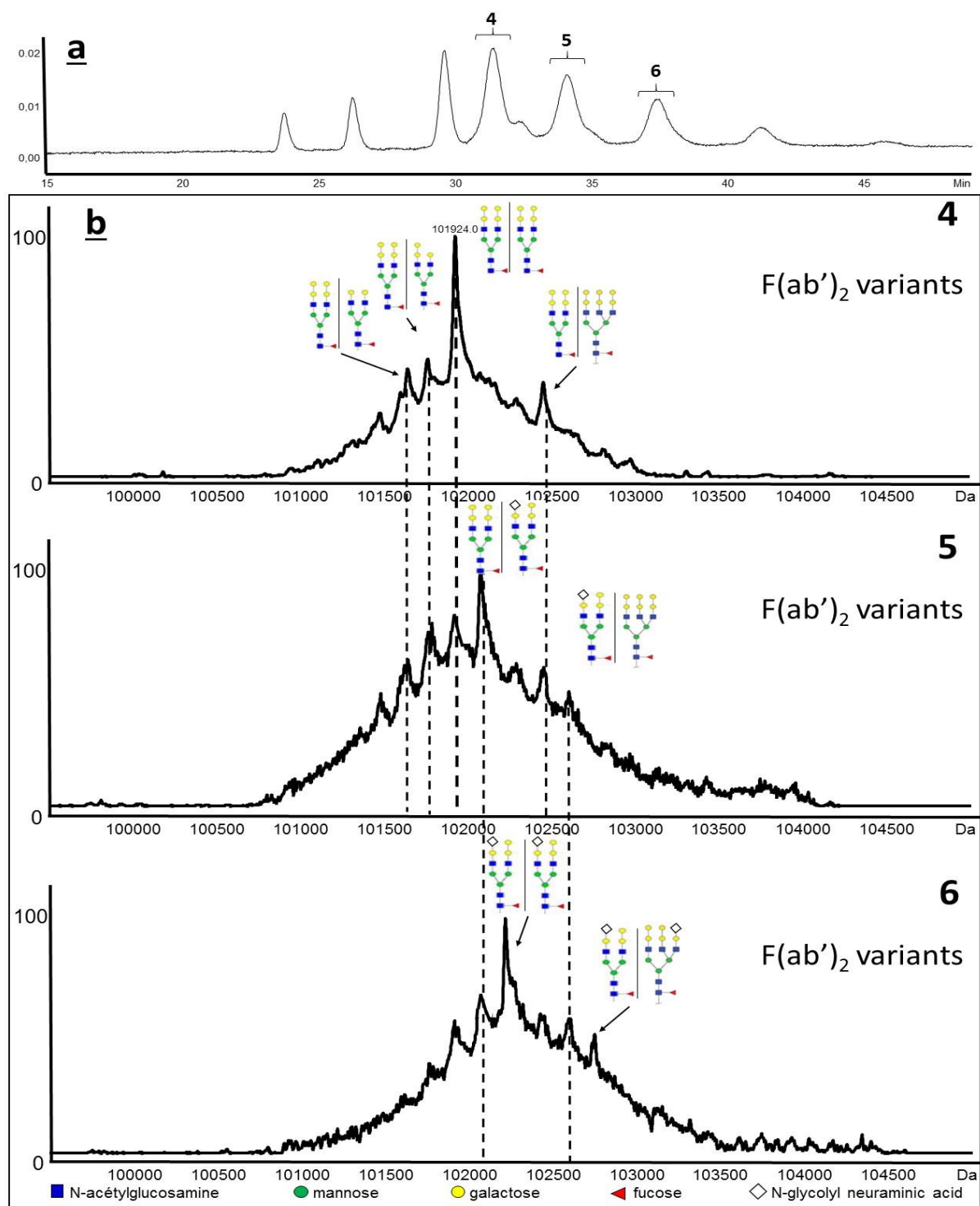


Figure 6. (a) Off line CZE-UV/ESI-MS separation of middle-up cetuximab charge variants. (b) Deconvoluted mass spectra for each $F(ab')_2$ variant. The MS peak were labeled with the correspondent glycoform. Experimental conditions: Inlet BGE: EACA 200 mM ammonium acetate 25 mM pH 5.70 and outlet BGE: ammonium acetate 25 mM pH 5.70; other conditions: See Figure 2, MS Experimental conditions: See Experimental section; sample, IdeS digest of cetuximab (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); sample injection 0.5 psi 50s.

Finally, the infusion of fraction 6 corresponding to the sixth peak of the electrophoretic separation (Figure 6b-6), gives deconvoluted mass spectra corresponding to $F(ab')_2$ glycoforms with the combination of glycan structures each bearing one NGNA residue (GF2GalNGNA/GF2GalNGNA). Indeed, the most intense peak

showing a deconvoluted mass of 102217 Da also presents a difference of 145 Da compared to GF2GalNGNA/GF2GalNGNA which correspond to the presence of a second NGNA residue instead of a galactose residue. Moreover, as in fraction 5, another mass peak at 102741 Da has been detected and correspond to a less abundant in the F(ab')₂ glycoforms also each bearing one NGNA residue in the glycan structures. To our knowledge, these results represent the first separation of F(ab')₂ glycoforms using CZE-MS coupling. Knowing that these glycosylations have been shown to be responsible for immunogenic responses [10], separation of these glycoforms can be very helpful for the characterization of cetuximab especially to highlight batch-to-batch variations in the glycosylation profiles or for biosimilarity assessment. Furthermore, no similar results have been described using HPLC-MS coupling. This highlights the potential of CZE separation to perform middle-up approach of mAbs especially when they carry capping sialic acid carbohydrates.

2.5. Conclusion

To summarize, we have reported an original strategy bringing into play off-line CZE-UV/fraction collection method followed by nanoESI-MS infusion for the characterization of a therapeutic mAb. In order to realize mAb charge variants separation and to perform nano-ESI-MS detection, CZE conditions were optimized. First, to eliminate BGE additives, HPC coated capillary utilized to obtain residual EOF and to minimize analyte adsorption. Second, as the aim is to conserve electrophoretic resolution and complete compatibility with ESI-MS, assymetric CZE conditions involving different BGE at the ends of capillary have been described. Inlet BGE has been chosen as a mixture of EACA 200 mM/ammonium acetate 25 mM, pH 5.70 and outlet BGE composed of only ammonium acetate 25 mM, pH 5.70. MWs were measured for six charge variants detected in the CZE separation of cetuximab subunits through deconvolution of the mass spectra. The three first peaks correspond to Fc/2 variants and the last three peaks correspond to F(ab')₂ variants. Separation performance obtained with these conditions shown electrophoretic resolution up to 2.10 for Fc/2 variants and an average electrophoretic resolution of 1.05 for F(ab')₂ variants. Regarding Fc/2 domain, two C-terminal lysine variants were identified and separated. Moreover the separation of Fc/2 fragments allowed the glycoprofiling of the variants with the characterization of 7 glycoforms each bearing neutral residues to the glycan structure. Regarding F(ab')₂ domain, deconvolution of the mass spectra allowed the determination of 8 glycoforms detected and separated in different peaks. Glycoforms separation is due to the presence of NGNA residues in some glycan structure. Four glycosylations of F(ab')₂ variants were identified by characteristic 145 Da mass shift, moreover this identification was supported by the decrease of effective mobility due to a reduction in net charge from the addition of negatively charged sialic acid. To our knowledge, this work represent the first demonstration of middle-up approach of mAb using CZE-MS and in addition the first separation of F(ab')₂ glycoforms. This highlights the potential of CZE to perform separation of mAbs especially when they carry sialic acid groups. Moreover, the strategy of collection fraction followed by nanoESI infusion without sample

treatment and in sample volume of 2 μ L open the way to different deeper characterization with for example a top-down approach using ESI-ETD-MS most likely unraveling additional information regarding the structure of the protein.

2.6. Acknowledgments

Authors would like to thank Sciex separations Inc. for lending a CESI prototype and Dr. M. Anselme from Sciex separations Inc. for his support. The authors would like also to express their gratitude to Dr. E. Wagner-Rousset, Dr. D. Ayoub, MC. Janin-Bussat and O. Colas (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France) for helpful discussions around antibody structural characterization

2.7. References

- [1] Beck, A.; Wurch, T.; Bailly, C.; Corvaia, N. *Nat Rev Immunol* 2010, 10, 345-352.
- [2] Reichert, J. M. *mAbs* 2012, 4, 413-415.
- [3] Arnold, J. N.; Wormald, M. R.; Sim, R. B.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25, 21-50.
- [4] Zhang, Z. Q.; Pan, H.; Chen, X. Y. *Mass Spectrom Rev* 2009, 28, 147-176.
- [5] McCamish, M.; Woollett, G. *Clin Pharmacol Ther* 2013, 93, 315-317.
- [6] Beck, A.; Diemer, H.; Ayoub, D.; Debaene, F.; Wagner-Rousset, E.; Carapito, C.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianferani, S. *Trac-Trend Anal Chem* 2013, 48, 81-95.
- [7] Beck, A.; Sanglier-Cianferani, S.; Van Dorsselaer, A. *Anal Chem* 2012, 84, 4637-4646.
- [8] Beck, A.; Wagner-Rousset, E.; Ayoub, D.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianferani, S. *Anal Chem* 2013, 85, 715-736.
- [9] Beck, A.; Debaene, F.; Diemer, H.; Wagner-Rousset, E.; Colas, O.; Dorsselaer, A. V.; Cianférani, S. *J Mass Spectrom* 2015, 50, 285-297.
- [10] Chung, C. H.; Mirakhur, B.; Chan, E.; Le, Q.; Berlin, J.; Morse, M.; Murphy, B. A.; Satinover, S. M.; Hosen, J.; Mauro, D.; Slebos, R. J.; Zhou, Q. W.; Gold, D.; Hatley, T.; Hicklin, D. J.; Platts-Mills, T. A. E. *New Eng J Med* 2008, 358, 1109-1117.
- [11] Ayoub, D.; Jabs, W.; Resemann, A.; Evers, W.; Evans, C.; Main, L.; Baessmann, C.; Wagner-Rousset, E.; Suckau, D.; Beck, A. *Mabs* 2013, 5, 699-710.
- [12] Gahoual, R.; Burr, A.; Busnel, J. M.; Kuhn, L.; Hammann, P.; Beck, A.; Francois, Y. N.; Leize-Wagner, E. *Mabs* 2013, 5, 479-490.
- [13] Gahoual, R.; Busnel, J.-M.; Beck, A.; François, Y.-N.; Leize-Wagner, E. *Anal Chem* 2014, 86, 9074-9081.
- [14] Gahoual, R.; Biacchi, M.; Chicher, J.; Kuhn, L.; Hammann, P.; Beck, A.; Leize-Wagner, E.; Francois, Y. N. *Mabs* 2014, 6, 1464-1473.
- [15] Talebi, M.; Nordborg, A.; Gaspar, A.; Lacher, N. A.; Wang, Q.; He, X. Z. P.; Haddad, P. R.; Hilder, E. F. *J Chromatogr A* 2013, 1317, 148-154.
- [16] Mokaddem, M.; Gareil, P.; Varenne, A. *Electrophoresis* 2009, 30, 4040-4048.
- [17] Alvarez, M.; Tremintin, G.; Wang, J.; Eng, M.; Kao, Y.-H.; Jeong, J.; Ling, V. T.; Borisov, O. V. *Anal Biochem* 2011, 419, 17-25.
- [18] Haselberg, R.; Ratnayake, C. K.; de Jong, G. J.; Somsen, G. W. *J Chromatogr A* 2010, 1217, 7605-7611.
- [19] Haselberg, R.; de Jong, G. J.; Somsen, G. W. *Anal Chem* 2013, 85, 2289-2296.

- [20] Fekete, S.; Gassner, A. L.; Rudaz, S.; Schappler, J.; Guillarme, D. *Trac-Trend Anal Chem* 2013, 42, 74-83.
- [21] Farnan, D.; Moreno, G. T. *Anal Chem* 2009, 81, 8846-8857.
- [22] Rozhkova, A. *J Chromatogr A* 2009, 1216, 5989-5994.
- [23] He, Y.; Lacher, N. A.; Hou, W.; Wang, Q.; Isele, C.; Starkey, J.; Ruesch, M. *Anal Chem* 2010, 82, 3222-3230.
- [24] He, Y.; Isele, C.; Hou, W.; Ruesch, M. *J Sep Sci* 2011, 34, 548-555.
- [25] Gassner, A. L.; Rudaz, S.; Schappler, J. *Electrophoresis* 2013, 34, 2718-2724.
- [26] Shi, Y.; Li, Z.; Qiao, Y. B.; Lin, J. *J Chromatogr B* 2012, 906, 63-68.
- [27] Espinosa-de la Garza, C. E.; Perdomo-Abundez, F. C.; Padilla-Calderon, J.; Uribe-Wiechers, J. M.; Perez, N. O.; Flores-Ortiz, L. F.; Medina-Rivero, E. *Electrophoresis* 2013, 34, 1133-1140.
- [28] Redman, E. A.; Batz, N. G.; Mellors, J. S.; Ramsey, J. M. *Anal Chem* 2015, 87, 2264-2272.
- [29] Amon, S.; Plematl, A.; Rizzi, A. *Electrophoresis* 2006, 27, 1209-1219.
- [30] Silvertand, L. H. H.; Toraño, J. S.; de Jong, G. J.; van Bennekom, W. P. *Electrophoresis* 2009, 30, 1828-1835.
- [31] Biacchi, M.; Bhajun, R.; Saïd, N.; Beck, A.; François, Y. N.; Leize-Wagner, E. *Electrophoresis* 2014, 35, 2986-2995.
- [32] Gahoual, R.; Busnel, J. M.; Wolff, P.; Francois, Y. N.; Leize-Wagner, E. *Anal Bioanal Chem* 2014, 406, 1029-1038.
- [33] Dubois, M.; Fenaille, F.; Clement, G.; Lechmann, M.; Tabet, J.-C.; Ezan, E.; Becher, F. *Anal Chem* 2008, 80, 1737-1745.
- [34] Shen, Y. F.; Smith, R. D. *J. Microcolumn Sep.* 2000, 12, 135-141.
- [35] Legaz, M. E.; Pedrosa, M. M. *J Chromatogr A* 1996, 719, 159-170.
- [36] Verzola, B.; Gelfi, C.; Righetti, P. G. *J Chromatogr A* 2000, 868, 85-99.
- [37] Punzet, M.; Ferreira, F.; Briza, P.; van Ree, R.; Malissa Jr, H.; Stutz, H. *J Chromatogr B* 2006, 839, 19-29.
- [38] Smith, R. D.; Olivares, J. A.; Nguyen, N. T.; Udseth, H. R. *Anal Chem* 1988, 60, 436-441.
- [39] Qian, J.; Liu, T.; Yang, L.; Daus, A.; Crowley, R.; Zhou, Q. W. *Anal Biochem* 2007, 364, 8-18.
- [40] Janin-Bussat, M.-C.; Tonini, L.; Huillet, C.; Colas, O.; Klinguer-Hamour, C.; Corvaia, N.; Beck, A. In *Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals*, Beck, A., Ed.; Humana Press, 2013, pp 93-113.
- [41] Liu, H. C.; Gaza-Bulseco, G.; Faldu, D.; Chumsae, C.; Sun, J. *J Pharm Sci* 2008, 97, 2426-2447.
- [42] Raju, T. S.; Scallon, B. J. *Biochem Biophys Res Co* 2006, 341, 797-803.
- [43] Beck, A.; Wagner-Rousset, E.; Bussat, M. C.; Lokteff, M.; Klinguer-Hamour, C.; Haeuw, J. F.; Goetsch, L.; Wurch, T.; Van Dorsselaer, A.; Corvaia, N. *Curr Pharm Biotechno* 2008, 9, 482-501.

Supplementary information

Figure S-1. Photography of dry droplet deposition with DHB matrix and outlet BGE (C) EACA 200 mM; acetate ammonium 25 mM pH 5.7 and (F) ammonium acetate 25 mM pH 5.70

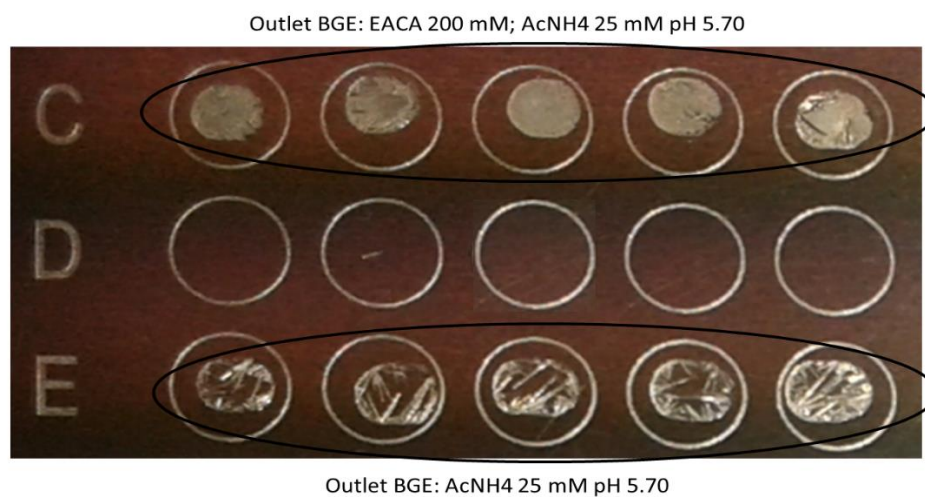


Figure S-2. ESI-MS spectra of (A) Fc/2 subunits and (B) F(ab')₂ subunits. The MS peaks were labeled with the correspondent glycoform.

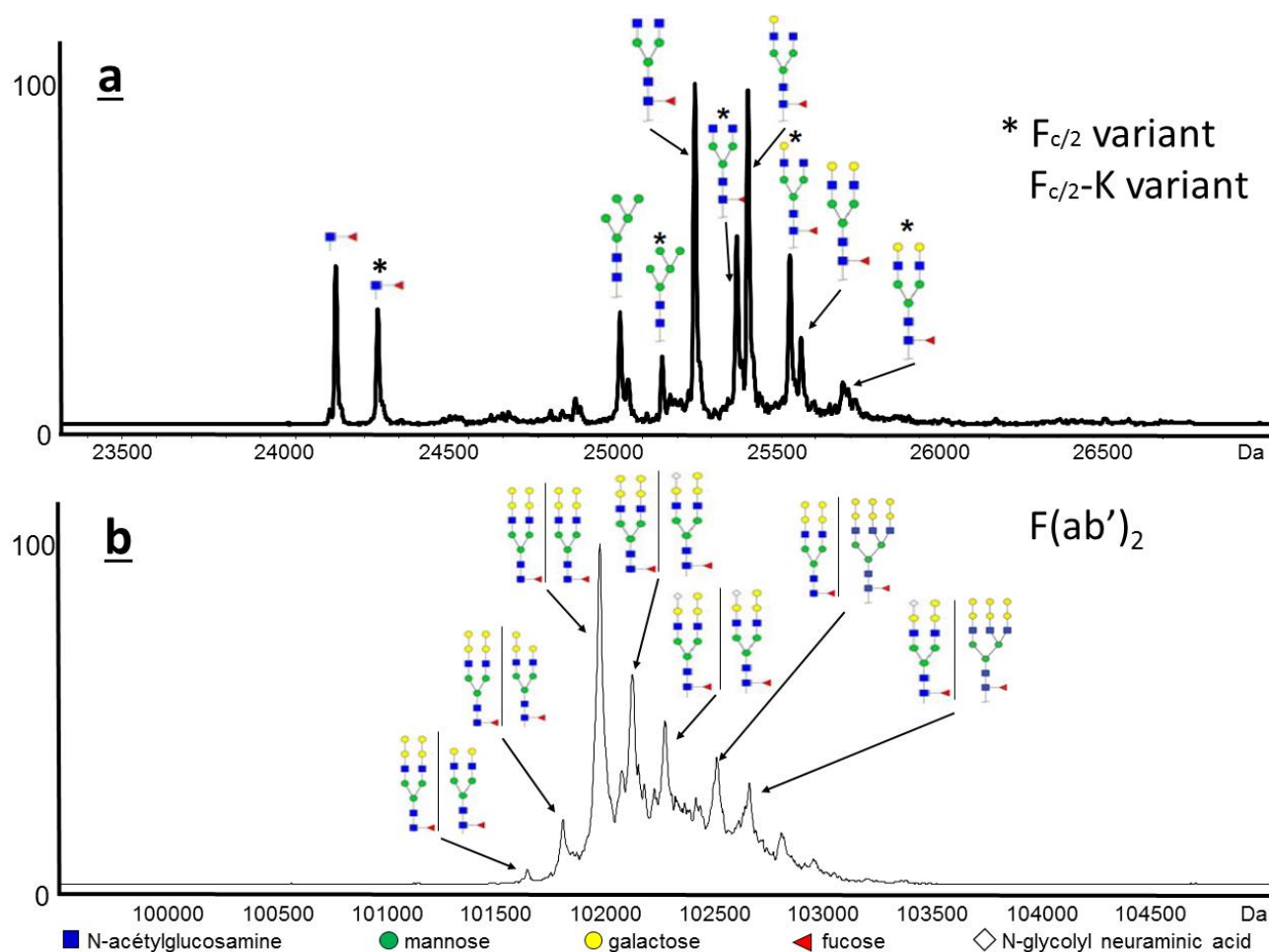


Figure S-3. (a) Off line CE-UV/ESI-MS separation of middle-up cetuximab charge variants. (b) Mass spectra corresponding to the 6 major peaks. Experimental conditions: Inlet BGE: EACA 200 mM acetate ammonium 25 mM pH 5.70 and outlet BGE: ammonium acetate 25 mM pH 5.70; other conditions: See Figure 2, MS Experimental conditions: See Experimental section; sample, IdeS digest of cetuximab (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); sample injection 0.5 psi 50s.

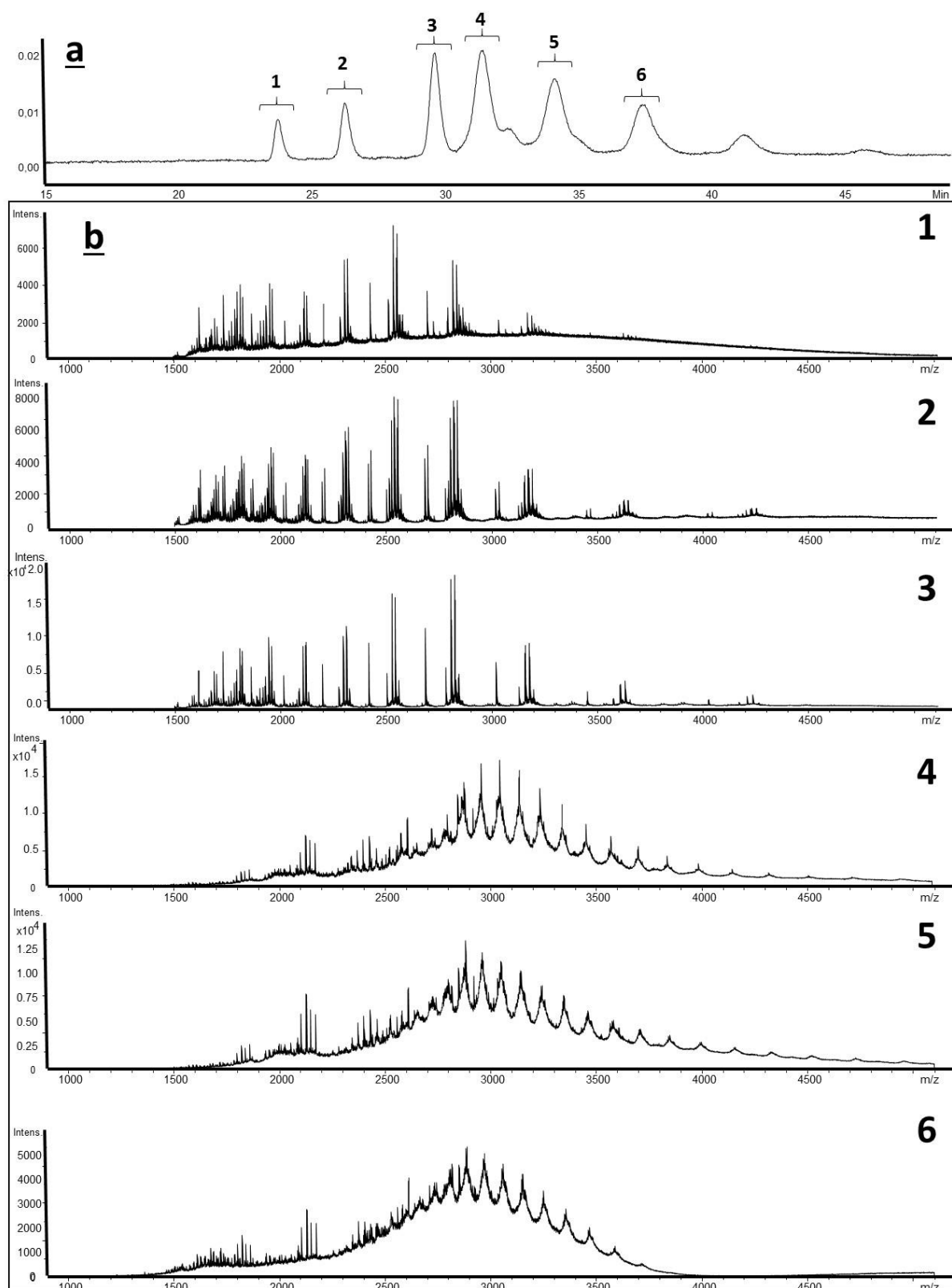


Table S-1: Theoretical and measured masses of the Fc/2 subunit identified glycoforms

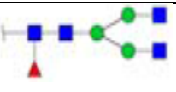
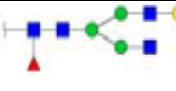
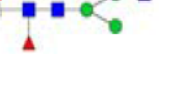
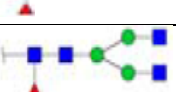
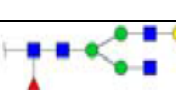
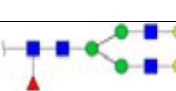
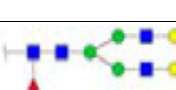
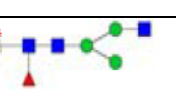
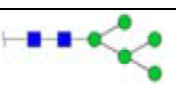
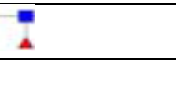
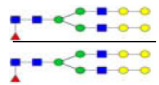
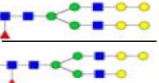
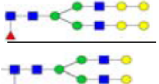
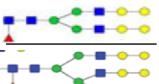
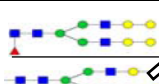
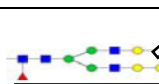
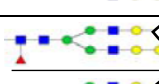
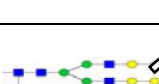
Glycosylated Fc/2	Glycan structure	Theoretical Mw (Da)	Measured Mw (Da)
Fc/2		25359.6	25359.1
Fc/2		25521.7	25521.4
Fc/2		25683.7	25683.2
Fc/2		25845.8	25845.0
Fc/2		25156.5	25155.7
Fc/2		25131.5	25131.3
Fc/2		24264.2	24263.7
Fc/2-K		25231.4	25231.1
Fc/2-K		25393.5	25393.7
Fc/2-K		25555.5	25555.4
Fc/2-K		25717.6	25718.4
Fc/2-K		25028.4	25027.8
Fc/2-K		25003.3	25002.7
Fc/2-K		24136.0	24134.9

Table S-2: Theoretical and measured masses of the F(ab')₂ subunit identified glycoforms

Glycosylated F(ab') ₂	Glycan structure	Theoretical Mw (Da)	Measured Mw (Da)
F(ab') ₂		101925	101924
F(ab') ₂		101763	101765
F(ab') ₂		101601	101604
F(ab') ₂		102453	102453
F(ab') ₂		102070	102069
F(ab') ₂		102597	102592
F(ab') ₂		102216	102217
F(ab') ₂		102743	102741

3. Conclusion

Lors de ce travail, nous avons développé une stratégie originale mettant en jeu le couplage indirect de la CZE et de la CESI MS, utilisée comme plateforme d'infusion nanoESI, pour la caractérisation de mAbs. Afin de réaliser la séparation des variants de charges des mAbs, les conditions électrophorétiques ont été optimisées. Dans un premier temps, dans le but d'éliminer les phénomènes d'adsorption et de réduire l'EOF, un greffage neutre HPC du capillaire a été réalisé. Ensuite, des conditions asymétriques de BGE basées sur la mise en place de différents BGE aux extrémités du capillaire ont été développées afin de conserver la résolution électrophorétique et de permettre une totale compatibilité avec une détection ESI-MS. Le BGE à l'entrée du capillaire composé de 200 mM d'acide ϵ -aminocaproïque et de 25 mM d'acétate d'ammonium pH 5,70, permet de conserver les performances de la séparation électrophorétique alors que le BGE à la sortie du capillaire composé de 25 mM d'acétate d'ammonium pH 5,70, permet la compatibilité avec la détection ESI-MS. Les résultats sur la séparation électrophorétique de variants de cetuximab a permis d'obtenir six pics correspondant à des masses moléculaires distinctes. Les trois premiers pics de la séparation correspondent à des variants de Fc/2 alors que les trois suivants correspondent à des variant de F(ab')₂. Les performances observées de la séparation ont données une résolution allant jusqu'à 2,10 pour les variants de Fc/2 et 1,05 pour les variants de F(ab')₂. Concernant le domaine Fc/2, deux variants de masse basée sur la perte d'une lysine en C-terminal de la HC ont été identifiés et séparés. De plus, cette séparation a permis d'observer le profil et la caractérisation de sept glycosylations porté par le fragment Fc/2. Concernant le domaine F(ab')₂, la déconvolution des spectres de masse obtenue pour chaque pic a permis de déterminer la structure de 8 glycoformes directement impliqués dans la séparation. La séparation de ces glycoformes s'explique par la présence de résidus d'acide sialique de type NGNA présent dans différents sucres. En effet, quatre glycosylations du domaine F(ab')₂ ont été identifiés par une différence de masse de 145 Da caractéristique d'un groupement NGNA. Cette séparation est donc due à la diminution de la mobilité électrophorétique des variants à cause de l'addition de la charge négative de l'acide sialique. Ce travail représente la première séparation et identification de glycoformes de mAbs à l'aide d'un couplage CZE-MS. Cela met en évidence le potentiel de la CZE pour la séparation de mAbs intacts principalement quand ceux-ci portent des groupements acides sialiques. De plus, cette stratégie de couplage indirect CZE/nanoESI-MS ouvre la voie à d'autres applications telles qu'une approche top down à l'aide d'une fragmentation ETD pouvant donner des informations complémentaires sur la structure des protéines.

Chapitre 2 : Caractérisation de dimères de fragments Fc/2 de cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS

1. Introduction

Les résultats présentés dans cette partie sont directement liés à l'étude précédemment décrite dont l'intitulé est : Chapitre 1. Séparation et caractérisation de glycoformes de Cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS.

Depuis 1986 et l'approbation du murumab-CD3 par l'administration de régulation des aliments et des médicaments américaine (FDA), les anticorps monoclonaux (mAbs) représentent la classe de molécule dont le développement est en constante croissance dans l'industrie pharmaceutique. Les mAbs sont des glycoprotéines complexes potentiellement porteuses de nombreuses micro-hétérogénéités moléculaires dont les sources sont variées (procédés de production inadaptée, conservation prolongée). Le domaine Fc des mAbs est une partie commune à de nombreux dérivés tels que les biosimilaires, les anticorps conjugués ou les protéines fusions. Cette région de la protéine est particulièrement responsable de fonctions effectrices telles que la cytotoxicité dépendante des anticorps. De plus, elle facilite la purification et peut également contribuer à améliorer la solubilité et la stabilité de composé. La présence d'une région Fc a des conséquences sur les fonctions effectrices de médiation qui pourrait être souhaitable pour des applications thérapeutiques.

L'un des principaux problèmes lors de la prise par le patient de ce type de médicaments, est la formation d'agrégats. En effet, les agrégats se formant dans des poches de produits thérapeutiques peuvent causer des réponses auto-immunes non désirées et/ou la perte d'activité biologique. Un des sites pouvant impliquer la formation d'agrégats est situé sur le domaine constant CH2 de la région Fc. Ainsi, la complexité de ces protéines et leur utilisation en tant que traitement thérapeutique justifient la nécessité d'améliorer les méthodologies analytiques de caractérisation. Ceci de manière à obtenir une caractérisation rapide et précise de ce type de molécules. La spectrométrie de masse (MS) a su rapidement s'imposer comme une méthode de choix pour la caractérisation des mAbs, notamment en raison de son excellente spécificité, sensibilité mais aussi car elle permet d'obtenir des informations structurales dans certains cas. Comme il a été détaillé dans la partie précédente (Chapitre I. Séparation et caractérisation de glycoformes de Cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS), nous avons développé la première séparation et identification de glycoformes de mAbs à l'aide d'un couplage CZE-MS. Cependant, aucune caractérisation de phénomènes d'agrégaions n'a été mise en évidence dans cette étude.

Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre la nature de la séparation des variants de charges correspondant au domaine Fc/2 obtenu dans le précédent chapitre. En effet, l'étude MS de la séparation électrophorétique montrant 3 pics de variant de Fc/2, a permis de caractériser deux variants de masse basés sur la perte d'une lysine en C-terminal de la HC du cetuximab. Cependant la présence d'un troisième pic correspondant à un mélange de ces deux variants de masse implique plusieurs questions sur l'origine de ce phénomène : diffusion lors du dépôt, rôle des glycosylations, rôle de la perte de lysine ou formation d'agrégats. Les résultats détaillés dans cette partie permettront donc d'apporter toutes les réponses à ces questions, notamment sur la formation de dimères de Fc/2.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le journal scientifique *Analytica Chimica Acta* (Elsevier 2016).

2. Characterization of Cetuximab Fc/2 aggregates by Off-line CZE-MS

Yannis-Nicolas François, Michael Biacchi, Nassur Said, Charly Renard, Alain Beck, Rabah Gahoual, Emmanuelle Leize-Wagner, *Analytical Chemistry* 2016, 908, 168-176.

2.1. Abstract

Monoclonal antibody (mAb) therapeutics attract the largest concern due to their strong therapeutic potency and specificity. The Fc region of mAbs is common to many new biotherapeutics as biosimilar, antibody drug conjugate or fusion protein. Fc region has consequences for Fc-mediated effector functions that might be desirable for therapeutic applications. As a consequence, there is a continuous need for improvement of analytical methods to enable fast and accurate characterization of biotherapeutics. Capillary zone electrophoresis-Mass spectrometry couplings (CZE-MS) appear really attractive methods for the characterization of biological samples. In this report, we used CZE-MS systems developed in house and native MS infusion to allow precise middle-up characterization of Fc/2 variant of cetuximab. Molecular weights were measured for three Fc/2 charge variants detected in the CZE separation of cetuximab subunits. Two Fc/2 C-terminal lysine variants were identified and separated. As the aim is to understand the presence of three peaks in the CZE separation for two Fc/2 subunits, we developed a strategy using CZE-UV/MALDI-MS and CZE-UV/ESI-MS to evaluate the role of N-glycosylation and C-terminal lysine truncation on the CZE separation. The chemical structure of N-glycosylation expressed on the Fc region of cetuximab does not influence CZE separation while C-terminal lysine is significantly influencing separation. In addition, native MS infusion demonstrated the characterization of Fc/2 dimers at pH 5.7 and 6.8 and the first separation of these aggregates using CZE-MS.

2.2. Introduction

Although monoclonal antibodies (mAbs) were introduced as treatments against disease in the late 1980, they currently represent the most rapidly growing category of therapeutic molecule [1-3]. MAbs are highly complex glycoproteins potentially displaying many naturally-occurring molecular micro-heterogeneities [4, 5]. The Fc region of mAbs is common to many new platforms as biosimilar, antibody drug conjugate or fusion protein. This region of the protein is conditioning the antibody isotype and particularly is responsible for effector functions such as antibody-dependent cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC) like phagocytosis [6]. Additionnally it facilitates purification and can also contribute to improved solubility and stability [7]. The presence of an Fc region has consequences for Fc-mediated effector functions that might be desirable for therapeutic applications. For successful delivery of biotherapeutic to patient, one of the major issue is aggregates formation. Aggregates in formulated therapeutic products can cause unwanted immune responses and loss of biological activity [8, 9]. Literature suggests that, depending on the nature of mAbs, mAbs aggregation in human might be mediated primarily by unfolding of CH2 domain on the Fc region [10, 11] and Fab domain [10, 12]. As a consequence, there is a continuous need for improvement of analytical methods to enable fast and accurate characterization. Mass spectrometry (MS) generally coupled with separation methods plays a key role in the characterization of therapeutic mAbs [13]. Depending on the protein structure level considered, characterization is performed following different strategies as intact molecular weight (MW) measurement, top-down, middle-up and bottom-up approaches [13-17]. Capillary zone electrophoresis (CZE) has been demonstrated to be an useful and powerful separation method for the characterization of intact proteins [18-20]. In a previous work, we developed the first analysis of intact mAb charge variant by CZE using a matrix-assisted laser desorption/ionization-MS (MALDI) detection [21]. In 2015, Redman et al published a remarkable paper on characterization of intact mAb variants using microfluidic CZE-ESI devices [22]. However, every studies described mAbs characterization without any aggregation phenomenon occurring. Recently, we developed a method for the middle-up characterization of cetuximab glycoforms using off-line CZE-UV/ESI-MS [23].

In this report, we used CZE-MS systems developed in house and native MS infusion to allow precise middle-up characterization of Fc/2 variant. The mAb selected was cetuximab which is human/murine chimeric IgG-1 directed against the epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpressed in advanced-stage EGFR positive colorectal cancer. Cetuximab was approved in the US and EU in 2004 and 2005. Cetuximab contains two glycosylation sites both on the heavy chain (HC) [13]. Moreover, it has a large number of micro-heterogeneities such as PTMs including methionine oxidation, asparagine deamidation or isomerization of aspartic acid. This mAb also has one C-terminal lysine truncation. These cumulated features make cetuximab an ideal sample for the characterization of mAbs variants by a middle-up approach. In order to cleave the protein in relatively large

fragments and distribute N-glycosylation sites over different fragments generated, IdeS proteolysis was employed. IdeS is a cysteine endopeptidase enzyme naturally secreted by *Streptococcus pyogenes* [24], IdeS enzymatic reaction cleaves cetuximab between the two consecutive glycine residues present in the hinge region to obtain two types of fragments (Fc/2 and F(ab')₂) each one carrying a N-glycosylation site. IdeS has demonstrated an exceptional specificity in IgG proteolysis on contrary to papain for instance, therefore it has been consequently used to ease and improve mAbs characterization [25]. IdeS characteristics regarding specificity alongside to proteolysis kinetics are explaining the success of this enzyme in mAbs characterization [26]. We developed a strategy using CZE-UV/MALDI-MS and CZE-UV/ESI-MS to evaluate the role of N-glycosylation and C-terminal lysine truncation on the CZE separation. In addition, this approach demonstrated the characterization of Fc/2 dimers at pH 5.7 and 6.8 and the first separation of these aggregates using CZE-UV off-line hyphenated to ESI-MS after Fraction collection. A better understanding of these phenomenon could improve the characterization of Fc region and their potential non-covalent interactions [27].

2.3. Materials and Methods

Chemicals. Methanol (HPLC gradient grade) and acetic acid (100%) were obtained from VWR (Radnor, PA, USA). Ammonium acetate (>98%), sodium hydroxide, ϵ -Amino-caproic acid (>98%), hydroxypropylcellulose Mw 100000 (HPC), carboxypeptidase B (CP-B) and formic acid (>98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). IdeS (Immunoglobulin-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*) also named FabriCATOR and IgGZERO were purchased from Genovis (Lund, Sweden). Cetuximab (Erbix®[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) is a sterile, preservative-free solution for intravenous infusion containing 5 mg/mL of cetuximab. Additionally to the mAbs it contains sodium chloride, glycine, polysorbate 80, citric acid monohydrate, sodium hydroxide and water for injections.

Middle-up sample preparation. Cetuximab was cleaved in the hinge region using limited proteolysis by IdeS (FabriCATOR, Genovis) to obtain two Fc/2 fragments (theoretical pI 7.74) and one F(ab')₂ fragment (theoretical pI 7.78). Sample was diluted using 147.25 μ L of 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 6.60, to a final concentration of 1 μ g/ μ L. A volume of 2.25 μ L of IdeS (67 units/ μ L) was added to the sample which was left at 37°C for 30 min. After digestion completion, sample was desalted using Amicon centrifugal filters (cut off = 10,000 Da) in pure water at 10°C and 14,000 g for 20 min. After desalting step, sample volume recovered was about 10 μ L. Sample was finally diluted to a final concentration of 5 μ g/ μ L in a total volume of 30 μ L of pure water.

Carboxypeptidase B (CP-B) treatment. Cetuximab was diluted using 145.75 μ L with 10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4, to a concentration of 1 μ g/L. Volumes of 2 μ L of CP-B (1mg/mL) and 2.25 μ L

of IdeS (67 units/ μ L) were added to the sample which was left at 37°C for 30 min. After digestion completion, sample was treated as described in the middle-up sample preparation.

Deglycosylation protocol. Cetuximab was diluted using 141.75 μ L with 10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4, to a concentration of 1 μ g/ μ L. Volumes of 6 μ L of IgGZERO (20 units/ μ L) and 2.25 μ L of IdeS (67 units/ μ L) were added to the sample which was left at 37°C for 30 min. After digestion completion, sample was treated as described in the middle-up sample preparation.

Capillary electrophoresis. The CZE experiments were carried out on a P/ACE MDQTM CE system from Sciex Separation (Brea, CA) equipped with a UV detection, a temperature controlled autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. A 32 KaratTM 8.0 (Sciex Separation, Brea, CA) was used for instrument control, data acquisition and data handling. Polymicro bare fused-silica capillaries of 75 μ m i.d., 375 o.d. (75.5 cm effective length, 82 cm total length) were obtained from Photonlines (St-Germain-en-Laye, France). New capillaries were conditioned by successive flushes with 1M and 0.1M NaOH and then with water under a pressure of 30 psi for 10 min each. The temperature in the capillary cartridge and autosampler was set to 25 °C. The acquisition rate was 10 points/s. Capillaries were rinsed with water and dried by air when not in use. UV absorbance remained fixed at 200 nm. Voltage applied at 20 kV with a ramp duration of 0.17 min and injection sample conditions were 0.5 psi for 50s. Concerning modified capillaries, capillaries were coated in house with hydroxypropylcellulose Mw 100000 (HPC) following the protocol described by Shen et al [28]. 5% HPC in pure water (w/v) was prepared to apply capillary coating. Coating durability is around 20 runs without recoating step. For cetuximab separation, inlet BGE 200 mM ϵ -Amino-caproic acid (EACA)-ammonium acetate 25 mM pH 5.70 and outlet BGE ammonium acetate 25 mM pH 5.70 have been used as separation conditions. Injection volumes have been calculated using CEToolbox application (Pansanel, GooglePlay).

CZE/Fraction Collection Interface. This interface have been described in a previous study [21]. Briefly, automated off-line coupling of CZE to MS was set up by using a homemade modified automatic spotting device Proteineer FC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for the sheath flow-assisted spotting from the CZE capillary outlet onto a fraction collection target. The original set up of the UV cell in the P/ACE MDQTM (Sciex Separation, Brea, CA) was delocalized outside the CE instrument in order to allow simultaneous UV detection and fractions collection. Hystar 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used for Proteineer FC control.

CESI-MS as nanoESI infusion platform. The infusion experiments were carried out with a PA 800 plus capillary electrophoresis (CE) system from Sciex Separation (Brea, CA). Prototype fused-silica capillaries (total length 95 cm; 30 μ m i.d.) whose outlet end (about 3 cm) was etched with hydrofluoric acid were provided by Sciex Separation (Brea, CA, USA). New capillaries were initially conditioned by flushing them for 10 min with

MeOH, 10 min with 0.10 M sodium hydroxide, 10 min with 0.10 M hydrochloric acid and finally with water for 20 min each flushing step being conducted at 75 psi (5.17 bar).

MALDI-TOF-MS. The matrix was prepared by dissolving 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (2g/L) in 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile (TFA/ACN) (30/70)(v/v). Fraction collection was realized using Ground Steel MALDI target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Mass spectra of the CZE fractions were recorded using an Autoflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), operating in reflector mode and with FlexControl software. Positively charged ions were detected and sums of 1500 single-shot spectra were acquired automatically from each sample by using the AutoXecute software. Data processing was performed with FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). All spectra were calibrated by external calibration using Protein calibration standard I (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for intact protein separation.

ESI-TOF-MS. For nanoESI-MS infusion experiments the PA800 plus system was coupled to a maxis 4G (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). MS transfer parameters were optimized using the actual sample directly infused via the CE system using a pressure of 5 psi (340 mbar). MS parameters were optimized so that high m/z ions could be properly transferred to the TOF mass analyzer while avoiding fragmentation. Ion funnels RF were set at values of 300 Vpp and 400 Vpp. The electrospray voltage (capillary voltage) was typically ranging from -1.2 to -1.8 kV. Dry gas was set at 1.5 L/min and source temperature at 180°C. Data processing was performed with DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Deconvolution of the mass spectra was performed based on maximum entropy analysis using ESI Compass 1.3 Maximum Entropy Deconvolution Option in DataAnalysis 4.0. All spectra were calibrated by external calibration using Pepmix (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and cesium iodide (CsI) from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

2.4. Results and discussions

Cetuximab is a chimeric mouse-human IgG1 known to bear 2 N-glycosylation sites on each HC [26]. As every mAbs, cetuximab can exhibit a wide variety of micro-heterogeneities particularly due to PTMs. Furthermore, this mAb can also experience HC C-terminal lysine truncation. In a preliminary experiment, direct nanoESI-MS infusion of cetuximab IdeS digest was performed. Results proved equivalent signal abundances for Fc/2 C-terminal lysine variants which involves two distinct profiles for the Fc/2 domains (Fig. S-1). With this information, we expected to detect at least two peaks corresponding to Fc/2 fragments due to a loss of a +1 charge associated with C-terminal lysine truncation.

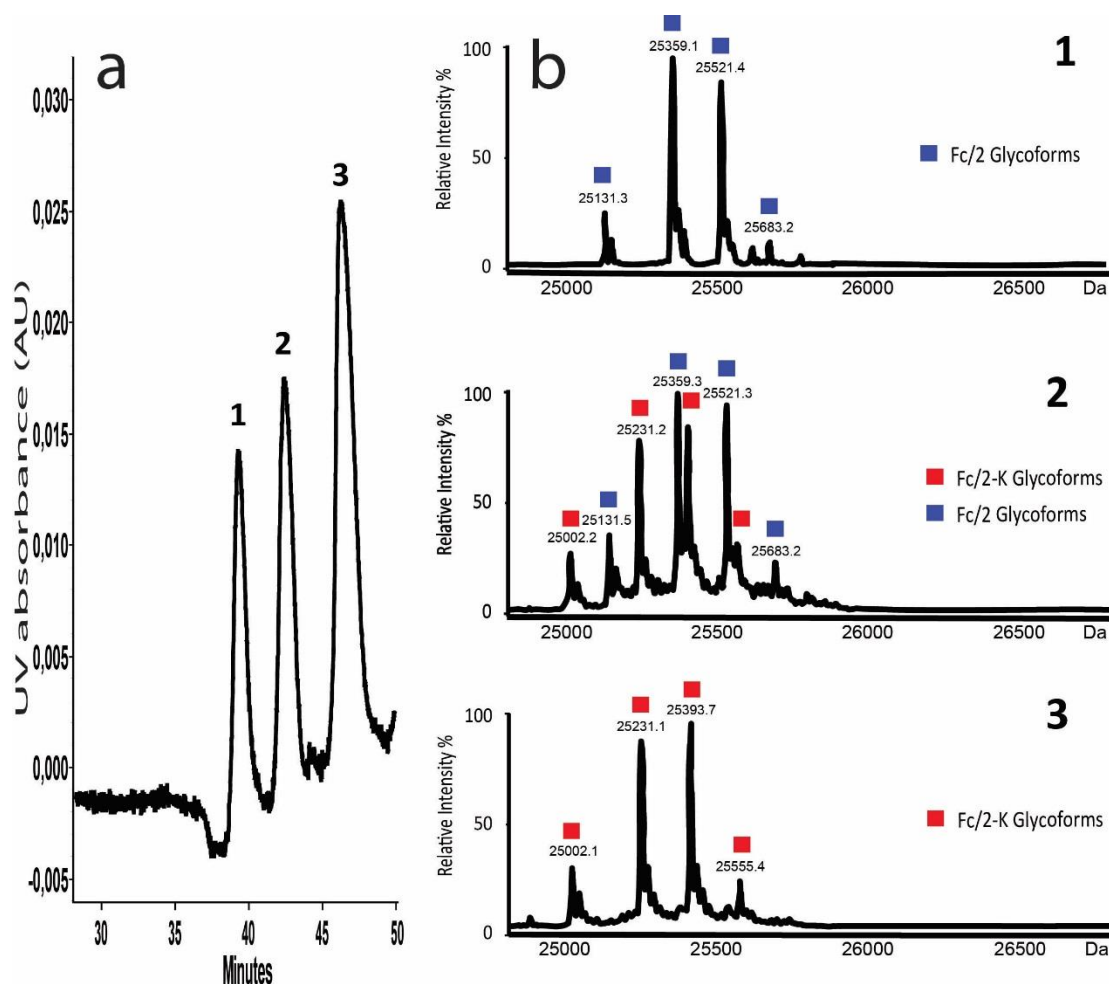


Figure 1. (a) Off line CZE-UV/ESI-MS separation of middle-up cetuximab charge variants. (b) Deconvoluted mass spectra for each Fc/2 variant. The MS peak were labeled with the correspondent glycoform. Experimental conditions: Inlet BGE: EACA 200 mM ammonium acetate 25 mM pH 5.70 and outlet BGE: ammonium acetate 25 mM pH 5.70; HPC-coated capillary, total/effective length 82/75.5 cm x 75 μ m i.d.; voltage, 20 kV; UV absorbance at 200 nm; MS condition: See Experimental section; sample, IdeS digest of cetuximab (5 μ g/ μ L); sample injection 0.5 psi 50s.

Cetuximab IdeS digest was separated and characterized by offline CZE-UV/ESI-MS using an instrumental setting developed in house, described in a previous work [23]. Briefly, assymetric CZE conditions was based on inlet background electrolyte (BGE) composed of ϵ -amino-caproic acid (EACA) 200 mM/ammonium acetate 25 mM, pH 5.7 and outlet BGE composed of ammonium acetate 25 mM, pH 5.7. Hydroxypropylcellulose (HPC) coating was used to minimize analyte adsorption on the capillary wall and reduce the electroosmotic flow (EOF). After deposition, each fraction was collected and evaporated. Before infusion, dry samples were reconstituted in 2 μ L of ACN/H₂O/FA (50/49/1, v/v) in order to enhance sample ionization. Thus, each fraction was infused into the MS using a flow rate of 10 nL/min in order to enhance sensitivity.

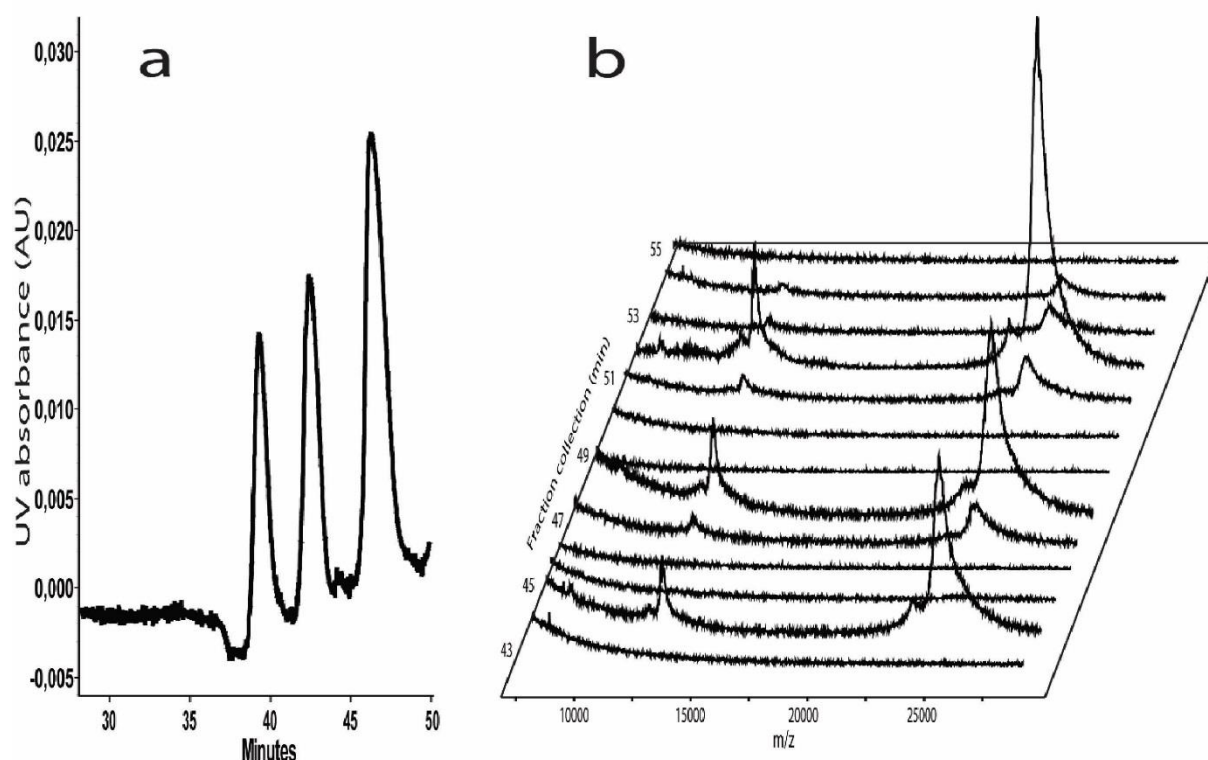


Figure 2. CZE-UV off-line coupled to MALDI-MS via fractionation for a middle-up characterization of Cetuximab Fc/2 variants. (a) CZE-UV electropherogram. (b) Analysis of CZE-UV fractions by MALDI-MS. CE Experimental conditions: See Fig. 1; MS condition: See Experimental section; sample, IdeS digest of cetuximab (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

As emphasized in Fig. 1-b, CZE separation obtained shows three consecutive peaks completely separated corresponding to the Fc/2 region. Deconvoluted mass spectra of each fraction generated multiple masses corresponding to the expected presence of different neutral glycosylation on Fc/2 fragments (Fig. 1-b). In addition, the comparison with the direct infusion experiment (Fig. S-1) demonstrates that the two Fc/2 fragments corresponding to intact and with one lysine truncation (Fc/2 and Fc/2-K) are detected and separated. Deconvoluted mass spectra corresponding to peak 1 and peak 3 show a difference of 128 Da between mass peak 25359.1 Da corresponding to the most abundant Fc/2 glycoform (G0F) and mass peak 25231.1 Da corresponding to G0F for Fc/2-K. Thus, we demonstrate the complete separation of these two fragments (Fig. 1-b). Regarding deconvoluted mass spectra of peak 2 (Fig. 1-b 2), it shows a nearly equal abundance mixture of Fc/2 and Fc/2-K variants. Deconvoluted mass spectra corresponding to peak 2 lead to the same MWs as peak 1 and peak 3 and could be attributed to either an overlap during the fraction collection process or by cumulative PTMs which could lead to a variation of conformation without mass shifts. Moreover, these phenomenon could also be explained by a possible aggregation of Fc/2 fragments.

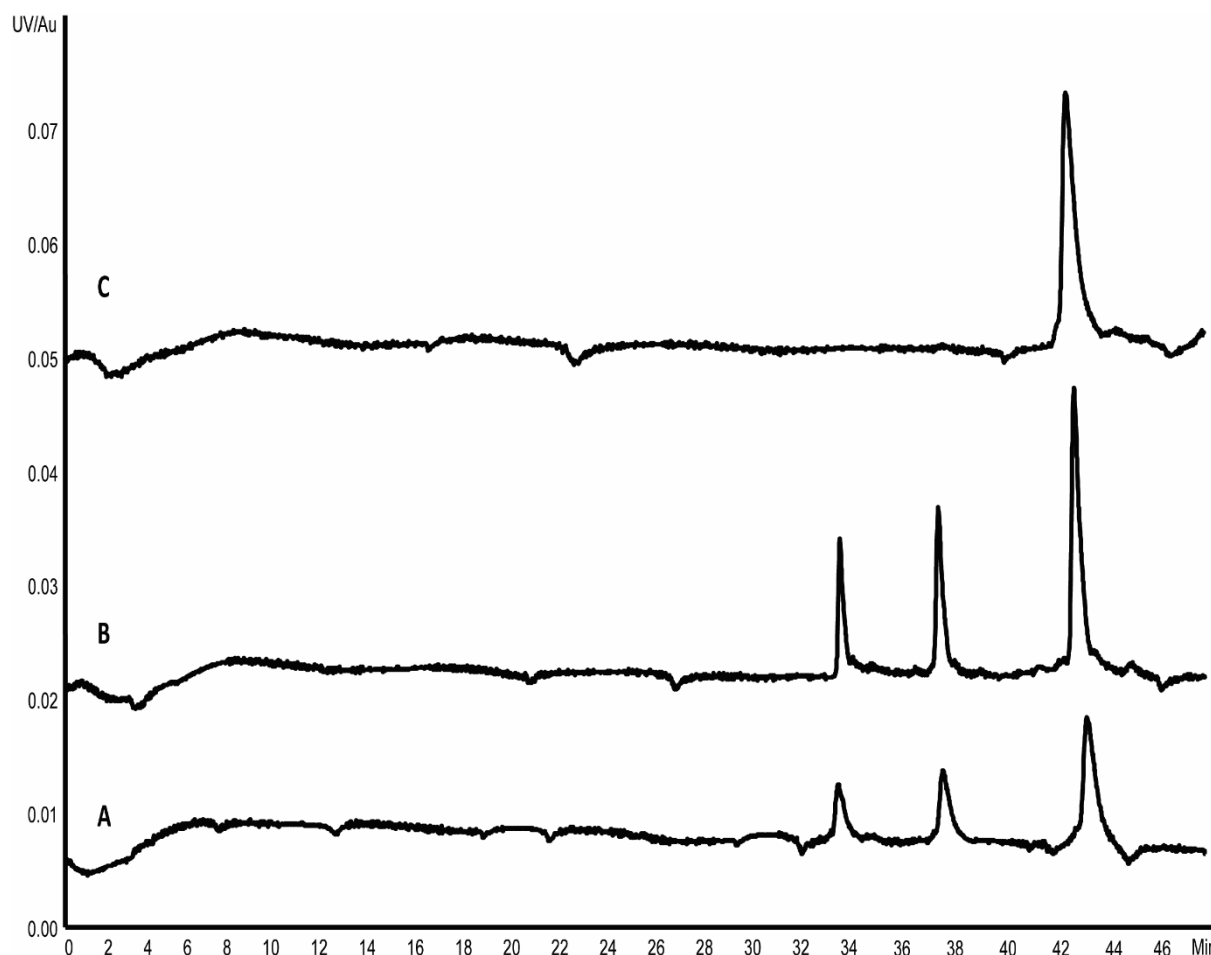


Figure 3. Impact of glycosylation and lysine truncation on electrophoretic resolution. Electrophoretic separation of (A) cetuximab with IdeS treatment, (B) cetuximab with IgZERO+IdeS treatment and (C) cetuximab with CP-B+IdeS treatment. Inlet BGE composed by a mixture of EACA 200 mM and ammonium acetate 25 mM pH 5.70 and outlet BGE by ammonium acetate 25 mM at pH 5.70.

2.4.1. Validation of the CZE-UV/ESI-MS fraction collection process.

The fraction collection process developed in this study based on the apparent mobility of each peak, allows theoretically to recover the total quantity of each variant present in the peak. However the offline coupling strategy developed do not permit to represent the separation using MS spectra and then to observe possible diffusion. Regarding raw MS spectra (Fig. S-2) and based on the hypothesis of an equivalent ionization efficiency of all Fc/2 variants, potential carryover effect due to peak broadening or excessive diffusion should be eliminated. However, in the aim to confirm the absence of overlap during the fraction collection, experiments using CZE-UV/MALDI-MS coupling have been performed. Same experimental conditions described previously have been implemented. Only deposition process has been changed to allow a fraction collection directly on a MALDI target plate with a deposition time interval of 1 minute between each fraction. Fraction collection was performed between 43 and 55 minutes according to the electropherogram represented in Fig. 2-a. Fig. 2-b emphasizes the reconstruction of the separation using MS spectra of each fraction. First of all, the CZE/MALDI-MS reconstruction exhibits three distinct peaks corresponding to the CZE separation. MS spectra of each peak in CZE show a value of 25 kDa corresponding to the expected Fc/2 variants. However due

to presence of other sources of micro-heterogeneities and the limited resolution of the MALDI-MS instrument used, it was impossible to deduce the average mass of the charge variants confidently. In the other hand, the CZE/MALDI-MS profile (Fig. 2-b) confirms the good agreement between the UV detection time and the deposition time. Based on the difference of protein apparent mobilities described by the equation:

$$\mu_{app} = \frac{L l}{t_m V}$$

with μ_{app} the apparent mobility which is the sum of effective mobility and residual electroosmotic flow, L and l the total capillary length and length to detection window, respectively, V the applied voltage and t_m the migration time. Deposition time t_d is then calculated by the equation:

$$t_d = \frac{L^2}{\mu_{app} V}$$

The localization of each Fc/2 variants shows a time shift between the UV detections and the spotting process due to UV localization at 6.5 cm from the capillary outlet. These results confirm without any remaining ambiguity the absence of carryover effect and diffusion phenomenon during the fraction collection process, demonstrating the accuracy and robustness of the instrumental setting developed. As a consequence, characteristics of the analytical strategy developed to characterize Fc/2 fragments cannot be doubted. Therefore it is necessary to focus on cetuximab structure and potential modifications on the fragments generated during IdeS proteolysis in order to conclude on the CZE separation described previously (Fig. 1-a).

2.4.2. Influence of N-glycosylation on Fc/2 variants separation.

An important class of modification that can significantly impact the immunogenic properties of cetuximab in terms of pharmacokinetic and pharmacodynamic is glycosylation [26]. Cetuximab contains two sites of glycosylation on the HC: one is located in the Fc/2 domain (Asn299) and the second is located in the F(ab')₂ domain on Asn88 [13]. Cetuximab glycosylation profile has been extensively described in particular as it is expressing glycoforms responsible for immunogenic reaction [26]. Regarding Fc/2 domain, branched glycan structures are primarily composed of fucose, N-acetylglucosamine, and mannose but can differ in the number of terminal galactose, mannose or N-acetylglucosamine residues. Glycan structure with the addition of galactose moieties involves a mass increase of 162 Da but does not induce a change in net charge [29, 30]. In a previous work we demonstrated that concerning glycoform with a difference of one galactose residue, middle-up approach does not allow to observe baseline separations [23]. The mass of galactose moiety accounts for only $\approx 0.6\%$ of the Fc/2 domain and $\approx 0.2\%$ of the F(ab')₂ domain. Thus mass difference should be greater or involve a significant conformation change to enable a significant effective mobility shift. To confirm these theoretical considerations, analysis of deglycosylated sample of cetuximab by CZE-UV/ESI-MS was performed in order to evaluate the role of glycans in the separation process. Before IdeS digestion of cetuximab, a deglycosylation step using IgGZERO has been added to the digestion protocol. The aim is to remove all glycans in the Asn299.

IgGZERO is an endoglycosidase specific for N-glycans on the Fc domain of IgGs which are cleaved after the first Glc-Nac. Following IgGZERO and IdeS treatment, the most intense ion series is corresponding to expected cetuximab Fc/2 and Fc/2-K subunits with GlcNac-Fuc remaining (Fig. 4-b and Table S-1). CZE separation, represented by Fig. 3-B, contains the three peaks corresponding to Fc/2 subunits with the same profile in terms of migration times and resolution compared to the original separation of the sample non treated with IgGZERO enzyme (Fig. 3-A). With these results, we can conclude that glycan nature expressed on Asn299 residue does not impact significantly the CZE separation of Fc/2 variants. Effect of others microheterogeneities like asparagine deamidation or methionine oxidation are quite difficult to observe on the intact protein or using limited proteolytic digestion because of the number of these modifications, their localization and the difficulty to control the level of modification in the proteins. Indeed, some parameters like storage conditions or digestion pH can induce endogenous asparagine deamidation or methionine oxidation.

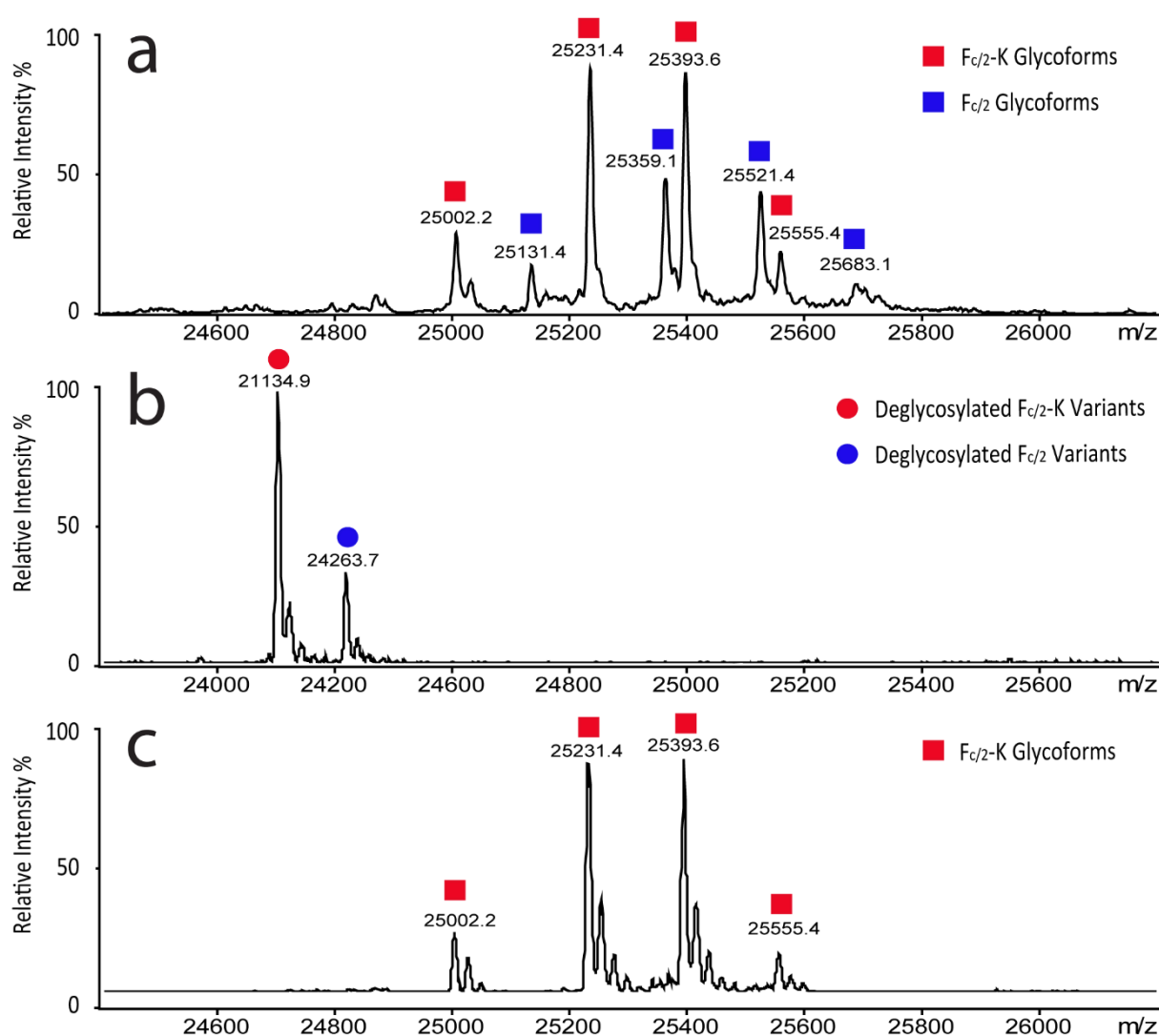


Figure 4. Fc/2 variants deconvoluted mass spectra of (a) IdeS digest cetuximab, (b) IgGZERO+IdeS digest cetuximab and (c) CP-B+IdeS digest cetuximab. Experimental conditions: 50%/49%/1%, acetonitrile/water/formic acid (v/v/v); sample concentration 1 μ M.

2.4.3. Influence of C-terminal lysine truncation on Fc/2 variants separation

The presence of the lysine in HC C-terminal position is essential to understand the separation of Fc/2 variants. Indeed, in this work, we demonstrated the separation of the two Fc/2 fragments corresponding to intact and with one lysine truncation (Fc/2 and Fc/2-K). Peak 1 and peak 3 (Fig. 3-A) correspond to the most abundant Fc/2 glycoforms and Fc/2-K glycoforms respectively. However for peak 2, a nearly equal abundance mixture of Fc/2 and Fc/2-K have been observed. To evaluate the role of lysine truncation in the separation process, IdeS digestion protocol has been modified to perform a total truncation of C-terminal lysine of cetuximab. Sample was treated by carboxypeptidase B (CP-B), removing systematically the C-terminal lysine residues from the two HCs of the antibody [31], it was added prior to IdeS digestion step. After CP-B and IdeS treatment, the most intense ion series corresponds to the expected glycoforms of Fc/2-K variants (Fig. 4-c). Moreover, as compared to sample treated only with IdeS (Fig. 4-a), we observe in the deconvoluted mass spectrum the complete loss of Fc/2 glycoforms profile which confirms the total removing of C-terminal lysine on the HC.

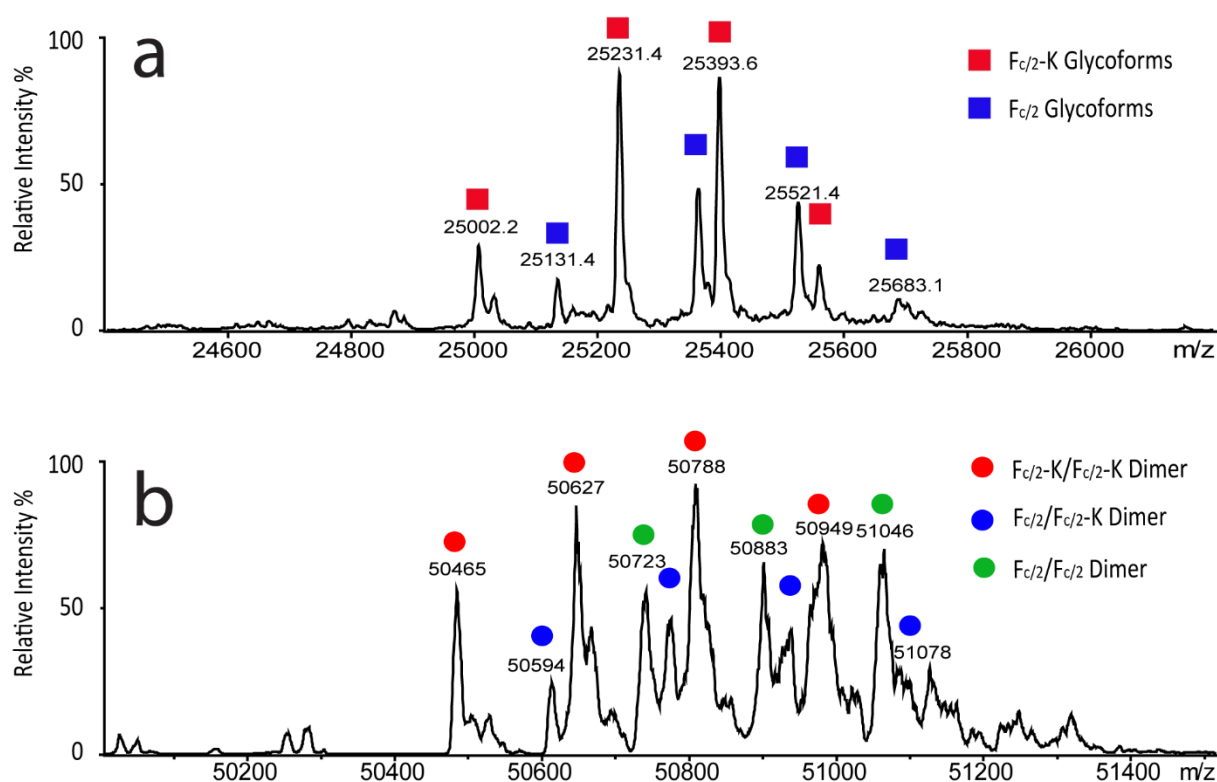


Figure 5. Cetuximab Fc/2 variants deconvoluted mass spectra in (a) denaturing and (b) CZE conditions. Experimental conditions: denaturing conditions, 50%/49%/1%, acetonitrile/water/formic acid (v/v/v); CZE conditions, ammonium acetate 25mM, pH 5.7; sample concentration 1 μ M.

CZE separation, represented on Fig. 3-C, contains only one peak corresponding to Fc/2 subunits. This peak has been characterized as Fc/2-K variants. Moreover, we observe the absence of the two first peaks compared to the original separation. Despite the fact that the loss of the first peak is totally justified by the unique presence of Fc/2 variant trimmed from both HC C-terminal lysine, the loss of the second peak proves that the presence of

C-terminal lysine residue plays an active role in the separation process of Fc/2 variants. These results also allow to reject hypothetical effects on effective mobilities due to several cumulative PTMs leading to modification of the mAb without MS resolved mass shift. The second peak of the separation of sample without CP-B treatment (Fig. 3A) has been characterized by a nearly equal abundance mixture of Fc/2 and Fc/2-K variants. Absence of this peak in cetuximab separation after CP-B+IdeS digestion (Fig. 3-C) and the fact that no Fc/2-K variants have been detected at that migration time involves a strong relation between Fc/2 and Fc/2-K variants.

2.4.4. Role of Fc/2 aggregates on CZE separation

In this work, we described a protocol based on nanoESI-MS infusion of the different fractions using CESI-MS interface as nanoESI platform. After CZE separation, each collected fraction was systematically dried by air and reconstituted in 2 μ L of ACN/H₂O/FA (50/49/1, v/v) to enhance ionization. However, infusion conditions differed from CZE conditions at pH 5.7 and are denaturing by the presence of acetonitrile. Indeed, in these experiments, noncovalent interactions between Fc/2 variants can influence CZE separation at pH 5.7 but protein-protein interaction cannot actually be observed due to the denaturing nanoESI-MS conditions used. To evaluate these phenomena, nanoESI-MS infusion of cetuximab IdeS digest have been prepared using denaturing conditions and using CZE conditions as well. For denaturing conditions, sample has been diluted in 2 μ L as stated previously while for CZE conditions, sample has been diluted in ammonium acetate 25mM, pH 5.7. Each sample has been reconstituted to a concentration of 1 μ M. Each sample was infused into the MS using a flow rate of 10 nL/min. Deconvoluted mass spectra in denaturing conditions generated multiple masses corresponding to the expected presence of neutral glycosylation variants of Fc/2 fragments (Fig. 5-a and Table S-1). Mass peak 25359.2 Da corresponding to G0F for Fc/2 and mass peak 25231.1 Da corresponding to G0F for Fc/2-K are in agreement with theoretical masses of these glycoforms (Table S-1). Concerning CZE conditions, charge variant deconvoluted mass spectrum generated multiple masses between 50.4 kDa and 51.2 kDa (Fig. 5-b). These peaks correspond to the formation of protein-protein aggregates due to noncovalent interactions between Fc/2 subunits. Indeed, mass peak 50463.4 Da corresponds to the mass of Fc/2-K subunits homodimer, mass peak 50591.8 Da corresponds to the heterodimer between Fc/2 and Fc/2-K subunits and mass peak 50721.2 Da corresponds to Fc/2 subunit homodimer (Table S-2). Moreover, other mass peaks between 50.4 kDa and 51.2 kDa correspond to the expected presence of the combination of neutral glycosylation variants of these different dimers (Table S-2). In addition, no deconvoluted mass spectrum have been observed at 25 kDa that excludes the presence of free Fc/2 variants in ammonium acetate 25mM at pH 5.7. These results allow the explanation of the presence of three different peaks corresponding to Fc/2 variants in CZE separation. Indeed, peak 1 (Fig. 1-a) corresponds to Fc/2 homodimer, peak 2 corresponds to Fc/2/Fc/2-K heterodimer and peak 3 correspond to Fc/2-K homodimer. To our knowledge, this is the first time that aggregates of cetuximab Fc/2 subunits have been separated and characterized. Finally, a last study consisted to infuse the same sample in

condition classically described in the literature as native conditions [32-35]. To be in agreement with CZE condition, 25 mM ammonium acetate at pH 6.8 was selected. Obtained MS profiles were exactly the same as those observed using CZE conditions. This confirms the presence of Fc/2 dimers in native conditions and exclude a possible major role of EACA in the protein-protein aggregation process. Results obtained from CZE-UV/MALDI-MS and CZE-UV/ESI-MS experiments clearly demonstrate the formation of Fc/2 fragments following IdeS proteolytic digestion of mAbs. This observation is particularly important from an analytical chemistry point of view. As the outstanding selectivity of IdeS has favored its wide use among the scientific community and the formation of aggregates, even if reversible, it should be taken into account in the development of innovative analytical methods.

2.5. Conclusion

To summarize, we report here the use of off-line CZE-UV/ESI-MS for the middle-up characterization of Fc/2 variant of cetuximab. To validate the method, developed CZE offline instrumental setting was implemented to perform direct deposition of collected fractions on a MALDI target and used to characterize IdeS proteolytic digest fragments by MALDI-TOF MS. Results obtained demonstrated successful CZE-UV/MALDI-MS characterization. MS spectra were in complete agreement with the separation observed by the intermediate of the UV detection. Additionally data generated allowed to exclude overlapping during the collection and deposition process validating the instrumental approach regarding accuracy and robustness. In order to investigate further the separation of three different species corresponding to Fc/2 variants, CZE-UV/ESI-MS experiments were performed on cetuximab treated consequently with IgGZERO and IdeS enzymes to permit the removal of N-glycosylation present in the Fc region of the protein. Results showed that chemical structure of N-glycosylation expressed on the Fc region of cetuximab does not influence CZE separation as both revealed similar UV electropherograms. A similar analysis was then realized on cetuximab treated successively with CP-B and IdeS in order to systematically remove C-terminal lysine from the Fc/2 fragments generated. Results from the CZE separation exhibited the absence of two peaks compared to the same separation using cetuximab solely treated with IdeS. As expected from the CZE conditions employed, C-terminal lysine is significantly influencing separation. Finally direct nanoESI-MS infusion of the collected fractions from CZE separation were performed using different buffering systems, one which is similar to CZE background electrolyte composed of ammonium acetate 25 mM, pH 5.70, and in parallel in denaturing conditions favoring ionization efficiency and signal sensitivity. In similar conditions as CZE separation, MS allowed to identify without ambiguity the nature of each analyte separated by CZE. MS spectra obtained revealed the first specie to be Fc/2 homodimer while the second specie detected was Fc/2/Fc/2-K heterodimer and the last one being Fc/2-K homodimer. Results demonstrated to be in agreement regarding the influence of C-terminal lysine on the separation but additionally showed the formation of Fc/2 aggregates as a consequence of IdeS proteolytic digestion. Results from the

different experiments demonstrated the relevance of this CZE-UV/ESI-MS analytical method developed to perform the comprehensive middle-up characterization of mAbs. Indeed it was possible to conclude of the formation of Fc/2 aggregates generated consequently from cetuximab IdeS treatment. As this enzyme recently tends to be widely used, due its exceptional specificity, for mAbs characterization, aggregation related to sample treatment appears as a new insight which should be taken into account during method development. The implementation of an electrophoretic separation prior to the MS analysis showed its interests in this work as separation efficiency provided by CZE allowed to completely separate the different types of aggregates while showing the possibility to maintain these aggregates. Moreover, the Fc region of mAbs is common to many new platforms and these results could improve the characterization of Fc region of biotherapeutics and their potential non-covalent interactions.

2.6. Acknowledgments

Authors would like to thank Sciex separations Inc. for lending a CESI8000 system and Dr. M. Anselme from Sciex for his support. The authors would like also to express their gratitude to Dr. E. Wagner-Rousset, MC. Janin-Bussat and O. Colas (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France) for helpful discussions around antibody structural characterization

2.7. References

- [1] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly, N. Corvaia, Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 345-352.
- [2] J.M. Reichert, Marketed therapeutic antibodies compendium, *mAbs* 4 (2012) 413-415.
- [3] A. Beck, H. Diemer, D. Ayoub, F. Debaene, E. Wagner-Rousset, C. Carapito, A. Van Dorselaer, S. Sanglier-Cianferani, Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins, *Trac-Trends Anal. Chem.* 48 (2013) 81-95.
- [4] J.N. Arnold, M.R. Wormald, R.B. Sim, P.M. Rudd, R.A. Dwek, The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 21-50.
- [5] Z.Q. Zhang, H. Pan, X.Y. Chen, Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies, *Mass Spectrom. Rev.* 28 (2009) 147-176.
- [6] J.V. Ravetch, J.P. Kinet, Fc Receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492.
- [7] M. Torres, A. Casadevall, The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity, *Trends Immunol.* 29 (2008) 91-97.
- [8] A. Braun, L. Kwee, M. Labow, J. Alsenz, Protein Aggregates Seem to Play a Key Role Among the Parameters Influencing the Antigenicity of Interferon Alpha (IFN- α) in Normal and Transgenic Mice, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1472-1478.
- [9] H. Schellekens, Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1 (2002) 457-462.

- [10] H. Wu, R. Kroe-Barrett, S. Singh, A.S. Robinson, C.J. Roberts, Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies, *FEBS Lett.* 588 (2014) 936-941.
- [11] C.B. Andersen, M. Manno, C. Rischel, M. Thorolfsson, V. Martorana, Aggregation of a multidomain protein: A coagulation mechanism governs aggregation of a model IgG1 antibody under weak thermal stress, *Prot. Sci.* 19 (2010) 279-290.
- [12] R.K. Brummitt, D.P. Nesta, L.Q. Chang, S.F. Chase, T.M. Laue, C.J. Roberts, Nonnative Aggregation of an IgG1 Antibody in Acidic Conditions: Part 1. Unfolding, Colloidal Interactions, and Formation of High-Molecular-Weight Aggregates, *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 2087-2103.
- [13] A. Beck, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselaer, Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4637-4646.
- [14] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianféran, Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products, *Anal. Chem.* 85 (2013) 715-736.
- [15] A. Beck, F. Debaene, H. Diemer, E. Wagner-Rousset, O. Colas, A.V. Dorsselaer, S. Cianféran, Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 285-297.
- [16] R. Gahoual, M. Biacchi, J. Chicher, L. Kuhn, P. Hammann, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.N. Francois, Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, *Mabs* 6 (2014) 1464-1473.
- [17] R. Gahoual, J.-M. Busnel, A. Beck, Y.-N. François, E. Leize-Wagner, Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9074-9081.
- [18] X. Han, Y. Wang, A. Aslanian, M. Bern, M. Lavalley-Adam, J.R. Yates, Sheathless Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry for Top-Down Characterization of *Pyrococcus furiosus* Proteins on a Proteome Scale, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11006-11012.
- [19] L.L. Sun, M.D. Knierman, G.J. Zhu, N.J. Dovichi, Fast Top-Down Intact Protein Characterization with Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5989-5995.
- [20] Y. Zhao, N.M. Riley, L. Sun, A.S. Hebert, X. Yan, M.S. Westphall, M.J.P. Rush, G. Zhu, M.M. Champion, F.M. Medie, P.A.D. Champion, J.J. Coon, N.J. Dovichi, Coupling Capillary Zone Electrophoresis with Electron Transfer Dissociation and Activated Ion Electron Transfer Dissociation for Top-Down Proteomics, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5422-5429.
- [21] M. Biacchi, R. Bhajun, N. Saïd, A. Beck, Y.N. François, E. Leize-Wagner, Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface, *Electrophoresis* 35 (2014) 2986-2995.
- [22] 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.
- [23] M. Biacchi, R. Gahoual, N. Said, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6240-6250.
- [24] K. Wenig, L. Chatwell, U. von Pawel-Rammingen, L. Bjorck, R. Huber, P. Sonderrmann, Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG, *P. Nat. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 17371-17376.

- [25] B. Vincents, U. von Pawel-Rammingen, L. Bjorck, M. Abrahamson, Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding, *Biochem.* 43 (2004) 15540-15549.
- [26] D. Ayoub, W. Jabs, A. Resemann, W. Evers, C. Evans, L. Main, C. Baessmann, E. Wagner-Rousset, D. Suckau, A. Beck, Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques, *Mabs* 5 (2013) 699-710.
- [27] H. Wu, K. Truncali, J. Ritchie, R. Kroe-Barrett, S. Singh, A.S. Robinson, C.J. Roberts, Weak protein interactions and pH- and temperature-dependent aggregation of human Fc1, mAbs, (2015) DOI: 10.1080/19420862.2015.1079678.
- [28] Y.F. Shen, R.D. Smith, High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 135-141.
- [29] H.C. Liu, G. Gaza-Bulsecu, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426-2447.
- [30] T.S. Raju, B.J. Scallan, Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 341 (2006) 797-803.
- [31] B. Antes, S. Amon, A. Rizzi, S. Wiederkum, M. Kainer, O. Szolar, M. Fido, R. Kircheis, A. Nechansky, Analysis of lysine clipping of a humanized Lewis-Y specific IgG antibody and its relation to Fc-mediated effector function, *J. Chromatogr. B*, 852 (2007) 250-256.
- [32] R. Gahoual, J.M. Busnel, P. Wolff, Y.N. Francois, E. Leize-Wagner, Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1029-1038.
- [33] E.J. Nettleton, M. Sunde, Z.H. Lai, J.W. Kelly, C.M. Dobson, C.V. Robinson, Protein subunit interactions and structural integrity of amyloidogenic transthyretins: Evidence from electrospray mass spectrometry, *J. Mol. Biol.* 281 (1998) 553-564.
- [34] J.L.P. Benesch, B.T. Ruotolo, D.A. Simmons, N.P. Barrera, N. Morgner, L.C. Wang, R. Helen, C.V. Robinson, Separating and visualising protein assemblies by means of preparative mass spectrometry and microscopy, *J. Struct. Biol.* 172 (2010) 161-168.
- [35] D. Touboul, L. Maillard, A. Grasslin, R. Moumne, M. Seitz, J. Robinson, R. Zenobi, How to Deal with Weak Interactions in Noncovalent Complexes Analyzed by Electrospray Mass Spectrometry: Cyclopeptidic Inhibitors of the Nuclear Receptor Coactivator 1-STAT6, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 303-311.

Supplementary information

Figure S-1. ESI-MS spectra of Fc/2 subunits. The MS peaks were labeled with the correspondent glycoform.

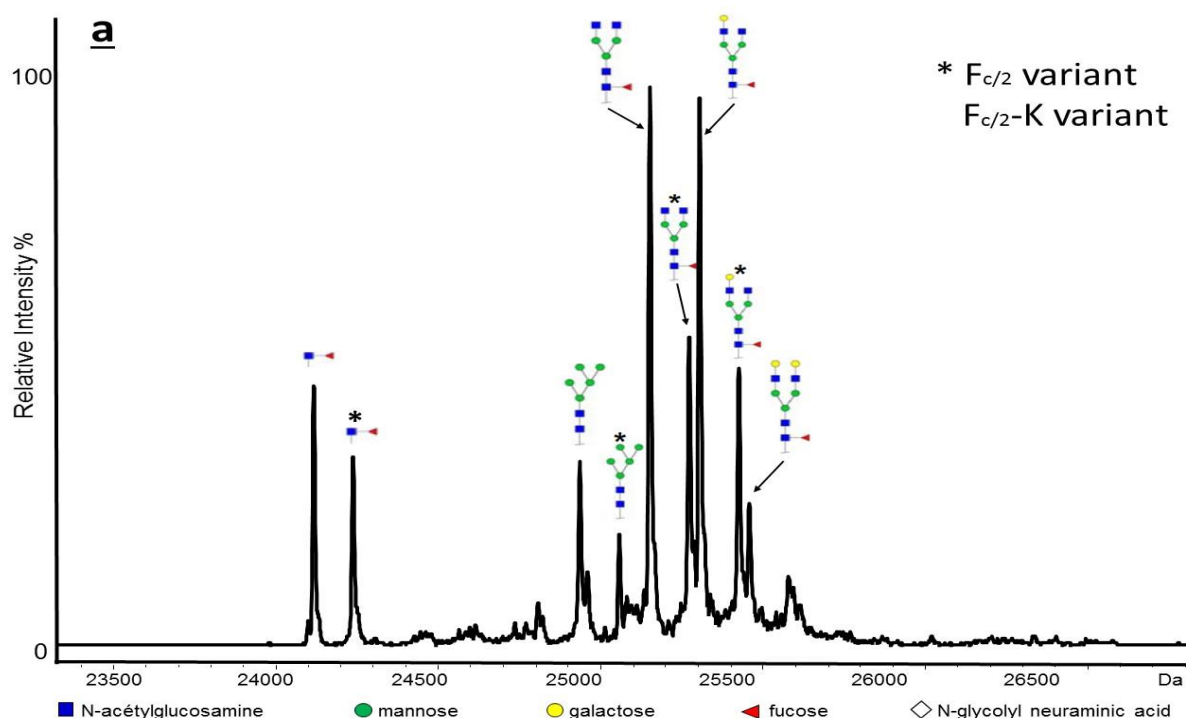


Figure S-2. (a) Off line CE-UV/ESI-MS separation of middle-up cetuximab charge variants. (b) Mass spectra corresponding to the 3 major peaks. Experimental conditions: Inlet BGE: EACA 200 mM acetate ammonium 25 mM pH 5.70 and outlet BGE: ammonium acetate 25 mM pH 5.70; other conditions: See Figure 1, MS Experimental conditions: See Experimental section; sample, IdeS digest of cetuximab (5 µg/µL); sample injection 0.5 psi 50s.

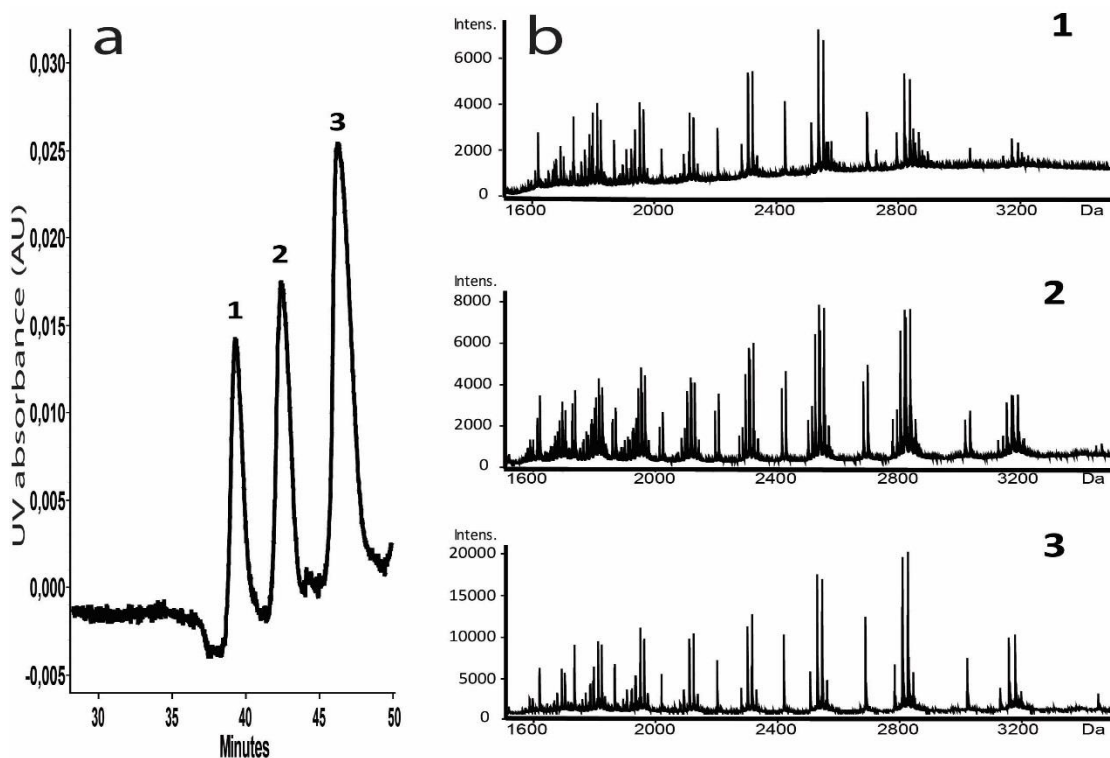


Table S-1: Theoretical and measured masses of the Fc/2 subunit identified glycoforms

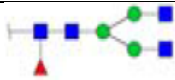
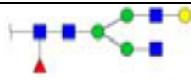
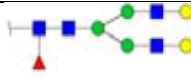
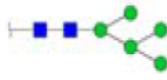
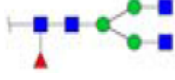
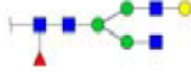
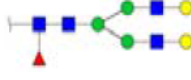
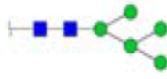
Glycosylated Fc/2	Glycan structure	Theoretical Mw (Da)	Measured Mw (Da)
Fc/2		25359.6	25359.1
Fc/2		25521.7	25521.4
Fc/2		25683.7	25683.2
Fc/2		25131.5	25131.3
Fc/2		24264.2	24263.7
Fc/2-K		25231.4	25231.1
Fc/2-K		25393.5	25393.7
Fc/2-K		25555.5	25555.4
Fc/2-K		25003.3	25002.7
Fc/2-K		24136.0	24134.9

Table S-2: Theoretical and measured masses of the Fc/2 dimers identified glycoforms

Fc/2 Dimers	Glycan structure	Theoretical Mw (Da)	Measured Mw (Da)
F _{c/2} -K/F _{c/2} -K		50463	50465
F _{c/2} -K/F _{c/2} -K		50625	50627
F _{c/2} -K/F _{c/2} -K		50786	50788
F _{c/2} -K/F _{c/2} -K		50949	50949
F _{c/2} /F _{c/2} -K		50591	50594
F _{c/2} /F _{c/2} -K		50753	50754
F _{c/2} /F _{c/2} -K		50915	50915
F _{c/2} /F _{c/2} -K		51077	51078
F _{c/2} /F _{c/2}		50719	50723
F _{c/2} /F _{c/2}		50881	50883
F _{c/2} /F _{c/2}		51043	51046

3. Conclusion

Lors de ce travail, nous avons utilisé notre stratégie développée dans la partie précédente (Chapitre I. Séparation et caractérisation de glycoformes de Cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS) mettant en jeu le couplage indirect de la CZE-UV/nanoESI-MS, pour la caractérisation de variant de charges du domaine Fc/2 du cetuximab. La séparation électrophorétique correspondant au domaine Fc/2 du cetuximab comporte trois pics. Cependant, seuls deux variants de masses dus à la perte d'une lysine en C-terminal de la HC ont été caractérisés en MS. Afin d'expliquer la présence de ces trois pics électrophorétiques, nous avons dans un premier temps, validé notre stratégie instrumentale en réalisant la même séparation à l'aide du couplage CE-UV/MALDI-MS. La reconstruction des spectres MALDI-MS issue de la séparation CZE ont permis d'obtenir trois pics correspondant à des masses de 25 kDa. Ceci certifie l'absence de phénomènes de diffusion durant le processus de déposition de l'échantillon confirmant la robustesse du couplage. Dans le but de vérifier le potentiel rôle de la structure des N-glycosylations ainsi que de la perte de lysine en C-terminal de la HC sur la séparation électrophorétique, deux séparations CZE-UV/ESI-MS d'un échantillon de cetuximab respectivement déglycosylé et débarrassé de leur lysine en C-terminal, ont été réalisées. Concernant les glycosylations, aucune différence entre les électrophérogrammes des échantillons glycosylés et déglycosylé n'a été observée. Ceci permet de conclure sur la non-influence de la nature des glycosylation sur la séparation CZE. Concernant l'absence de lysine en C-terminal de la HC, les résultats montrent la perte des deux premiers pics de la séparation CZE démontrant une influence importante de cette propriété de la molécule. La caractérisation MS basée sur l'infusion nanoESI de chaque fraction collectée de la séparation MS, ont été réalisés à l'aide de différents électrolytes : une solution d'infusion similaire aux conditions de CZE (25 mM acétate d'ammonium pH 5,7) et une solution d'infusion classiquement utilisée en condition dénaturante (eau/acétonitrile/acide formique 49/50/1). Dans les conditions de la séparation CZE, la MS a permis d'identifier sans ambiguïté la nature de chaque analyte séparé. En effet, les spectres MS ont mis en évidence la présence d'homodimères de Fc/2 correspondant au premier pic de la séparation, la présence d'hétérodimères de Fc/2/Fc/2-K pour le second pic et d'homodimères de Fc/2-K pour le dernier pic. Ces résultats confirment l'influence de la présence ou non de lysine en C-terminal de la HC sur la séparation CZE. De plus la mise en œuvre d'une séparation électrophorétique avant l'analyse MS a montré son intérêt notamment pour séparer des complexes non-covalents tout en montrant la possibilité de maintenir ces agrégats en solution.

Chapitre 3 : Approche middle-down pour la caractérisation de fragments Fc/2 de cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS

1. Introduction

A ce jour, la caractérisation fine et à différents niveaux (intact, partiellement digérée ou suivant un protocole de digestion complète) de mAbs, apparaît comme un défi important pour les sciences analytiques. Un très grand nombre de techniques analytiques incluant les méthodes séparatives couplées à la spectrométrie de masse HPLC-MS et CE-MS, ont été mises en œuvre pour l'identification et la caractérisation des mAbs. Les travaux précédemment décrits dans la Partie 2 (Résultats Caractérisation d'anticorps monoclonaux par approche middle-up et top-down à l'aide du couplage indirect CE-MS) ainsi que les différentes études menées ces cinq dernières années au laboratoire LSMIS ont contribué à démontrer les possibilités des couplages CE-ESI-MS et CE-MALDI-MS en tant que méthodes analytiques de choix pour l'étude de protéines thérapeutiques. En effet, un grand nombre d'interfaces CE-MS a été développé depuis la fin des années 1980. Le couplage CE-MS a principalement été décrit avec une interface mettant en jeu la source ESI. Cependant, certaines limites telles que la nature du BGE (présence de sel, volatilité) ont ouvert la voie au développement du couplage CE-MALDI-MS plus tolérant à la présence de sels. En 2014, le laboratoire LSMIS a construit une interface CE-UV/MALDI-MS automatisée pouvant réaliser un dépôt de matrice directement sur plaque avant analyse MALDI-MS. Ce travail auquel j'ai participé lors de mon stage de Master 2 a permis de réaliser la première séparation de mAbs intact à l'aide d'un couplage CE-MS. Cependant, les limites du MALDI-MS en terme de résolutions pour l'analyse de protéines de haut poids moléculaires n'ont pas permis de mesurer la masse exacte des différents variants de charge observés sur l'électrophérogramme UV.

Les approches de type « top-down » ou « middle-down » représentent une alternative intéressante pour obtenir des informations structurales de protéines. Ces méthodes de type « down » sont définies par un processus de fragmentation moléculaire se produisant principalement en phase gazeuse à l'intérieur du spectromètre de masse.

L'analyse MS est donc réalisée sur la protéine intacte. La différence entre une méthode « top-down » et « middle-down » vient d'une modification du traitement de l'échantillon avant analyse MS. En effet, alors que la méthode « top-down » est définie par l'analyse de la fragmentation d'une protéine entière, une méthode « middle-down » correspond à la caractérisation suivant les mêmes processus de fragmentation de larges fragments de protéines ayant subi une digestion enzymatique limitée. Plusieurs approches top-down ont été

mises en œuvre pour identifier des protéines, tel que la fragmentation directement dans la source MALDI (ion source decay ; ISD), la dissociation par capture d'électron (electron-capture dissociation ; ETD) ou la dissociation par transfert d'électron (electron-transfer dissociation ; ECD). En raison de la nature du couplage mis en jeu dans ce chapitre, le mode de fragmentation utilisé sera le MALDI-ISD. Cependant, ce mode de fragmentation connaît aussi certaines limitations. En effet, la complexité des spectres MS/MS obtenus par fragmentation ISD nécessite l'analyse des protéines intactes préalablement séparées sur la plaque MALDI. De plus, pour obtenir des spectres MS/MS de bonne qualité, le MALDI-ISD a besoin d'une forte quantité d'échantillon ce qui n'est pas compatible avec le caractère miniaturisé de la CE. L'enrichissement de l'échantillon par collection de fraction à l'aide du couplage CE-UV/MALDI-MS apparaît donc comme une stratégie intéressante pour augmenter la quantité d'échantillon à analyser.

Dans ce chapitre, nous avons développé une méthode analytique à l'aide du couplage CE-UV/MALDI-MS permettant l'analyse top-down ou middle-down de protéines entières et de mAbs après enrichissement par collection de fraction. Les performances de la méthode ont été étudiées, dans un premier temps, sur une séparation de trois protéines modèles. L'étape d'enrichissement par collection de fraction de l'échantillon a été évaluée en termes de répétabilité et de robustesse. Cette première étape a permis de réaliser la preuve de concept de notre stratégie sur des protéines de poids moléculaires moyens (< 14 kDa). L'étape suivante a consisté à valider notre approche pour la caractérisation middle-down de mAbs avec l'étude des variants de charge Fc/2 du cetuximab. Cette étude fait suite aux deux chapitres précédent qui ont déjà largement décrit l'étude des variants de charge Fc/2 du cetuximab à l'aide du couplage CE-MS.

2. Top-down and middle-down approach by fraction collection enrichment using Off-line capillary electrophoresis – mass spectrometry coupling: application to monoclonal antibody Fc/2 charge variants

Michael Biacchi, Nassur Said, Alain Beck, Emmanuelle Leize-Wagner, Yannis-Nicolas François, *Journal of Chromatography A* 2017, 1498, 120-127.

2.1. Abstract

The characterization of complex protein mixtures represents one of the biggest challenge in many research fields such as biological or biopharmaceutical sciences. Out of all categories, monoclonal antibodies (mAbs) and related products drawn the most interest due to their strong therapeutic potency and specificity. Because of their intrinsic complexity due to a large number of micro-heterogeneities, there is a crucial need for analytical methods to provide comprehensive in-depth characterization of these proteins. In this work, we developed a methodology using CE-UV/MALDI-MS to perform top-down or middle-down characterization after fraction collection enrichment applied to intact protein and mAbs samples. The performance of the method was evaluated with the rapid separation of three intact protein mixture. Good robustness of CZE separation and quality of MALDI-MS spectra and MALDI-MS/MS spectra of each protein confirms the usefulness of sample enrichment to obtain adequate quantity of deposited protein for top-down analysis and the proof of principle of the method. In a second step, the method was applied to the middle-down characterization of Fc/2 cetuximab variants. Identification of around 9% sequence coverage of Fc/2 cetuximab fragments allows to conclude on the feasibility of the strategy for middle-down characterization of Fc/2 cetuximab variants using CE-UV/MALDI-MS. Moreover, MALDI-MS/MS fragmentation of Fc/2 cetuximab variants confirm separation phenomenon based on the formation of Fc/2 dimers with and without C-terminal truncation.

2.2. Introduction

One of the deeper challenge in many research fields such as biopharmaceutical [1, 2] or biological sciences [3-5] is the characterization of complex protein mixtures. Since the middle of the 80s, monoclonal antibodies (mAbs) have taken a major market share in the pharmaceutical industry [6, 7] . mAbs are particularly interesting because they have good therapeutic efficiency, favorable pharmacokinetic and pharmacodynamics, and lead to reduction of side-effects [8]. mAbs are highly complex glycoproteins potentially displaying many naturally-occurring molecular micro-heterogeneities. There is a continuous need for analytical methods improvement to be able to give accurate characterization. Today, a plethora of separation technique based both on liquid chromatography and electrophoresis are used for antibody characterization and homogeneity assessment [9]. Concerning detection, the method of choice for the identification of proteins and peptides is mass spectrometry (MS) [10] generally coupled with separation techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC) or capillary electrophoresis (CE). Technically, HPLC-MS is the most widely used coupling thanks to its high reproducibility and its great resolution but also especially for the relative ease of coupling with a mass spectrometer. However, CE represent an alternative to HPLC due to its ability to separate intact protein [5]. Advantages of CE are fast separation, high efficiency and high resolution. However, properties of CE such as nature of background electrolyte (BGE) and the necessity of maintaining the electric field during the separation make the CE-MS coupling more difficult to implement [11, 12]. Nevertheless, despite these technical aspects, CE-MS hyphenation appears as a very attractive coupling allowing to perform significant advances in many research areas such as proteomics [13-15], biotherapeutics [16-18] and intact protein characterization [19, 20]. A large number of CE-MS interfaces has been developed preferably with electrospray ionization (ESI) [21-23]. However, the nature of the BGE (presence of salts, volatility) can affect the stability of the spray and then limits the choice of BGE to those that do not interfere with MS performance. This negative aspect is particularly observed for biotherapeutics characterization [24, 25]. In the recent paper of our team, we developed an off-line CE-UV/MALDI-MS interface with integrated delivery matrix system to allow the separation of intact protein and biotherapeutics [26]. In this work, we performed the first analysis of intact mAb charge variants by CZE using a MS detection. However, limitation of MALDI-MS resolution for large molecules does not allow to measure the exact mass of the charge variants and does not give any structural information [26]. Top-down and middle-down approaches provide such alternative to obtain structural information using CE-UV/MALDI-MS. A “down”-type method is defined when the fragmentation happens primarily in the gas phase inside the mass spectrometer. Then, the mass spectrometer is used to analyze the entire molecule directly [27, 28]. As top-down defined by characterization using fragmentation of intact protein, middle-down refers to MS/MS-based sequencing of large fragments of a protein after limited proteolysis [29]. There are number of mass spectrometric techniques that have been used to identify proteins by

top-down approach including MALDI ion source decay (ISD) [30], electron-capture dissociation (ECD) [31] or electron-transfer dissociation (ETD) [32]. In the following report, MALDI-ISD will be used as fragmentation method. A well-known issue of top-down characterization is due to dynamic range limitation in regards to the complexity of the sample [27]. Top-down proteomic requires purified intact protein potentially provided by CZE separation prior to MS detection. Moreover to obtain good ISD spectra quality, MALDI-ISD requests quantity of sample which is not compatible with the miniaturized aspect of CE [33]. As a strategy to increase the level of sample, enrichment by fraction collection can be realized using the off-line CE-UV/MALDI-MS interface.

In this report, we used CE-UV/MALDI-MS system developed in house to allow top-down or middle-down characterization after fraction collection enrichment applied for intact protein and mAbs samples. As a preliminary study, the performance of the method was evaluated with the rapid separation of three intact protein mixtures. Repeatability and robustness of the method were confirmed to allow enrichment by fraction collection. The proof of principle of the method was assessed with comparison of top-down analysis of the different fractions after single or pooled multiple fractions from several repetition of separation of the same sample. Finally, to validate the strategy for the characterization of mAbs, middle-down characterization of Fc/2 cetuximab variant have been performed using CE-UV/MALDI-MS. The mAb selected was cetuximab which is human/murine chimeric IgG-1 directed against the epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpressed in advanced-stage EGFR positive colorectal cancer. Cetuximab was approved in the US and EU in 2004 and 2005. Cetuximab contains two glycosylation sites both on the heavy chain (HC) [34]. Moreover, it has a large number of micro-heterogeneities such as PTMs and it also has one C-terminal lysine truncation. The knowledge of our group about the characterization of this mAb using MS [35-37] makes cetuximab an ideal sample for the assessment of the described method.

2.3. Experimentals

Chemicals. Chemicals used were of analytical grade or high purity grade and purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). Cytochrome c (Cyt c), ribonuclease A ((RNase A), lysozyme (Lys), were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). IdeS (Immunoglobulin-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*) also named FabriCATOR was purchased from Genovis (Lund, Sweden). Cetuximab samples are the EMA/FDA approved formulation purchased Merck (Whitehouse Station, NJ, USA).

Middle-up sample preparation. Cetuximab was cleaved in the hinge region using limited proteolysis by IdeS (FabriCATOR, Genovis) to obtain two Fc/2 fragments (theoretical pI 7.74) and one F(ab')₂ fragment (theoretical pI 7.78). Sample was diluted using 147.25µL of 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH

6.60, to a final concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A volume of 2.25 μL of IdeS (67 units/ μL) was added to the sample which was left at 37°C for 30 min. After digestion completion, sample was desalted using Amicon centrifugal filters (cut off = 10,000 Da) in pure water at 10°C and 14,000 g for 20 min. After desalting step, sample volume recovered was about 10 μL . Sample was finally diluted to a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in a total volume of 30 μL of pure water.

Capillary electrophoresis. The CE experiments were carried out on a P/ACE MDQTM CE system from Sciex Separation (Brea, CA) equipped with a temperature controlled autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. A 32 KaratTM (Siex Separation, Brea, CA) was used for instrument control, data acquisition and data handling. Polymicro bare fused-silica capillaries of 50 μm i.d., 375 o.d. were obtained from Photonlines (St-Germain-en-Laye, France). Concerning modified capillaries, capillaries were coated in laboratory with hydroxypropylcellulose (HPC) following the protocol described by Shen *et al.* [38]. For Cetuximab separation, inlet BGE 200 mM ϵ -Amino-caproic acid (EACA)-ammonium acetate 25 mM pH 5.7 and outlet BGE ammonium acetate 25 mM pH 5.7 have been used as separation condition. Injection volumes have been calculated using CEToolbox application (Pansanel, GooglePlay).

CZE/Fraction Collection Interface. This interface have been described in a previous study [26]. Briefly, automated off-line coupling of CZE to MS was set up by using a homemade modified automatic spotting device Proteineer FC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for the sheath flow-assisted spotting from the CZE capillary outlet onto a fraction collection target. The original set up of the UV cell in the P/ACE MDQTM (Sciex Separation, Brea, CA) was delocalized outside the CE instrument in order to allow simultaneous UV detection and fractions collection. Hystar 3.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used for Proteineer FC control.

MALDI-TOF-MS. The matrix was prepared by dissolving 2,5-dihydroxybenzo  que (DHB) (2g.L-1) in 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile (TFA/ACN) (30/70). Fraction collection was realized using Ground Steel MALDI target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Mass spectra of the CE fractions were recorded using an Autoflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), operating in reflector mode and with FlexControl software. Positively charged ions were detected and sums of 2000 single-shot spectra were acquired automatically from each sample by using the AutoXecute software. For Top-down approach, sums of 15000 single-shot spectra were acquired automatically from each sample. Data processing was performed with FlexAnalysis 3.0 provided by the mass spectrometer manufacturer. All spectra were calibrated according an external calibration using Protein calibration standard I (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for intact protein separation.

2.4. Results and discussions

2.4.1. Evaluation of enrichment by fraction collection using CE-UV/MALDI-MS.

To enrich the fractions and achieve adequate sample amount for top-down analysis, we need to run multiple repetition of separation of the same sample without degradation or change in mobilities. As a preliminary study to evaluate CE-UV/MALDI-MS coupling to perform enrichment by fraction collection, the robustness and the repeatability of CE-UV/MALDI-MS interface has been confirmed following the optimized separation conditions described in precedent studies [26, 39]. Briefly, a neutral HPC coated capillary has been used with a standard protein mixture, containing Cyt c, Lys and RNase A at 40nM, 40 nM, 50nM respectively. Samples were introduced into the capillary by electrokinetic injections (3 kV, 8 min), and the separation of proteins was performed by applying 20 kV across the capillary. Electropherogram obtained with the external UV detection, located at 10 cm from the outlet when the total length of the capillary is 60 cm, allowed optimizing the spotting process concerning the deposit window and deposit time interval (Fig. 1a). In term of migration time, peak area and resolution, obtained RSD (n=4) are less than 0.5%, 2.5% and 3% respectively. Moreover, calculated signal-to-noise ratio are ranging from 6 to 52.

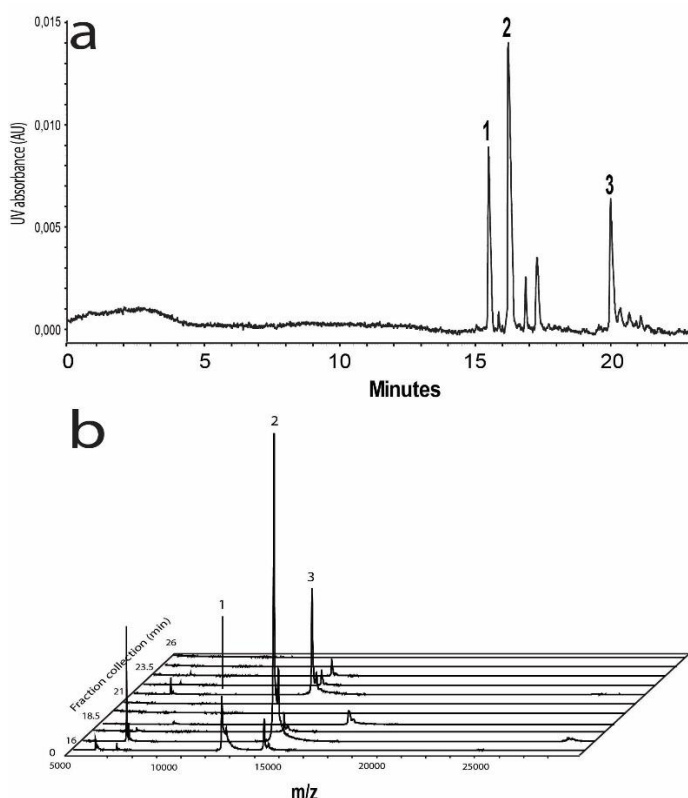


Fig. 1. (a) UV Electropherogram with fraction collection and (b) the corresponding MS spectra of each fraction of a three protein sample by CE-UV/MALDI-MS. Experimental conditions: HPC coated capillary, 50 μ m d.i. x 60 cm (detection cell, 60 cm); BGE: 83.3mM ionic strength ammonium acetate (pH 4.0); Voltage: 20 kV; Temperature: 25°C; UV Detection: 200 nm; Injection: 3 kV, 8 min; Sample: (1) 40 nM Cyt c, (2) 40 nM Lys and (3) 50 nM RNase A in water, MS Experimental conditions: See Experimental.

Values of migration times allows defining the window of fraction collection, and assessing time interval for each deposit which represent a primordial criteria to perform enrichment. In our study, fraction collection window has been defined between 15 and 23 minutes and a spotting time interval of 30 s has been chosen. Fig. 1 shows the UV electropherogram with fraction collection (Fig.1a) and the representation of the experimental fraction using MS spectra of each spotting position (Fig. 1b). Concerning the deposition process, correlation between UV electropherogram and the corresponding MS spectra of each fraction of a three protein sample shows a preservation of the resolution and efficiency [26]. These results then approve that the CE-UV/MALDI-MS interface allows acquiring electropherograms and deposition process with great quality, high repeatability and a good robustness to realise enrichment by fraction collection.

To assess sample enrichment, comparison of CE-UV/MALDI-MS studies between a single deposit analysis and the collection fraction from repetition of three separation of the same sample have been realized. Time of one deposit analysis represents 35 min while total time of three repetition represents around 2 hours. Deposit parameters are similar to those described above. Only spotting time interval have been change. The fraction collection process developed in this study based on the apparent mobility of each peak described by the equation:

$$\mu_{app} = \frac{L l}{t_m V}$$

with μ_{app} the apparent mobility which is the sum of effective mobility and residual electroosmotic flow, L and l the total capillary length and length to detection window, respectively, V the applied voltage and t_m the migration time. Deposition time t_d is then calculated by the equation:

$$t_d = \frac{L^2}{\mu_{app} V}$$

This strategy permits to collect three different fractions allowing theoretically to recover the total quantity of each protein present in each peak.

The results presented in Fig. 2 show the CE-UV separation of the three proteins and the corresponding MALDI-MS spectra of each peak with and without enrichment. For the three model protein, a significant increase of the signal have been observed between the single deposition experiment and the pooled fractions corresponding to

three repetitions of separation of the same sample. This confirms the good enrichment process of the sample with the absence of carryover effect and diffusion phenomenon. Then, the presence of intact proteins in the different fractions and directly deposit in the MALDI target plate, allows for the analysis with a top-down proteomic strategy.

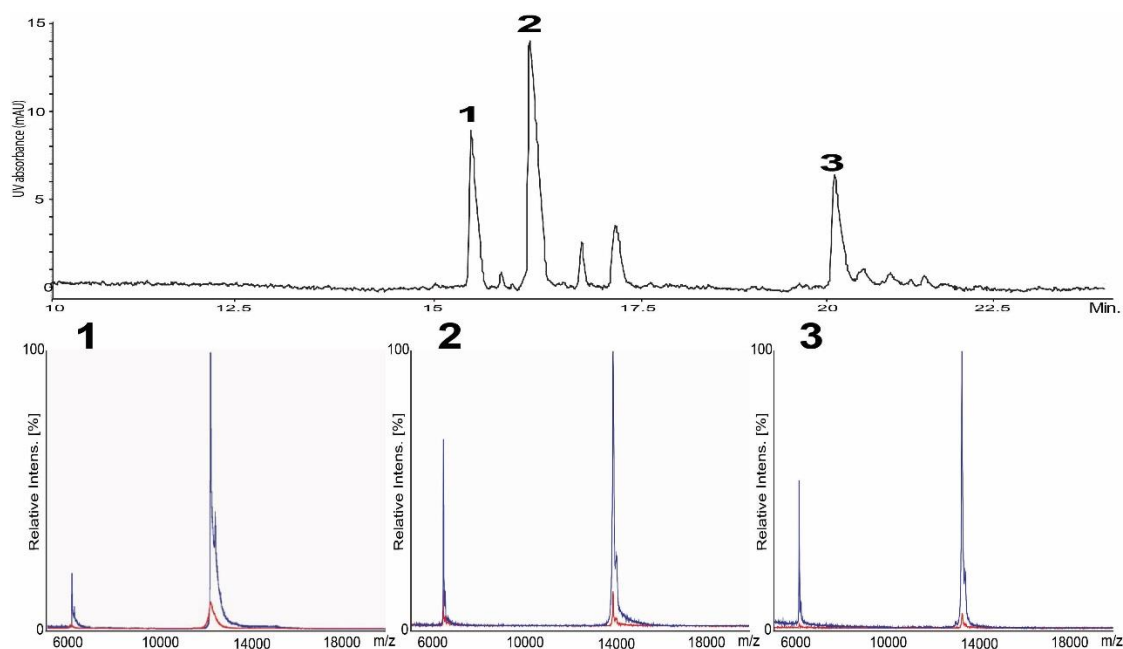


Fig. 2. UV Electropherogram with fraction collection and MS spectrum of (1) Cyt c, (2) Lys and (3) RNase A from CE-UV/MALDI-MS analysis. (Red spectrum) single deposition on the MALDI target-plate. (Blue spectrum) Enrichment of three repetitions on the same MALDI target-plate

2.4.2. Top-down characterization of intact protein using CE-UV/MALDI-MS.

As described below, the good robustness and repeatability of the CE-UV/MALDI-MS interface permit to perform separation and enrichment of sample in order to obtain fraction of pure and intact protein. To demonstrate the proof of principle of top-down characterization using CE-UV/MALDI-MS coupling, analysis of each fraction using ISD fragmentation process with MALDI-MS has been performed. DHB matrix in 0.1% TFA/ACN (30/70) was deposit on each fraction directly on the MALDI target plate. ISD experiments were realized using the same Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen) previously employed for enrichment studies. Due to the age of the mass spectrometer (2006), the laser power significantly increase by a factor 1.5 as compared to the classical MS experiments. To assess the importance of sample enrichment to perform top-down analysis, ISD fragmentation have been realized in the deposit of a single separation and the collection fraction from repetition of three separation of the same sample. The results presented Fig.3 show the ISD fragmentation of the three peaks of the CE-UV electropherogram (Fig. 1a) corresponding to Cyt c, Lys and RNase A respectively. For each protein, ISD spectra have been done for one deposit (red) and for fraction collection of three repetition of separation (blue). Corresponding single deposit ISD spectra, results show no

fragmentation process for each protein. This confirms that the amount of protein in each fraction are not sufficient to allow fragmentation by MALDI-MS/MS top-down approach. Concerning enrichment sample by three repetition of separation, MS/MS spectra shows protein fragmentation for each peak. As expected below, no carryover and diffusion phenomenon have been observed. These results confirm the usefulness of enriching the sample before top-down analysis to increase the amount of each protein. Regarding MS/MS spectra of each protein, the results presented in Fig. 3 allow to identify 17 amino acids (AA) for Cyt c, 19 AA of Lys and 24 AA of RNase A corresponding to 17%, 14% and 20% sequence coverage respectively. The low percentage of sequence coverage obtained in this study can be explained by our MALDI instrument dating from 2006.

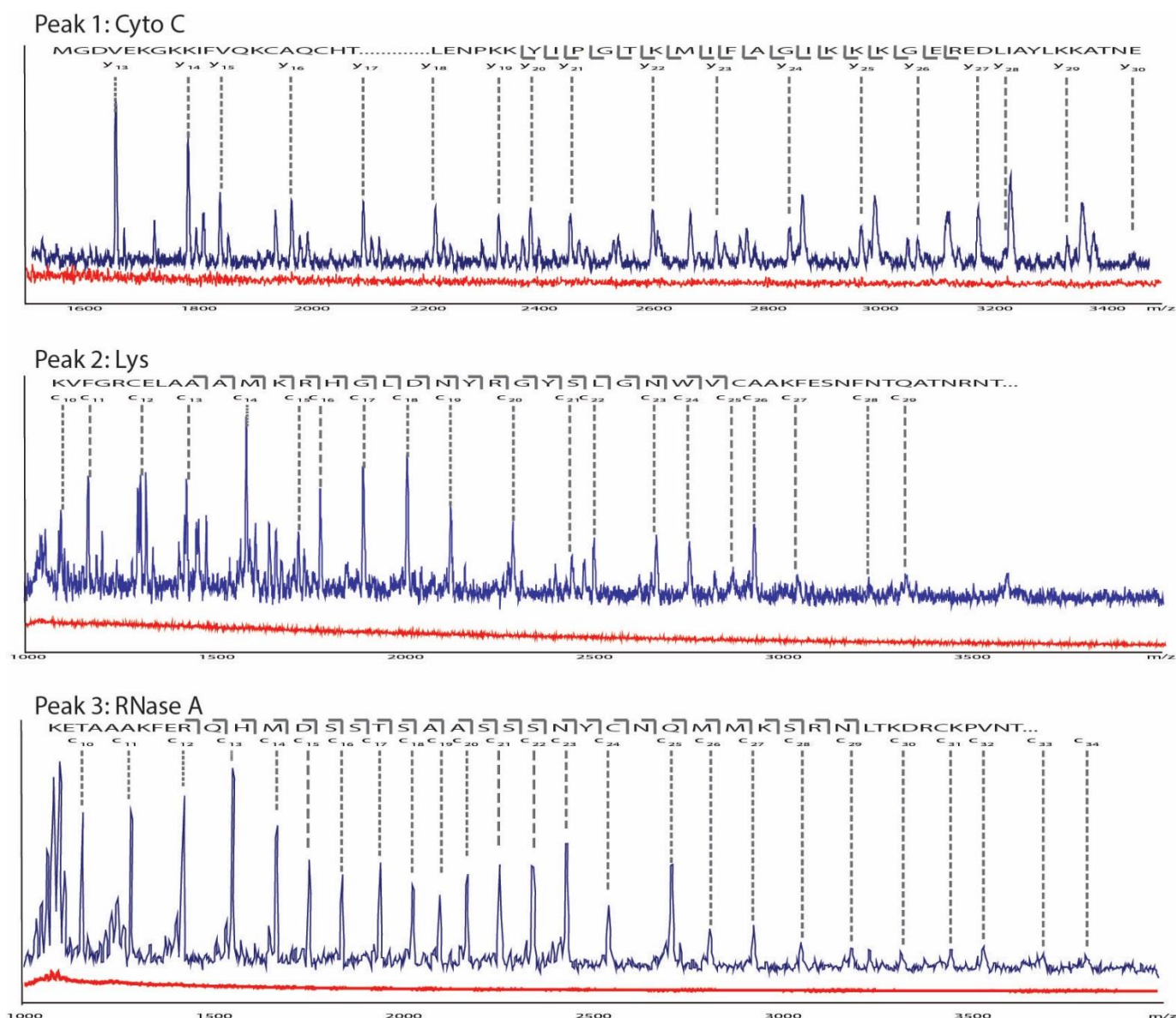


Fig. 3. Top-down MALDI-MS/MS spectra of Cyt c (peak 1), Lys (peak 2) and RNase A (peak 3) from CE-UV/MALDI-MS/MS analysis of a solution of three proteins with fraction collection (see Fig. 1). (Red spectrum) single deposition on the MALDI target-plate. (Blue spectrum) Enrichment of three repetitions on the same MALDI target-plate.

Indeed, the performance of our MALDI does not allow us to obtain good MS/MS quality. Regarding literature and the result obtained with MALDI instrument newest with sequence coverage until 90% for 25 kDa protein [30,

40], it is likely that sequence coverage would be comparable in our condition. Moreover, next generation MALDI instrument requires less quantity of sample by fraction to obtain ISD spectra. This can ease the sample enrichment step of our methodology and then decrease the sample consumption or the number of separation repetition. However, the novelty of this study was to show the proof of principle for the top-down characterization of intact protein after sample enrichment using CE-UV/MALDI-MS. The results presented Fig. 3 confirm the feasibility of this method on a rapid separation of three model proteins. To approve our CE-UV/MALDI-MS top-down approach on real sample, we assessed our system for the characterization of mAbs which represent a highly complex glycoproteins potentially displaying many naturally-occurring molecular micro-heterogeneities

2.4.3. Middle-down characterization of cetuximab Fc/2 variants

Although mAbs were introduced as treatments against disease in the late 1980, they currently represent the most rapidly growing category of therapeutic molecule. The Fc region of mAbs is common to many new platforms as biosimilar, antibody drug conjugate or fusion protein. This region of the protein is conditioning the antibody isotype and particularly is responsible for effector functions such as antibody-dependent cytotoxicity (ADCC), complement-dependent cytotoxicity (CDC) like phagocytosis [41]. The presence of an Fc region has consequences for Fc-mediated effector functions that might be desirable for therapeutic applications. Many levels of characterization are performed following different strategies as intact molecular weight (Mw) measurement, top-down, middle-down and bottom-up approaches [9, 34]. Middle-down approach consists to characterize large portion of partially digested protein using different fragmentation mode (ISD, ETD...). This approach is particularly developed for biotherapeutic characterization [32, 42]. Indeed, due to the complexity and the large Mw of mAbs and related products, middle-down proteomic may facilitate obtaining MS data and thus structural information. In our study, Fc/2 fragments of cetuximab has been selected to prove the feasibility of the methodology. Cetuximab is a chimeric mouse-human IgG1 known to bear 2 N-glycosylation sites on each HC. As every mAbs, cetuximab can exhibit a wide variety of micro-heterogeneities particularly due to PTMs. Furthermore, this mAb can also experience HC C-terminal lysine truncation which affect Fc/2 variants. To obtain, Fc/2 fragments of cetuximab, IdeS digestion was performed. IdeS is a cysteine endopeptidase enzyme naturally secreted by *Streptococcus pyogenes* [43], IdeS enzymatic reaction cleaves cetuximab between the two consecutive glycine residues present in the hinge region to obtain two types of fragments (Fc/2 and F(ab')₂). IdeS has demonstrated an exceptional specificity in IgG proteolysis on contrary to papain for instance, therefore it has been consequently used to ease and improve mAbs characterization [44]. In a previous work of our group, cetuximab IdeS digest was separated and characterized by offline CZE-UV/ESI-MS using an instrumental setting developed in house [36]. Briefly, assymetric CZE conditions was based on inlet background electrolyte (BGE) composed of ϵ -amino-caproic acid (EACA) 200 mM/ammonium acetate 25 mM,

pH 5.7 and outlet BGE composed of ammonium acetate 25 mM, pH 5.7. HPC coating was used to minimize analyte adsorption on the capillary wall and reduce the electroosmotic flow (EOF). A separation of three peaks were identified as intact and with one lysine truncation Fc/2 variants. Moreover, Fc/2 dimers were characterized demonstrating the presence of three peaks in the electropherograms [36]. In our CE-UV/MALDI-MS methodology, pooled fraction collection of three repetitions of separation of the same sample have been performed to obtain enrichment fraction corresponding to 2.5 pmol of Fc/2 fragments in each fraction. Time of one deposit analysis represents 1 hour while total time of three repetition represents around 3.5 hours. Each peak has been collected based on apparent mobility as previously described. The collection of the three different fractions allow theoretically to recover the total quantity of each Fc/2 fragment present in each peak. MALDI-MS spectra were acquired after deposition and complete evaporation of DHB matrix directly on the MALDI target plate. Fig. 4 shows the CZE-UV electropherogram and the MS spectra of Fc/2 variants corresponding to the three peaks. Presence of fragmentation residues in each MS spectra allows to conclude on the feasibility of the strategy for middle-down characterization of Fc/2 cetuximab variants using CE-UV/MALDI-MS.

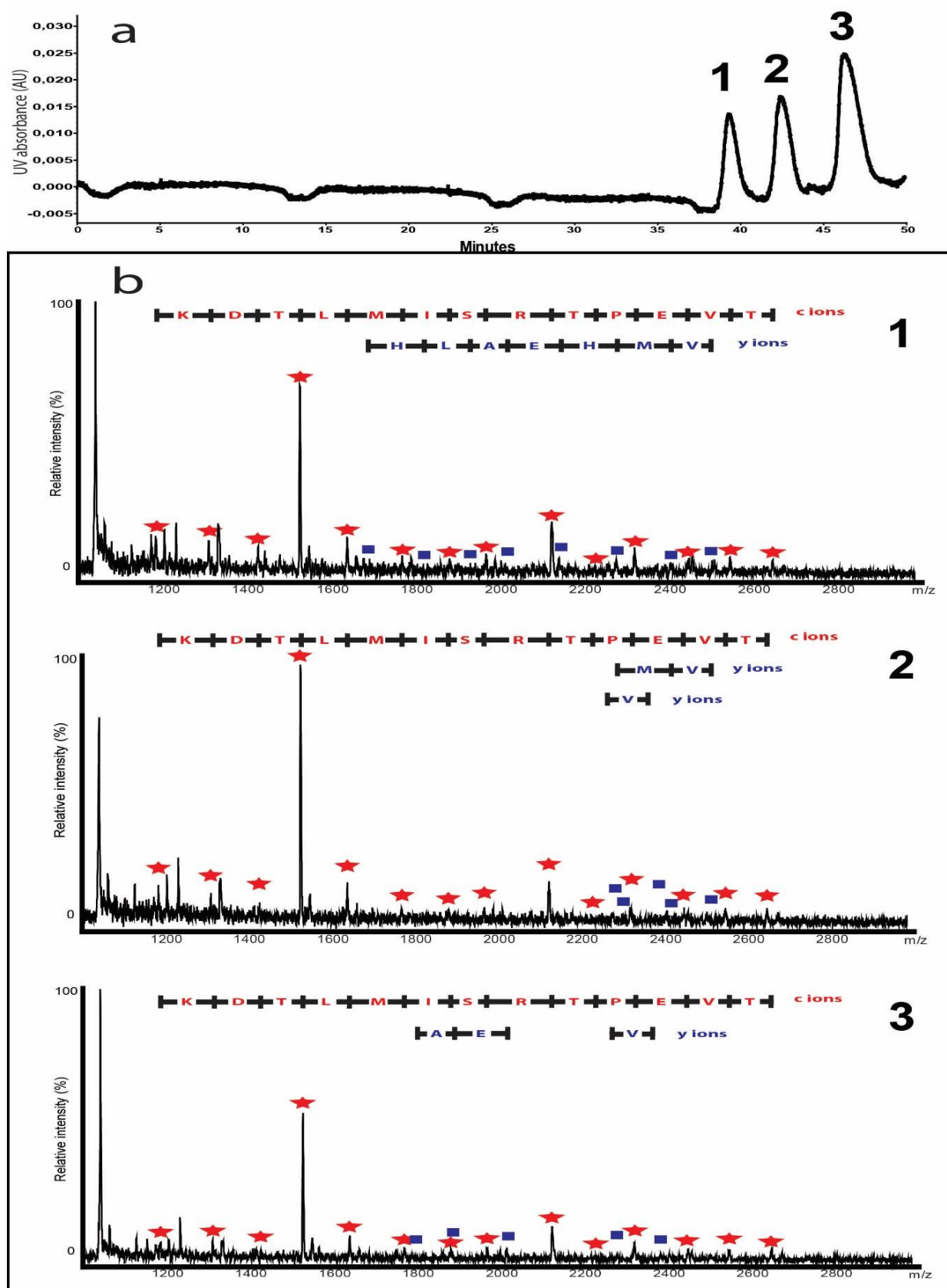


Fig. 4. CZE-UV off-line coupled to MALDI-MS via fractionation for a middle-up characterization of Cetuximab $F_{c/2}$ variants. (a) CZE-UV electropherogram. (b) Middle-down MALDI-MS spectrum of $F_{c/2}$ variants corresponding to the three peaks. CE Experimental conditions: Experimental section; MS condition: See Experimental section; sample, IdeS digest of cetuximab (5 mg/mL); sample injection 0.5psi 60s.

Regarding ISD spectra of each fraction, Fig. 4b allows to identify 20 AA, 16 AA and 16 AA respectively corresponding to around 9% sequence coverage of Fc/2 cetuximab fragments. This result is in agreement with model protein characterization study and can be explained by our instrument setup. Indeed, due to the generation of our MALDI instrument, it is clearly not possible to obtain optimal ISD quality. However, as described in the literature, new generation of MALDI instrument allowed to obtain until 90% sequence coverage for 25 kDa protein [30,40]. Moreover, less quantity of sample by fraction to obtain ISD spectra are requested with newest MALDI instrument. This decreases the number of separation repetition and then can ease the sample enrichment step of our methodology.

However, more interestingly in this case, ISD fragmentation allows to observe mostly c-ions but also some low intense y-ions. Regarding c-ions, every ISD spectra indicates the same following AA sequence corresponding to Fc/2 N-terminal fragments. The complete similarity in terms of c-ions masses and sequence coverage were expected due to the similarity in terms of sequence for the Fc/2 variants in their N-terminal part. Concerning y-ions, ISD spectra corresponding to peak 1 (Fig. 4b-1) and peak 3 (Fig. 4b-3) show a difference of 128 Da between y-ion mass peaks of first detected valine residue. This mass difference corresponds to the loss of C-terminal lysine residue and then confirms the presence of Fc/2 and Fc/2-K variants in peak 1 and peak 3 respectively. More interestingly, ISD spectrum of the peak 2 (Fig. 4b-2) leads to the same y ions series for the valine observed in peak 1 and peak 3 exhibiting the concomitant presence of Fc/2 and Fc/2-K variants in the second peak of the separation. These results confirm our previous work based on the presence of Fc/2 dimers to understand the separation process [36]. Indeed, ISD spectra approve the fact that peak 1 corresponds to Fc/2 homodimer, peak 2 corresponds to Fc/2/Fc/2-K heterodimer and peak 3 correspond to Fc/2-K homodimer. This observation proves the orthogonality of the methodologies and shows the ability of CE-UV/MALDI-MS coupling to be used to perform enrichment fraction followed by top-down analysis for mAbs characterization.

2.5. Conclusion

To summarize, we report here the proof of principle for the top-down characterization of intact protein after sample enrichment using CE-UV/MALDI-MS and the application to biopharmaceuticals. To validate the method, developed CZE offline instrumental setting was implemented to perform sample enrichment by multiple separation for direct deposition of collected fractions on a MALDI target plate. Three model protein mixture has been studied to assess the method. Good robustness of CZE separation and MALDI-MS spectra of each protein confirm the good enrichment process of the sample with the absence of carryover effect and diffusion phenomenon. Following CZE separation step, top-down approach by MALDI-MS has been performed on each fraction with and without enrichment process. Results confirm the usefulness of sample enrichment to obtain adequate quantity of deposited protein for top-down analysis and the proof of concept for

the method consisting to characterize intact protein mixture by top-down approach using CE-UV/MALDI-MS. Finally, to confirm the performances of this approach for the characterization of mAbs, middle-down characterization of Fc/2 cetuximab variant have been performed using CE-UV/MALDI-MS. After sample enrichment, MALDI-MS spectra of the three fractions corresponding to the three main peaks of CZE separation were acquired. Identification of around 9% sequence coverage of Fc/2 fragments allows to conclude on the feasibility of the strategy for middle-down characterization of Fc/2 cetuximab variants using CE-UV/MALDI-MS. Moreover, mass difference for y-ions series present on each MS spectra confirm the separation process based on the formation of Fc/2 dimers with and without C-terminal truncation. These results demonstrates the potential of enrichment fraction and top-down analysis by CE-UV/MALDI-MS as a sensitive method to in-depth mAbs characterization. Despite analysis time up to a few hours, the described analytical methodology appears to be a serious alternative to classical chromatographic methods especially in terms of intact protein characterization. Indeed, while top-down analysis allows to obtain crucial information on the primary structure of proteins, miniaturization properties of CE and geometry of the interface permit to reduce drastically the volume of analyte and open the ways to sample treatment directly on the plate such as desalting, purification or enzymatic digestion.

2.6. Acknowledgments

The authors would like also to express their gratitude to P. Hammann, Lauriane Kuhn and J. Chicher (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France), Dr. E. Wagner-Rousset, MC. Janin-Bussat and O. Colas (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France) for helpful discussions around antibody structural characterization by LC-MS. Special dedicace to Dr. R. Gahoual. This work was supported by the CNRS (UMR 7140), the University of Strasbourg and a doctoral fellowship from the General Council of Mayotte to NS.

2.7. References

- [1] S. Fekete, D. Guilleme, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals, *Anal. Chem.* 88 (2016) 480-507.
- [2] 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.
- [3] L.L. Sun, M.D. Knierman, G.J. Zhu, N.J. Dovichi, Fast Top-Down Intact Protein Characterization with Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5989-5995.
- [4] X. Han, Y. Wang, A. Aslanian, M. Bern, M. Lavalley-Adam, J.R. Yates, Sheathless Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry for Top-Down Characterization of *Pyrococcus furiosus* Proteins on a Proteome Scale, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11006-11012.

- [5] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, CE-MS for the analysis of intact proteins 2010-2012, *Electrophoresis*, 34 (2013) 99-112.
- [6] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly, N. Corvaia, Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 345-352.
- [7] J.M. Reichert, Marketed therapeutic antibodies compendium, *mAbs*, 4 (2012) 413-415.
- [8] W. Wang, S. Singh, D.L. Zeng, K. King, S. Nema, Antibody structure, instability, and formulation, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 1-26.
- [9] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianférani, Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products, *Anal. Chem.* 85 (2013) 715-736.
- [10] R. Aebersold, M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics, *Nature* 422 (2003) 198-207.
- [11] R.D. Smith, H.R. Udseth, Capillary zone electrophoresis MS, *Nature* 331 (1988) 639-640.
- [12] D.J. Rose, J.W. Jorgenson, Fraction collector for capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr.* 438 (1988) 23-34.
- [13] V. Kašička, Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2013–middle 2015), *Electrophoresis* 37 (2016) 162-188.
- [14] A.A.M. Heemskerk, A.M. Deelder, O.A. Mayboroda, CE–ESI-MS for bottom-up proteomics: Advances in separation, interfacing and applications, *Mass Spectrom. Rev.* 35 (2016) 259-271.
- [15] G.J. Zhu, L.L. Sun, X.J. Yan, N.J. Dovichi, Single-Shot Proteomics Using Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry with Production of More than 1 250 *Escherichia coli* Peptide Identifications in a 50 min Separation, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2569-2573.
- [16] R. Gahoual, A. Burr, J.M. Busnel, L. Kuhn, P. Hammann, A. Beck, Y.N. Francois, E. Leize-Wagner, Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs*, 5 (2013) 479-490.
- [17] R. Gahoual, J.-M. Busnel, A. Beck, Y.-N. François, E. Leize-Wagner, Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9074-9081.
- [18] N. Said, R. Gahoual, L. Kuhn, A. Beck, Y.-N. François, E. Leize-Wagner, Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis – Tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method, *Anal. Chim. Acta* 918 (2016) 50-59.
- [19] Y. Zhao, N.M. Riley, L. Sun, A.S. Hebert, X. Yan, M.S. Westphall, M.J.P. Rush, G. Zhu, M.M. Champion, F.M. Medie, P.A.D. Champion, J.J. Coon, N.J. Dovichi, Coupling Capillary Zone Electrophoresis with Electron Transfer Dissociation and Activated Ion Electron Transfer Dissociation for Top-Down Proteomics, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5422-5429.
- [20] R. Haselberg, S. Harmsen, M.E.M. Dolman, G.J. de Jong, R.J. Kok, G.W. Somsen, Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 698 (2011) 77-83.
- [21] J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, Online mass-spectrometric detection for capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1230-1232.
- [22] R. Wojcik, O.O. Dada, M. Sadilek, N.J. Dovichi, Simplified capillary electrophoresis nanospray sheath-flow interface for high efficiency and sensitive peptide analysis, *Rapid Commun. Mass Sp.* 24 (2010) 2554-2560.

- [23] J.M. Busnel, B. Schoenmaker, R. Ramautar, A. Carrasco-Pancorbo, C. Ratnayake, J.S. Feitelson, J.D. Chapman, A.M. Deelder, O.A. Mayboroda, High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Coupling a Porous Sheathless Interface with Transient-Isotachopheresis, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9476-9483.
- [24] Y. He, N.A. Lacher, W. Hou, Q. Wang, C. Isele, J. Starkey, M. Ruesch, Analysis of Identity, Charge Variants, and Disulfide Isomers of Monoclonal Antibodies with Capillary Zone Electrophoresis in an Uncoated Capillary Column, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3222-3230.
- [25] 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.
- [26] M. Biacchi, R. Bhajun, N. Saïd, A. Beck, Y.N. François, E. Leize-Wagner, Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface, *Electrophoresis* 35 (2014) 2986-2995.
- [27] N.L. Kelleher, Top-down proteomics, *Anal. Chem.* 76 (2004) 196A-203A.
- [28] J.F. Nemeth-Cawley, B.S. Tangarone, J.C. Rouse, "Top down" characterization is a complementary technique to peptide sequencing for identifying protein species in complex mixtures, *J. Proteome Res.* 2 (2003) 495-505.
- [29] Z.Q. Zhang, H. Pan, X.Y. Chen, Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies, *Mass Spectrom. Rev.* 28 (2009) 147-176.
- [30] A. Resemann, W. Jabs, A. Wiechmann, E. Wagner, O. Colas, W. Evers, E. Belau, L. Vorwerg, C. Evans, A. Beck, D. Suckau, Full validation of therapeutic antibody sequences by middle-up mass measurements and middle-down protein sequencing, *mAbs*, 8 (2016) 318-330.
- [31] B.Q. Tran, C. Barton, J.H. Feng, A. Sandjong, S.H. Yoon, S. Awasthi, T. Liang, M.M. Khan, D.P.A. Kilgour, D.R. Goodlett, Y.A. Goo, Comprehensive glycosylation profiling of IgG and IgG-fusion proteins by top-down MS with multiple fragmentation techniques, *J. Proteomics* 134 (2016) 93-101.
- [32] L. Fornelli, D. Ayoub, K. Aizikov, A. Beck, Y.O. Tsybin, Middle-Down Analysis of Monoclonal Antibodies with Electron Transfer Dissociation Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3005-3012.
- [33] R.K. Harstad, A.C. Johnson, M.M. Weisenberger, M.T. Bowser, Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 88 (2016) 299-319.
- [34] A. Beck, S. Sanglier-Cianferani, A. Van Dorsselaer, Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 4637-4646.
- [35] M. Biacchi, R. Gahoual, N. Said, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6240-6250.
- [36] Y.-N. François, M. Biacchi, N. Said, C. Renard, A. Beck, R. Gahoual, E. Leize-Wagner, Characterization of cetuximab Fc/2 dimers by off-line CZE-MS, *Anal. Chim. Acta* 908 (2016) 168-176.
- [37] R. Gahoual, M. Biacchi, J. Chicher, L. Kuhn, P. Hammann, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.N. Francois, Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, *mAbs* 6 (2014) 1464-1473.
- [38] Y.F. Shen, R.D. Smith, High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 135-141.
- [39] M.R. Pourhaghighi, J.-M. Busnel, H.H. Girault, High-sensitive protein analysis by FESI-CE-MALDI-MS, *Electrophoresis* 32 (2011) 1795-1803.

- [40] D. Ayoub, W. Jabs, A. Resemann, W. Evers, C. Evans, L. Main, C. Baessmann, E. Wagner-Rousset, D. Suckau, A. Beck, Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques, *mAbs* 5 (2013) 699-710.
- [41] J V Ravetch, J.P. Kinet, Fc Receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492.
- [42] J. Sjogren, F. Olsson, A. Beck, Rapid and improved characterization of therapeutic antibodies and antibody related products using IdeS digestion and subunit analysis, *Analyst* 141 (2016) 3114-3125.
- [43] K. Wenig, L. Chatwell, U. von Pawel-Rammingen, L. Bjorck, R. Huber, P. Sonderrmann, Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG, *P. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 17371-17376.
- [44] B. Vincents, U. von Pawel-Rammingen, L. Bjorck, M. Abrahamson, Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding, *Biochem.* 43 (2004) 15540-15549.

3. Conclusion

Lors de ce travail, nous avons réalisé la preuve de concept de l'utilisation du couplage CE-UV/MALDI-MS avec enrichissement d'échantillon par collection de fraction pour l'analyse top-down et middle-down de protéines entières. Cette stratégie a ensuite été appliquée à la caractérisation de fragments Fc/2 de mAbs. Afin de valider la méthode, la séparation de trois protéines modèles a été réalisée suivant un protocole d'enrichissement correspondant à la collection de fraction de trois analyses successives sur la même plaque MALDI. Due à la bonne répétabilité de la séparation CZE, le processus d'enrichissement a été validé notamment avec l'absence d'effet de diffusion pouvant engendrer des recouvrements de dépôt sur la plaque MALDI. L'analyse top-down par fragmentation MALDI-MSD a ensuite été réalisée sur chaque fraction collectée suivant deux plans d'expériences, (i) une seule séparation CZE et (ii) une répétition de trois séparations CZE afin d'enrichir l'échantillon. Les résultats obtenus ont confirmé l'importance de l'étape d'enrichissement de l'échantillon afin d'obtenir une quantité adéquate de protéine déposée pour réaliser une analyse top-down. Cette stratégie a ensuite été appliquée à la caractérisation, par approche middle-down, de variants de charge Fc/2 de cetuximab. L'échantillon de cetuximab a subi le même protocole que les trois protéines modèles, à savoir, un enrichissement par la répétition de trois séparations successives avec dépôt sur plaque. Les spectres MALDI-MSD des trois fractions correspondant aux trois pics des fragments Fc/2 ont permis l'identification de ces fragments avec un taux de recouvrement moyen de 9%. Ces résultats nous ont permis de conclure sur la faisabilité de notre stratégie sur des échantillons complexes tels que le digestat IdeS d'un mAb. De plus, les différences de masses pour la série des ions y présents sur chacun des trois spectres MSD confirment les conclusions du chapitre 2 (Caractérisation de dimères de fragments Fc/2 de cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS) sur le processus de séparation des variants de charge Fc/2 du cetuximab. En effet, la séparation CZE est basée sur la formation de dimères de Fc/2 ayant perdu ou non, une lysine en C-terminale. Cette méthode démontre le potentiel du couplage CE-UV/MALDI-MS pour l'analyse top-down de protéines thérapeutiques.

Chapitre 4 : Séparation des variants du cetuximab par CE-ESI-MS

1. Introduction

Les mAbs représentent la classe de protéine thérapeutique ayant la plus forte croissance à l'heure actuelle. Les mAbs sont des glycoprotéines complexes possédant de nombreuses micro-hétérogénéités. La complexité de ces glycoprotéines nécessite une amélioration constante des méthodes analytiques pour permettre une caractérisation fine, rapide et avec la plus grande précision. Dans notre précédente étude, nous avons réalisé la séparation et la caractérisation fine des variantes du cetuximab sur les couplages off-line CZE-UV/MALDI-MS et CZE-UV/ESI-MS. Cette étude a montré la faisabilité d'une séparation de six variants du cetuximab partiellement digéré à l'IdaS dans des conditions pseudo-native, c.-à-d. avec un électrolyte support composé de 200 mM d'acide ϵ -Amino-caproïc (EACA)-et 25 mM d'acétate d'ammonium à pH 5.7. De plus, l'analyse de ces variants a permis d'identifier leurs fragments d'origine et les mécanismes de séparation des variants de chaque fragment. En effet nous avons pu démontrer une séparation de dimères pour le fragment Fc/2 et une séparation de glycoforme pour les fragments F(ab)'₂. Toutefois à cause de la nature off-line de la méthode analytique, cette étude nécessite différentes étapes intermédiaire de « traitement » d'échantillon. Dans le but d'éliminer ces différentes étapes intermédiaires et de ce fait obtenir une analyse rapide, un développement de méthode de séparation des variantes sera développé sur le couplage direct CESI-MS.

La contrainte majeure quant à la séparation des variantes de charges du cetuximab sur couplage direct CE-MS résulte de la présence d'une forte concentration en EACA dans les conditions expérimentales développées. En effet l'EACA s'ionise très facilement et étant en forte concentration dans le BGE, son signal en MS masque ceux des analytes. L'objectif de cette étude a été donc de développer des méthodes analytiques permettant la séparation middle-up protéomique du cetuximab par CESI-MS sans l'utilisation d'EACA dans le BGE. Cela représente un grand challenge analytique car toutes les conditions expérimentales décrites dans la littérature nécessitent l'utilisation de ce composé pour permettre la séparation des mAbs. Une étude préliminaire a été réalisée dans un premier temps sur le couplage CE-UV afin d'évaluer la faisabilité du projet. Dans cette étude, différents paramètres tels que le pourcentage de greffage du capillaire, la concentration, la nature ainsi que le pH du BGE ont été étudié et optimisé. Après optimisation des conditions expérimentales sur le couplage CE-UV, nous avons réalisé l'étude sur le couplage direct CESI-MS.

2. Résultats

2.1 Développement et optimisation de méthodes de séparation par CE-UV :

2.1.1 Influence du greffage

D'une manière générale, le type et la nature du greffage joue un rôle majeur sur la séparation de protéines intactes. Dans nos expériences précédentes, le capillaire possédait un greffage neutre « permanent » développé au laboratoire par immobilisation thermique de 5% d'hydroxypropylcellulose (HPC) selon la méthode décrite par Y. Shen, R. D. Smith ^[1]. Ces capillaires greffés possèdent une grande résistance et une bonne répétabilité des analyses en termes de temps de migration, d'aire et de résolution ^[2] (pour $n \leq 5$). Au-delà d'un certain nombre d'analyses, on peut constater un décalage des temps de migration résultant d'une perte progressive du greffage. Cela peut très vite devenir problématique lorsqu'il s'agira de comparer des résultats dans le cadre d'un développement de méthodes.

Dans le but de minimiser la perte progressive du greffage, nous avons réalisé un greffage neutre composé cette fois-ci de 10% d'HPC. L'augmentation du pourcentage de greffage rend le capillaire beaucoup plus résistant et reproductible, ce qui permet aussi la réalisation d'un plus grand nombre d'analyses sans perte d'efficacité de séparation.

2.1.2 Influence de l'électrolyte support (BGE)

Différents BGE ont été testé afin de trouver des conditions expérimentales optimales permettant la séparation des variantes du cetuximab par CE-UV avec l'optique d'un transfert de méthodes par CESI-MS. En effet nous avons testé dans un premier temps les principaux électrolytes couramment utilisé en CZE à savoir, l'acide formique, l'acide acétique et l'acétate d'ammonium sous le même champ électrique.

2.1.2.1 Effets de l'acide formique (FA)

Un échantillon de cetuximab partiellement digéré à l'IdaS a été injecté en CE-UV à différent pourcentage d'acide formique. La figure 1 montre les résultats obtenus.

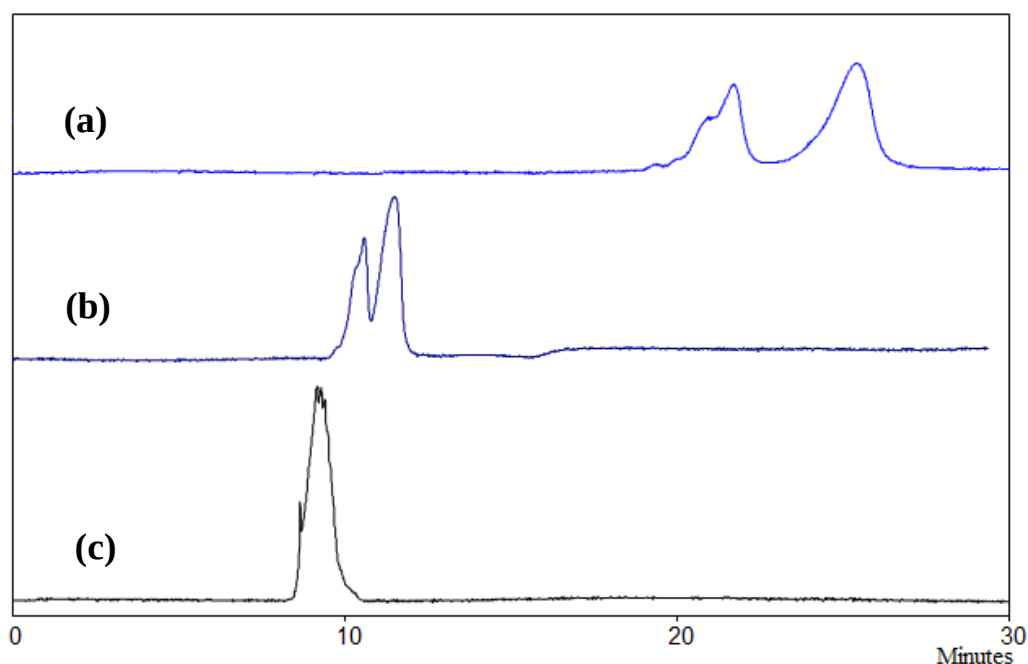


Figure 1 : Influence de l'acide formique sur la séparation middle-up du cetuximab par CE-UV
(a) 10%FA (b) 5%FA (c) 1%FA

Conditions expérimentales : Greffage 10%HPC, 50 m ID x 60 cm, voltage : 20 kV, Température : 25 C, Détection UV : 200 nm, Injection : 1psi, 20s (1pmol), Echantillon : Cetuximab IdeS à ~5g/l.

On constate que l'augmentation du pourcentage d'acide formique permet d'améliorer la séparation. Toutefois le temps d'analyse augmente avec l'augmentation de l'acide formique et on atteint très rapidement des valeurs de courant trop élevée avec 10 % d'acide formique, ce qui implique une dissipation de chaleur par effet joule de plus en plus important pouvant dégrader les analytes.

Avec 5% de FA, on obtient une séparation de deux pics qui peuvent potentiellement correspondre aux fragments Fc/2 et F(ab)'2. A noter que pour un transfert de méthode par CESI-MS, cette séparation obtenue avec 5% de FA peut être améliorée en diminuant la quantité d'échantillon injectée ou en augmentant la longueur du capillaire.

2.1.2.2 Effets de l'acide acétique (AA)

Une étude portant sur l'influence de l'acide acétique sur la séparation middle-up du cetuximab a été réalisée sur le même échantillon par CE-UV. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 2.

Nous pouvons constater la même tendance que sur l'étude précédente concernant l'influence de l'acide formique. En effet l'augmentation d'acide acétique permet la séparation des deux pics observés précédemment. Cependant on remarque qu'il faut un pourcentage beaucoup plus élevée en AA (quasiment le double) pour permettre cette séparation. A noter que grâce à une conductivité plus faible que l'acide formique, l'acide acétique induit de faibles valeurs de courant permettant l'utilisation de tels pourcentages d'acide sans atteindre

les limites dues à l'effet joule. L'acide formique induit des courants élevés mais possède un pouvoir résolutif plus élevé c'est à dire qu'il permet une séparation plus résolue et plus efficace des deux pics avec quasiment deux fois moins de pourcentage d'acide.

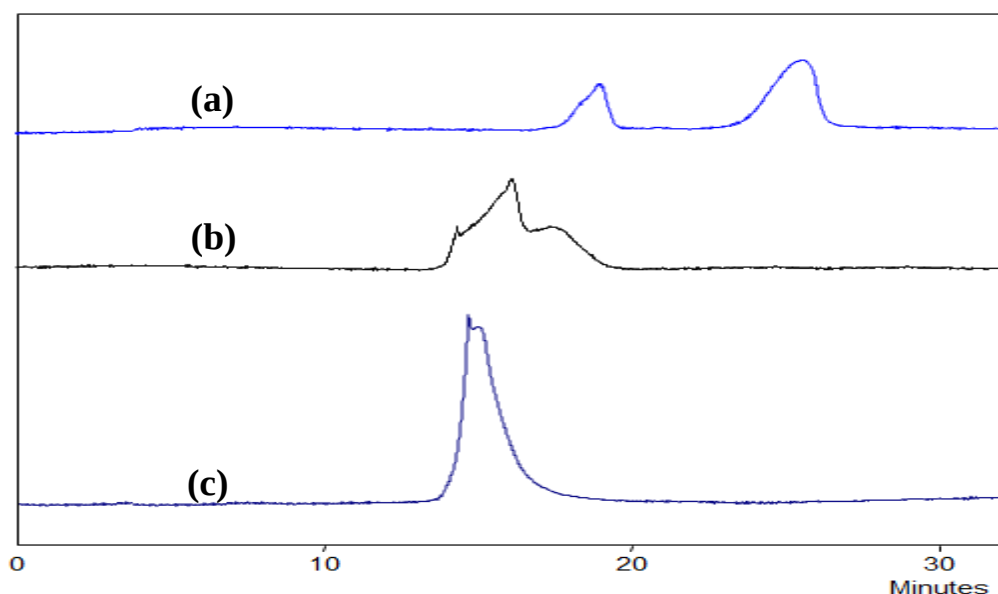


Figure 2 : Influence de l'acide acétique sur la séparation middle-up du cetuximab par CE-UV

(a) 20%AA (b) 10%AA (c) 5%AA

Conditions expérimentales : Greffage 10%HPC, 50 μ m ID x 60 cm, voltage : 20 kV, Température : 25°C, Détection UV : 200 nm, Injection : 1psi, 20s (1pmol), Echantillon : Cetuximab IdeS à ~5g/l

2.1.2.3 Effets de l'acétate d'ammonium (AcONH_4)

L'échantillon du cetuximab middle-up a été injecté par CE-UV dans des conditions « pseudo-native » c.-à-d. avec 25mM et 50 mM d'acétate d'ammonium à pH : 5,70 (Figure 3).

Tout d'abord nous observons qu'il est possible de séparer les variantes de charges du cetuximab sans utiliser de l'EACA dans le BGE. Cela est rendu possible grâce à l'augmentation du pourcentage d'HPC nécessaire au greffage neutre de la paroi du capillaire. On peut donc supposer qu'à 5% d'HPC, le greffage n'est pas totalement optimal et qu'il reste de ce fait des groupements silanols résiduels sur la paroi du capillaire. L'utilisation d'EACA permettrait de compenser la possible présence de ces groupements silanols résiduels et donc permettrait d'affiner les pics en CE-UV. Avec 10% d'HPC, le greffage est plus résistant et suffisamment homogène pour permettre la réduction voire l'élimination totale des groupements silanols résiduels. De plus comme expliqué dans le chapitre 2, des conditions « pseudo-native » sont nécessaires pour permettre la formation de dimères des fragments Fc/2 et F(ab)'2 et ainsi les séparer.

On constate qu'avec 25 mM d'acétate d'ammonium on peut potentiellement séparer, bien que peu résolu, six pics du cetuximab middle-up tandis qu'avec 50 mM on obtient huit pics avec une bonne résolution.

L'augmentation de la concentration d'acétate d'ammonium conduit à une meilleure séparation des pics. Cela s'explique par le fait qu'un BGE de force ionique faible (25 mM) permet de réaliser une séparation rapide tandis qu'un BGE de force ionique élevé (50 mM) induit une faible mobilité électrophorétique des analytes permettant ainsi d'améliorer la résolution entre les pics aux détriment du temps d'analyse.   noter qu'à 50 mM d'AcONH₄ la valeur de l'intensité du courant commence à être de plus en plus importante synonyme d'un début de dégagement de chaleur par effet Joule.

Enfin la séparation des variantes de charges obtenues avec 50 mM d'AcONH₄ est vraiment intéressante puisqu'elle offre la possibilité de caractériser précisément chaque pic lors d'un transfert de méthodes sur le couplage direct CESI-MS. Toutefois on constate un élargissement des pics à partir du quatrième pic. Dans le but d'optimiser encore plus la séparation, une étude de l'influence du pH a été réalisée en utilisant 50 mM d'AcONH₄ comme BGE.

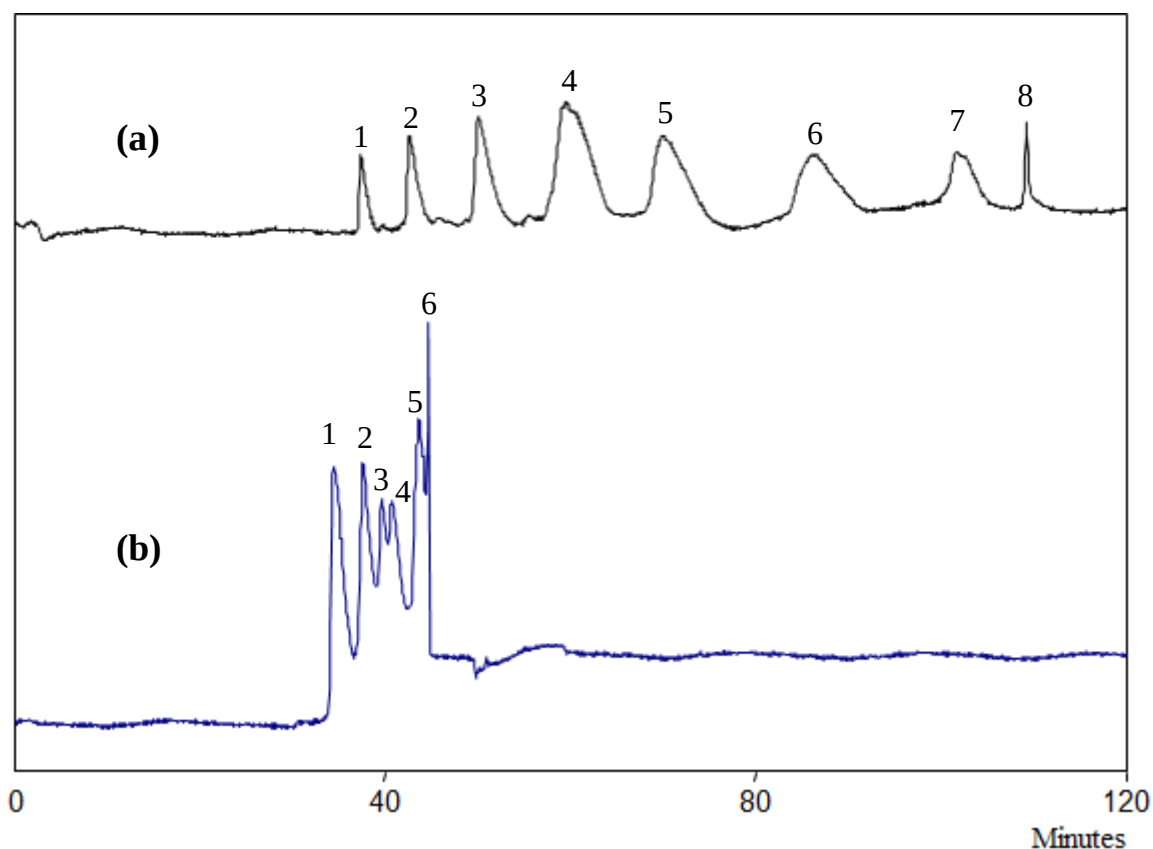


Figure 3 : Influence de l'acétate d'ammonium sur la séparation middle-up du cetuximab par CE-UV

(a) 50mM AcONH₄ (b) 25mM AcONH₄ à pH : 5,70

Conditions expérimentales : Greffage 10%HPC, 50 m ID x 60 cm, voltage : 20 kV, Température : 25 C, Détection UV : 200 nm, Injection : 1psi, 20s (1pmol), Echantillon : Cetuximab IdeS à ~5g/l

2.1.2.4 Effets du pH

Afin d'observer l'influence du pH sur la séparation des variants de charges du cetuximab middle-up, trois injections ont été réalisées dans un premier temps par CE-UV avec un BGE composé de 50 mM d'AcONH₄ à différents pH 2.50, 5.10, et 7.60 (Figure 4).

Nous pouvons voir qu'à pH acide (pH 2.50), la mobilité électrophorétique des analytes est tellement forte que les analytes n'ont pas le temps de se séparer. De plus, étant dans des conditions très dénaturantes, il serait difficile de séparer des variants de charges du cetuximab middle-up. En effet nous avons vu précédemment qu'il est très difficile de maintenir les interactions nécessaires à la formation de dimères des fragments Fc/2 et F(ab)'₂ dans des conditions dénaturantes. A pH neutre (pH : 7.60), les analytes ont en revanche une faible mobilité électrophorétique qui se traduit par une faible efficacité des pics et une augmentation significative du temps d'analyse. Et enfin à pH : 5.10, on obtient une séparation de six pics du cetuximab middle-up. Nous avons donc déduit que la séparation des variants de charges du cetuximab middle-up est efficace seulement dans des pH comprise entre 5.00 et 6.00. Ce constat est en accord avec les résultats décrits par He *et al.* ^[3,4] portant sur l'analyse des variants de charge de mAbs intacts dans des conditions expérimentales faisant intervenir de l'EACA.

Afin d'avoir une vision globale de la séparation des variants du cetuximab middle-up dans cette gamme de pH « optimal », une dernière injection a été réalisée à pH 5.35. Nous constatons alors que l'augmentation du pH dans cette gamme comprise entre 5 et 6 permet la séparation d'un plus grand nombre de pics de plus en plus résolu toutefois au détriment du temps d'analyse. En effet on peut séparer 6 pics à pH 5.10, 7 pics à pH 5.35 et 8 pics à pH 5.70. Notons également qu'au-delà d'un certain temps d'analyse (environ 60 min), on observe un élargissement des pics. Cependant le pic 8 obtenu à pH 5.70 ne suit pas du tout cette tendance. Cela sous-entendrait alors qu'il ne provient pas des variants de charges du cetuximab middle-up.

Dans l'optique d'un transfert de méthode sur le couplage direct CESI-MS, nous privilégierons les conditions de séparation à pH 5.35 qui présentent le meilleur compromis en termes de nombre de pics séparés, de résolution et d'efficacité de pics, et du temps d'analyse. Il serait tout de même intéressant d'identifier par la suite chaque pic en fonction du pH afin de valider et/ou approfondir notre hypothèse quant à la séparation des variants de charges du fragment F(ab)'₂ (chapitre 1) qui résulte d'une substitution d'un galactose (Gal) par un résidu d'acide sialique (NGNA).

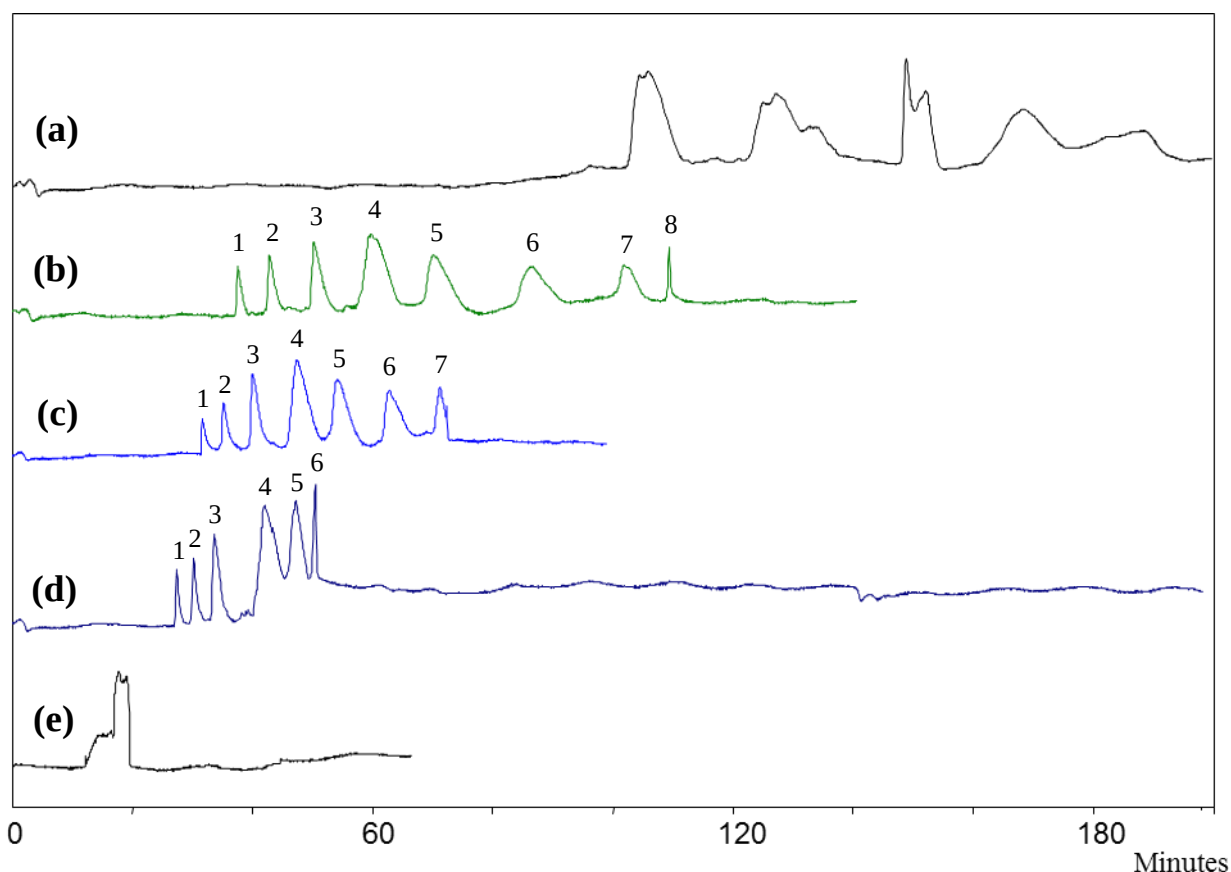


Figure 4 : Influence du pH sur la séparation middle-up du cetuximab par CE-UV

(a) pH : 7.60 (b) pH : 5.70 (c) pH : 5.35 (d) pH : 5.10 (e) pH : 2.50 BGE : 50mM AcONH₄

Conditions expérimentales : Greffage 10%HPC, 50µm ID x 60 cm, voltage : 20 kV, Température : 25°C, Détection UV : 200 nm, Injection : 1psi, 20s (1pmol), Echantillon : Cetuximab IdeS à ~5g/l

2.2 Séparation et caractérisation des variantes de charges du cetuximab middle-up par CESI-MS

La configuration du couplage direct CESI-MS est telle qu'actuellement nous ne pouvons pas utiliser les capillaires greffés suivant le protocole du laboratoire. En effet nous sommes contraints d'utiliser un capillaire commercial possédant un greffage neutre dont la nature n'est pas détaillée afin de réaliser la séparation des variants de charges du cetuximab middle-up sur le couplage direct CESI-MS. Suivant les différentes présentations de Sciex sur ce greffage, nous suspectons qu'il soit de nature polyacrylamide. Il existe différentes contraintes quant à l'utilisation de ce type de capillaire :

- Le pourcentage de greffage du capillaire étant inconnu, on peut se poser la question de la résistance et de la qualité du greffage.
- La limite du courant étant très faible (inférieure à 5 µA) réduit le choix des BGE.
- L'élimination du flux électro-osmotique oblige l'application d'une pression additionnel durant l'analyse afin d'obtenir un spray.

Ces contraintes ne permettent pas, par exemple, l'utilisation des conditions expérimentales précédemment optimisées avec 50 mM d'acétate d'ammonium à pH : 5.35. Il a donc fallu réajuster les conditions afin d'être en accord avec les principes d'utilisation du capillaire neutre.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une séparation du cetuximab partiellement digéré à l'IdeS, en condition dénaturante, afin de vérifier la séparation et caractériser les deux pics précédemment obtenus. Puis une injection en condition « pseudo-native » a été faite dans un BGE ajusté en prenant en compte les conditions précédemment optimisées ainsi que les limites dues à l'utilisation du capillaire commercial.

2.2.1 Séparation du cetuximab en condition dénaturante par CESI-MS

La séparation du cetuximab partiellement digéré à l'IdeS, en condition dénaturante, a été réalisée avec un BGE composé de 20 % d'acide acétique. D'après l'étude préliminaire, c'est dans ces conditions qu'on obtient la meilleure séparation du mAbs avec la plus faible valeur d'intensité du courant induit. La séparation obtenue est illustrée sur la figure 5.

On obtient comme attendu la séparation de deux pics du cetuximab middle-up. Bien que le capillaire de séparation soit plus long (91cm au lieu de 60cm) et de faible diamètre interne (30 μ m au lieu de 50 μ m), la résolution entre les deux pics obtenue par CESI-MS est plus faible que celle obtenue précédemment en CE-UV. Cela est due à la nécessité d'appliquer une pression au cours de la séparation afin d'avoir un spray en MS et à la différence de greffage entre les deux capillaires.

L'analyse des spectres de déconvolution de chaque pic a permis de les identifier. Le premier pic correspond à un fragment Fc/2 et le deuxième pic au fragment F(ab)'₂. Cette possibilité de séparer les deux fragments du cetuximab partiellement digéré à l'IdeS peut donc être une bonne alternative à l'infusion des mAbs en condition dénaturante.

Toutefois ces conditions ne sont pas optimales quant à la séparation des variantes du cetuximab middle-up en condition dénaturante. En effet cet échantillon peut potentiellement générer trois pics correspondant au fragment Fc/2, Fc/2 – K et F(ab)'₂. L'optimisation de la séparation peut faire l'objet d'une future étude.

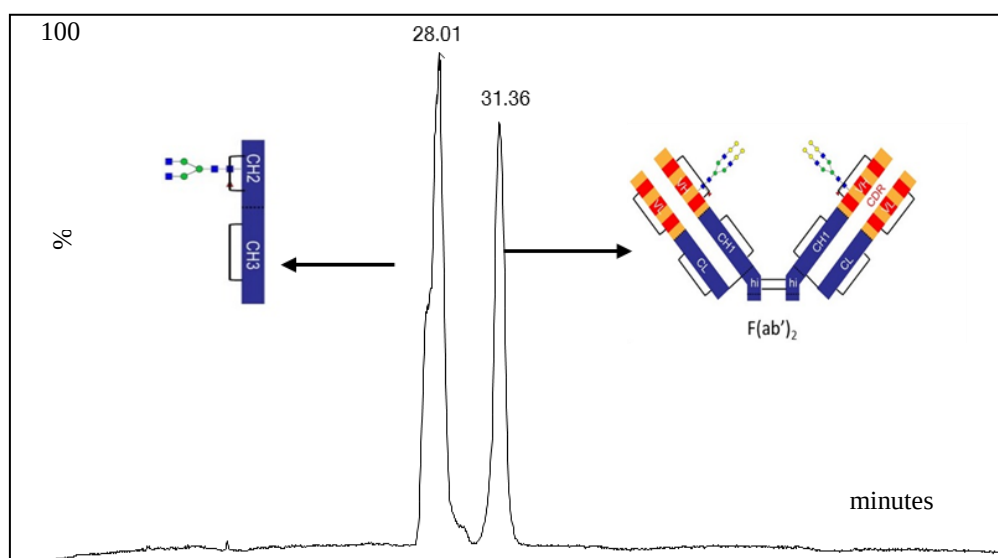


Figure 5 : Séparation du cetuximab middle-up en condition dénaturante par CESI-MS
 (Conditions expérimentales : Greffage en acrylamide, 30µm ID x 91 cm, Voltage : 20 kV+ 0.7psi, Courant : 2.7 µA
 Température : 25°C, Détection UV : 200 nm, Injection : 1psi, 20s (0.4pmol), Echantillon : Cetuximab IdeS à ~2g/l
 BGE : 20% d'acide acétique.

2.2.2 Séparation du cetuximab en condition « pseudo-native » par CESI-MS

La séparation des variants de charges du cetuximab partiellement digéré à l'IdeS en condition « pseudo-native » a été réalisée avec un BGE constitué de 20 mM d'acétate d'ammonium à pH 5.35 sur le couplage direct CESI-MS. La concentration d'acétate d'ammonium a été réduite par rapport aux conditions expérimentales précédemment optimisées afin que l'intensité du courant induit par le BGE soit inférieure à 5 µA.

Dans ces conditions, on arrive à séparer 3 pics du cetuximab middle-up correspondant à une séparation des variants de charges du fragment Fc/2 (Figure 6a). En effet l'analyse de leurs spectres de déconvolution (Figure 6b) a pu démontrer que nous sommes en présence d'homo-dimère de Fc/2 pour le pic 1, d'un hétéro-dimère de Fc/2 et Fc/2 – K pour le pic 2 et d'un homo-dimère de Fc/2 – K pour le pic 3. Ces résultats confirment l'hypothèse de la séparation de dimère pour le fragment Fc/2 démontré dans le chapitre 2.

Toutefois nous sommes pour l'instant dans l'incapacité de détecter les fragments F(ab)'2 en MS dans ces conditions de BGE. On suppose que le greffage n'est pas suffisamment homogène pour masquer tous les groupements silanols présent dans le paroi du capillaire et donc il est possible qu'il y ait une interaction entre la charge négative de l'acide sialique portée par chaque variant de charge du fragment F(ab)'2 et le capillaire de séparation rendant difficile leur détection par MS.

D'autre part, en supposant qu'on détecte les variants de charges du fragment F(ab)'2, il est possible que les conditions expérimentales actuellement développées ne permettent pas la séparation de ces variants de charges. En effet bien que les greffages des capillaires soient différents, on constate que cette séparation se rapproche de

celle obtenu en CE-UV avec un BGE composé de 25 mM d'acétate d'ammonium à pH 5.70. Il serait sans doute judicieux, pour des futures études, d'augmenter la concentration d'acétate d'ammonium pour s'assurer d'une séparation de ces variants de charges et trouver un moyen de réduire l'intensité du courant induit par exemple en diminuant le champ électrique au détriment du temps d'analyse ou en ajoutant un additif ou un solvant peu conducteur.

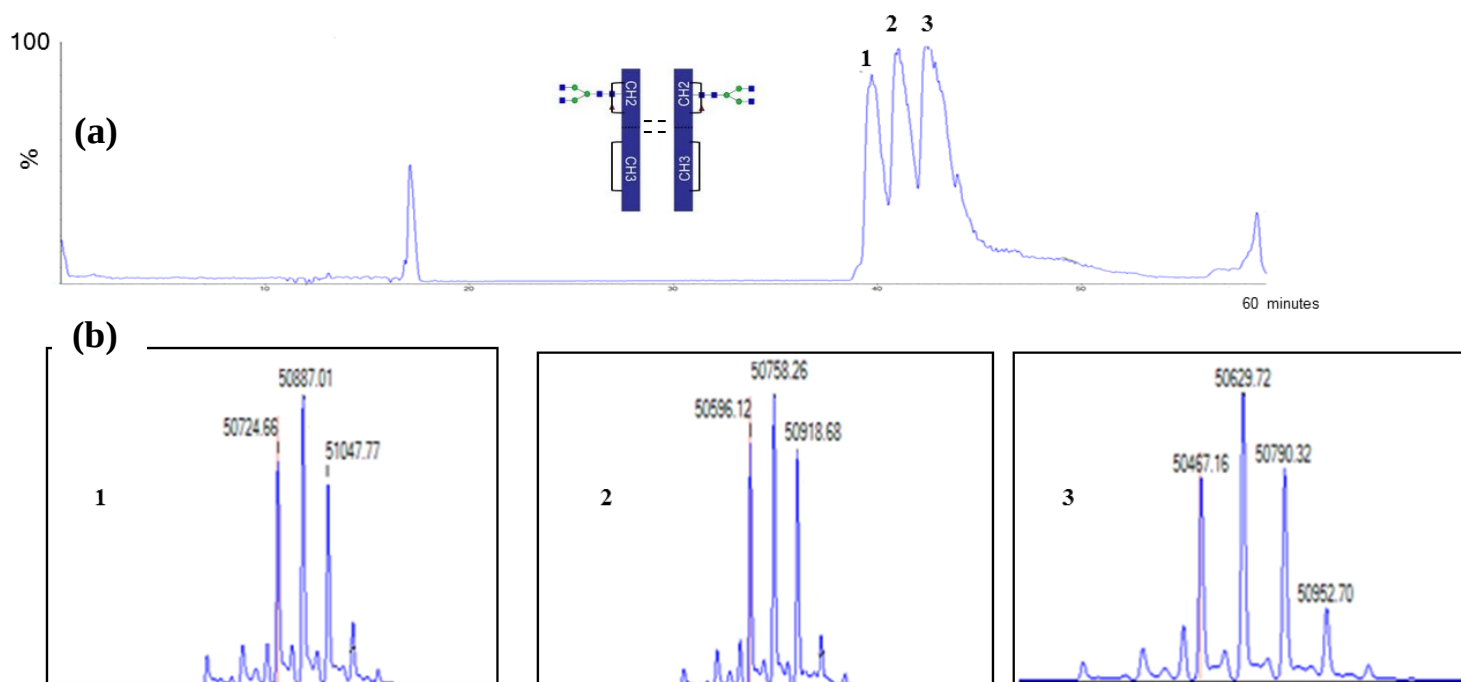


Figure 6 : Séparation du cetuximab middle-up en condition « pseudo-native » par CESI-MS

(a) Electrophérogramme (TIE) (b) Spectre de déconvolution : 1 : homo-dimère de Fc/2 2 : hétéro-dimère de Fc/2 et Fc/2-K 3 : homo-dimère de Fc/2-K

(Conditions expérimentales : Greffage en acrylamide, 30µm ID x 91 cm, Voltage : 15 kV+ 0.5psi, Courant : 2 µA Température : 25°C, Détection UV : 200 nm, Injection : 1psi, 20s (0.4pmol), Echantillon : Cetuximab IdeS à ~2g/l BGE : 20 mM d'acétate d'ammonium à pH : 5.35

3. Conclusion

Dans cette étude, nous avons proposé une nouvelle possibilité de caractérisation du cetuximab partiellement digéré à l'IdeS à l'aide du couplage CESI-MS. Dans un premier temps, une étude préliminaire a été réalisée afin d'évaluer la faisabilité du projet. Tout d'abord une augmentation du pourcentage de greffage neutre à 10% d'HPC a été réalisée afin d'éliminer complètement les phénomènes d'adsorption des composés et le flux électroosmotique. Cela permet aussi d'améliorer la résistance du greffage et la reproductibilité des analyses. Ensuite trois BGE à différent concentration ont été testé dans l'objectif d'un développement de méthodes de séparation du cetuximab middle-up. En condition dénaturante, nous pouvons séparer deux pics

correspondant aux fragments Fc/2 et F(ab)'2 à partir de 5% d'acide formique ou 10% d'acide acétique. Toutefois les séparations n'ont pas été optimisées puisque dans le cas du cetuximab, on peut s'attendre à la séparation de pics correspondant aux fragments Fc/2 – K, Fc/2 et F(ab)'2. En condition « pseudo-native », nous obtenons une séparation des variants du cetuximab à partir de 25mM d'acétate d'ammonium à pH 5,70. Néanmoins la séparation optimale de ces variantes a été obtenue à 50 mM d'acétate ammonium. Dans ces conditions expérimentales, nous avons offert la possibilité d'une séparation des variants du cetuximab sur le couplage direct CESI-MS. Dans le but d'approfondir l'optimisation de cette séparation, une étude de l'influence du pH a été réalisée. Cela a permis de mettre en évidence la gamme de pH optimale, comprise entre 5 et 6, permettant une séparation efficace des variants de charges du cetuximab. Enfin nous avons retenu que les conditions expérimentales optimales permettant une séparation efficace du cetuximab middle-up en un minimum de temps sont un capillaire possédant un greffage neutre à 10% d'HPC dans lequel la séparation électrophorétique est réalisée avec un électrolyte support composé de 50mM d'acétate d'ammonium à pH 5,35. Dans ces conditions, nous pouvons séparer sept pics du cetuximab partiellement digéré à l'IdeS et envisager aisément un transfert de méthodes sur le couplage direct CESI-MS.

L'étude a pu être réalisé sur le couplage CESI-MS en condition dénaturante où nous avons caractérisé avec une grande précision les fragments Fc/2 et F(ab)'2. Et en condition pseudo-native où, malgré les contraintes liées à l'utilisation du capillaire commercial, nous avons pu séparer et identifier trois pics correspondant au fragment Fc/2 avec un BGE composé de 20 mM d'acétate d'ammonium à pH 5,35. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus sur le couplage off-line CE-UV/nanoESI-MS quant à la séparation de dimère du fragment Fc/2 en condition pseudo-native. Toutefois nous rencontrons encore quelques difficultés quant à la détection des fragments F(ab)'2. En effet on suppose que le greffage des capillaires commerciaux utilisés n'est pas suffisamment homogène pour éliminer tous les groupements silanols présent dans la paroi du capillaire. Il y a donc une possible adsorption des variantes de charge du fragment F(ab)'2 sur la paroi du capillaire, ce qui rend difficile leur détection par spectrométrie de masse.

Pour des études futures, il faudrait tendre vers l'utilisation d'un BGE composé de 50 mM d'acétate d'ammonium à pH 5,35 et en faisant varier par la suite le pH dans la gamme optimale comprise entre 5 et 6 afin de mettre en évidence le mécanisme de séparation des variants du fragment F(ab)'2. Cela peut être possible en utilisant des capillaires ne possédant pas une limitation de courant trop basse ou en trouvant un moyen de réduire l'intensité du courant induit par la BGE soit en diminuant le champ électrique au détriment du temps d'analyse ou en ajoutant un additif ou un solvant peu conducteur qui de garde néanmoins les conditions « pseudo-native » nécessaire à la séparation des variants de charges du cetuximab middle-up.

Références bibliographiques :

- (1) Shen, Y.; Smith, R. D. *Journal of Microcolumn separations* **2000**, 12, 135-141.
- (2) Biacchi, M., et al. *ELECTROPHORESIS* **2014**, 35, 2986-2995.
- (3) He, Y., et al. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 3222-3230.
- (4) He, Y., et al. *Journal of separation science* **2011**, 34, 548-555.

PARTIE 3 :

Caractérisation structural d'anticorps conjugués par CESI-MS à différents niveaux : intact, middle-up et peptide.

Chapitre 5 : Caractérisation à différents niveaux d'anticorps conjugués par la combinaison d'approches MS native, middle-up et bottom-up protéomique à l'aide du couplage CESI-MS

Chapitre 5 : Caractérisation à différents niveaux d'anticorps conjugués par la combinaison d'approches MS native, middle-up et bottom-up protéomique à l'aide du couplage CESI-MS

1. Introduction

Les anticorps conjugués (ADCs) sont une catégorie émergente de molécules biothérapeutiques dérivés des anticorps monoclonaux (mAbs). Ils combinent la forte activité anti-cancéreuse des médicaments cytotoxiques ainsi que la sélectivité et les propriétés pharmacologiques favorables des mAbs. La synthèse des ADCs est obtenue par une liaison chimique entre le médicament et le mAbs. Aujourd'hui, deux ADCs (brentuximab vedotin et trastuzumab emtansine) ont été approuvés et mis sur le marché par la FDA, et plus de 50 candidats sont actuellement en cours d'essais cliniques ce qui montre l'intérêt croissant de l'industrie biopharmaceutique pour ces composés. Le principe d'un ADCs est basé sur l'utilisation de la forte spécificité du mAbs pour cibler un type de cellules tumorales et ainsi permettre par relargage, l'application de médicaments extrêmement puissants. Cela limite l'exposition des cellules saines et donc permet d'optimiser les traitements notamment avec la diminution des effets secondaires.

La conjugaison du médicament sur l'ADCs peut être réalisée par différentes réactions chimiques dépendant du site de conjugaison c'est à dire la nature de l'acide aminé ou de la glycosylation concernée. Aujourd'hui, les deux ADCs commercialisés sont issus d'une conjugaison du médicament soit sur une lysine, soit sur une cystéine après réduction des ponts disulfures. De telles réactions chimiques amènent à la production d'un mélange de différentes espèces pouvant porter un nombre fluctuant de médicaments sur la protéine. La complexité de ce mélange peut être retranscrite à l'aide de certains paramètres permettant de caractériser un ADCs : la distribution de conjugués sur le mAbs, la quantité de mAbs non conjugués ainsi que le ratio médicament sur anticorps (DAR). Ces trois paramètres sont considérés comme attributs critiques de qualité (CQAs) pour les ADCs car ils ont un fort impact sur la sécurité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de la molécule.

L'hétérogénéité des ADCs, générée par la variation du nombre et la position de médicaments conjugués sur le mAbs durant sa production, implique une réponse immunitaire différente suivant la valeur du DAR. Tout comme les mAbs, les ADC sont des glycoprotéines complexes potentiellement porteuses de nombreuses micro-hétérogénéités moléculaires dont les sources sont variées (procédés de production inadaptée, conservation prolongée). La complexité de ces protéines et leur utilisation en tant que traitement thérapeutique justifient la

nécessité d'améliorer les méthodologies analytiques de caractérisation. Actuellement, un large panel de techniques analytiques est utilisé pour répondre à la caractérisation structurale fine des protéines thérapeutiques incluant les ADCs. La spectrométrie de masse (MS) a su rapidement s'imposer comme une méthode de choix pour la caractérisation des protéines thérapeutiques, notamment en raison de son excellente spécificité, sensibilité mais aussi car elle permet d'obtenir des informations structurales dans certains cas. Les trois parties précédentes décrites dans ce manuscrit ont démontré l'intérêt du couplage CZE-MS pour la caractérisation structurale de mAbs et l'évaluation de la biosimilarité.

Dans ce chapitre, nous avons donc appliqué une approche globale mettant en œuvre l'utilisation du couplage CESI-MS en tant que plateforme d'infusion nanoESI et méthode séparative pour obtenir la caractérisation structurale à différents niveaux d'un ADCs. L'ADCs sélectionné comme modèle standard pour cette étude est le brentuximab vedotin (BV) qui est l'un des deux ADCs approuvés par la FDA (2011) pour le traitement du lymphome d'Hodgkin. La structure de cet ADCs est basée sur la conjugaison d'un mAbs chimérique cAC10 par un inhibiteur de la tubuline monométhylque auristatine E (MMAE) via réduction des ponts disulfures inter-chaines. La présence de cystéines liées aux MMAE ne perturbe pas la totalité des ponts disulfures entre les chaînes HC et LC ce qui permet de maintenir la structure de la protéine et donc sa haute spécificité pour l'antigène ciblé.

Le premier niveau de caractérisation décrit dans ce chapitre consiste à évaluer le couplage CESI-MS en tant que plateforme nanoESI en MS native pour la détermination du DAR moyen du BV et pour obtenir la distribution de conjugués sur le mAbs. Ensuite, dans le but d'approfondir la caractérisation du BV en utilisant le même système, nous avons réalisé une approche middle-up par digestion IdeS. La réaction enzymatique de l'ADCs avec l'IdeS suivi de son passage en MS permet d'obtenir deux types de fragments distincts (Fc/2 et F(ab')₂) ainsi que de nombreuses informations de structure. Enfin, une méthode CESI-MS basée sur une approche bottom-up protéomique a été développée dans le but d'obtenir la structure primaire de l'ADCs ainsi que les peptides liés aux médicaments. En effet, due aux propriétés d'hydrophobicités du médicament, nous avons dans un premier temps optimisé les conditions du protocole de digestion tryptique. Puis, à l'aide du couplage CESI-MS, nous avons réalisé la caractérisation simultanée de la séquence en acide aminé de l'ADCs ainsi que son profil de glycosylation et l'identification des peptides conjugués. Ceci nous a permis d'obtenir des informations primordiales de structure concernant l'efficacité de conjugaison du médicament sur le mAbs.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication dans le journal scientifique *Analytica Chimica Acta* (Elsevier 2016).

2. Structural characterization of antibody drug conjugate by a combination of intact, middle-up and bottom-up techniques using sheathless capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry as nanoESI infusion platform and separation method

Nassur Said, Rabah Gahoual, Lauriane Kuhn, Alain Beck, Yannis-Nicolas Francois, Emmanuelle Leize-Wagner, *Analytica Chimica Acta* 2016, 918, 50-59.

2.1. Abstract

Antibody-drug conjugates (ADCs) represent a fast growing class of biotherapeutic products. Their production leads to a distribution of species exhibiting different number of conjugated drugs overlaying the inherent complexity resulting from the monoclonal antibody format, such as glycoforms. ADCs require an additional level of characterization compared to first generation of biotherapeutics obtained through multiple analytical techniques for complete structure assessment. We report the development of complementary approaches implementing sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry (sheathless CE-MS) to characterize the different aspects defining the structure of brentuximab vedotin. Native MS using sheathless CE-MS instrument as a nanoESI infusion platform enabled accurate mass measurements and estimation of the average drug to antibody ratio alongside to drug load distribution. Middle-up analysis performed after limited IdeS proteolysis allowed to study independently the light chain, Fab and F(ab')₂ subunits incorporating 1, 0 to 4 and 0 to 8 payloads respectively. Finally, a CZE-ESI-MS/MS methodology was developed in order to be compatible with hydrophobic drug composing ADCs. From a single injection, complete sequence coverage could be achieved. Using the same dataset, glycosylation and drug-loaded peptides could be simultaneously identified revealing robust information regarding their respective localization and abundance. Drug-loaded peptide fragmentation mass spectra study demonstrated drug specific fragments reinforcing identification confidence, undescribed so far. Results reveal the method ability to characterize ADCs primary structure in a comprehensive manner while reducing tremendously the number of experiments required. Data generated showed that sheathless CZE-ESI-MS/MS characteristics position the methodology developed as a relevant alternative for comprehensive multilevel characterization of these complex biomolecules.

2.2. Introduction

Antibody-drug conjugates (ADCs) are an emerging category of biotherapeutic products, derived from monoclonal antibodies (mAbs)[1], they combine the high anti-cancer potency of cytotoxic drugs to the exquisite selectivity and favorable pharmacological properties of mAbs and are obtained through chemical linkage [2]. In addition to the recent approval by the US Food and Drugs Administration (FDA) of brentuximab vedotin (Adcentris, Seattle Genetics) and trastuzumab emtansine (Kadcyla, Genentech/ Roche), more than 50 ADCs are currently investigated in clinical trials indicating the broad interest of the biopharmaceutical industry for this type of treatments [3, 4]. ADCs incorporate highly potent warheads which can be delivered using the specificity provided by mAbs to target tumor cells and limit exposition of healthy cells therefore optimizing treatment potency and limit the occurrence of side effects [5].

Drug conjugation can be implemented through different chemical reactions depending on the amino acid residue or glycan concerned [6]. Especially, drug coupling using the lysine residue's amino group and cysteine residues through thiol group after reduction of disulphide bridges have been reported[7, 8]. Drug conjugation reaction leads to the production of a mixture of different species showing various numbers of drugs conjugated to the protein. While for a single species, drugs can still be distributed in various manner on the different conjugation sites. This complexity is reflected by parameters such as the drug loading and distribution, the amount of naked antibody (D0) and the average number of drug to antibody (DAR). These three parameters are critical quality attributes (CQAs) for ADCs because they impact on safety, pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) [9].

ADCs heterogeneity generated from different number and position of conjugated drugs during production is combining to the intrinsic variability coming from conjugation with mAbs. mAbs are complex glycoproteins exhibiting a consequent number of micro-heterogeneities which can influence significantly antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity of the considered mAb [10, 11]. Currently a large panel of analytical techniques are required in order to perform a comprehensive structural characterization of biotherapeutic proteins including ADCs [12]. Mass spectrometry (MS) has gradually taken a decisive position in structure characterization of biopharmaceutical products [13-15], likewise ADCs, mainly due to an outstanding selectivity allowing the identification of the different species composing ADCs samples and the opportunity to obtain structural information [16]. MS still often needs to be used in concomitance with separation methods mainly including liquid chromatography[17, 18]. Recently, we described a method using capillary zone electrophoresis (CZE) coupled to tandem MS with a sheathless interface to perform the simultaneous characterization of several aspects of a protein in one injection including amino acid sequence, glycosylation characterization and other types of posttranslational modifications (PTMs) [19, 20].

In this work, we report the development of a combined approach implementing a sheathless capillary electrophoresis (CE) interface used as nanoESI infusion platform or as separation method, hyphenated to tandem MS (MS/MS) for the detailed structural characterization of different traits composing the primary structure of ADCs. The ADC considered is brentuximab vedotin (BV) which has been approved in 2011 by the FDA and consequently by the European Medicine Agency (EMA) for the treatment of Hodgkin Lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma [7, 21]. It is composed of the tubulin inhibitor monomethyl auristatin E (MMAE) conjugated to the chimeric mAb cAC10 via a protease cleavable maleimidocaproyl-valine-citrulline-((p-aminobenzyl)oxy)carbonyl linker (MC-PV-PABC) by reduction of the interchain disulfide bonds [7, 22]. The presence of the cysteine linked MMAE does not disrupt the interchain disulfide bonds between the heavy chain (Hc) and (Lc) of the mAb which allows to maintain the higher order structure of the protein and therefore its specificity for the targeted antigen [23, 24].

As the first level of characterization, we evaluated the sheathless CE-MS system as nanoESI infusion platform for native MS determination of the average DAR of BV and to obtain the drug load distribution. In a second step, to further investigate the characterization of BV using the instrument setting, we realized the middle-up analysis of BV by IdeS proteolysis. IdeS enzymatic reaction cleaves ADC between the two consecutive glycine residues present in the hinge region to obtain two types of fragments (Fc/2 and F(ab')₂). Finally, a sheathless CE-MS/MS method derived from bottom-up proteomic analysis was developed in order to be fully compatible to the requirement of the analysis of ADCs. Analysis of BV was performed by sheathless CZE-ESI-MS/MS enabling the simultaneous characterization of the amino acid sequence of the ADC alongside to the characterization of glycoforms as well as drug-loaded peptides giving precious information regarding the drug effectively conjugated to the mAb.

2.3. Materials and Methods

Materials. Chemicals used were of analytical grade or high purity grade and purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). RapiGest SF surfactant was purchased from Waters (Milford, MA, USA). IdeS (immunoglobulin degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*) also named FabRICATOR was purchased from Genovis (Lund, Sweden). Brentuximab vedotin (Adcetris®) was produced by Millenium Pharmaceuticals/Takeda (London, UK).

Intact ADC sample preparation. Brentuximab vedotin (BV) was buffer exchanged with 200 mM ammonium acetate buffer, pH 7.0 using Amicon centrifugal filters (cut off = 10,000 Da) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Six desalting step were performed at 10°C and 14,000×g for 20 min each step. Ammonium acetate allows the native structure of proteins to be preserved and be compatible to ESI-MS.

ADC IdeS digestion. BV was cleaved in the hinge region using proteolysis by IdeS (FabriCATOR, Genovis) to obtain two Fc/2 fragments and one F(ab')₂ fragment. Sample was diluted using 147.25 µL of 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4, to a final concentration of 1 µg/µL. A volume of 2.25 µL of IdeS (67 units/µL) was added to the sample which was left at 37°C for 30 min. After digestion completion, sample was buffer exchanged with 200 mM ammonium acetate buffer, pH 7.0 using Amicon centrifugal filters (cut off = 10,000 Da) at 10°C and 14,000×g for 20 min.

In solution protein digestion. Prior to tryptic digestion, BV was cleaved by IdeS following the ADC IdeS digestion protocol. After IdeS digestion completion, sample was buffer exchanged using three desalted cycles (Amicon centrifugal filters, 10,000 cutoff) with 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0 at 4°C and 14 000g for 20 min. Theoretical concentration of 12.5 µg/µL was obtained by reducing sample volume to 10 µL. Sample were then diluted using 0.1% RapiGest surfactant to a final concentration of 6.25 µg/µL and heated to 40°C during 10 min. Dithiothreitol (DTT) was added to the sample in order to obtain a final concentration of 25 mM. Samples were then heated to 80°C during 10 min. After being cooled down to room temperature (RT), 10% of acetonitrile was added to the sample. A volume of 2 µL of trypsin (0.5µg/µL) was added to the sample which was left at room temperature for 3h, another volume of 2 µL was added afterward. Digestion was performed overnight at 37°C. A second reduction step was performed by addition of DTT to a final concentration of 35 mM and heated for 45 min at 56°C. Then 40% of isopropanol was added to the sample. After digestion completion, formic acid (FA) was added to a final concentration of 1% (v/v) in order to cleave the surfactant. Sample was left at RT for 2h. Sample was finally diluted to a final concentration in protein of 2.2 µM using ammonium acetate 50 mM, pH 4.0.

Capillary electrophoresis. CE experiments and NanoESI infusion experiments were performed with a CESI8000 capillary electrophoresis system from Sciex Separation (Brea, CA, USA). Bare fused-silica capillaries (total length 100 cm; 30 µm i.d.) with characteristic porous tip on its final end on 3 cm, a second capillary (total length 80 cm; 50 µm i.d.) filled during experiments with BGE allows electric contact. New capillaries were flushed for 10 min at 75 psi (5.17 bar) with methanol, then 10 min with 0.1 M sodium hydroxide, followed 10 min with 0.1 M hydrochloric acid and water for 20 min also at 75 psi. Finally, the capillary was flushed 10 min at 75 psi with BGE which was 10% acetic acid. For CE experiments, hydrodynamic injection (10 psi for 1 min) corresponding to a total volume of 90 nL of sample injected was used. Separations were performed using a voltage of +20 kV. For infusion experiments, sample was flushed into the capillary at 50 psi for 3 min. The infusion was carried out by flushing sample at 5 psi for 5 min corresponding to a total volume of 245 nL of sample.

Mass spectrometry. For ADC peptide mapping characterization, the CESI8000 system was hyphenized to a Triple TOF 6600 mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany). The TripleTOF 6600 MS is equipped with a

hybrid analyzer composed of a quadrupole followed by a time-of-flight (TOF) analyzers. ESI source parameters was set as follow: ESI voltage -1.45kV while Gas supplies (GS1 and GS2) were deactivated, source heating temperature 150°C and curtain gas value 4. Mass/charge (m/z) range was 100-2000 in MS and 50-2000 in MS/MS. External calibration was performed using a digest of β -galactosidase from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). For ADC NanoESI infusion experiments, the CESI8000 system was coupled to a maxis 4G (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). MS transfer parameters were optimized using the actual sample directly infused via the CE system using a pressure of 5 psi (340 mbar). Ion funnels were set at values of 300 and 400 Vpp. The electrospray voltage (capillary voltage) typically ranged from -1.2 to -1.8 kV. Dry gas was set at 1.5 L/min and source temperature at 180 °C. Data processing was performed with DataAnalysis 4.0. Deconvolution of the mass spectra was performed on the basis of maximum entropy analysis using ESI Compass 1.3 Maximum Entropy Deconvolution Option. All spectra were calibrated by external calibration using CsI from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA).

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

Drug-to-Antibody Ratio (DAR) determination. Average DAR values are calculated from the relative peak area of each peak from the charge state deconvoluted mass spectrum. Average DAR value is obtained following the equation:

$$DAR = \frac{\sum nA_{Drug}}{\sum A_{Drug}}$$

With n the number of drug loads ranging from 0 to 8.

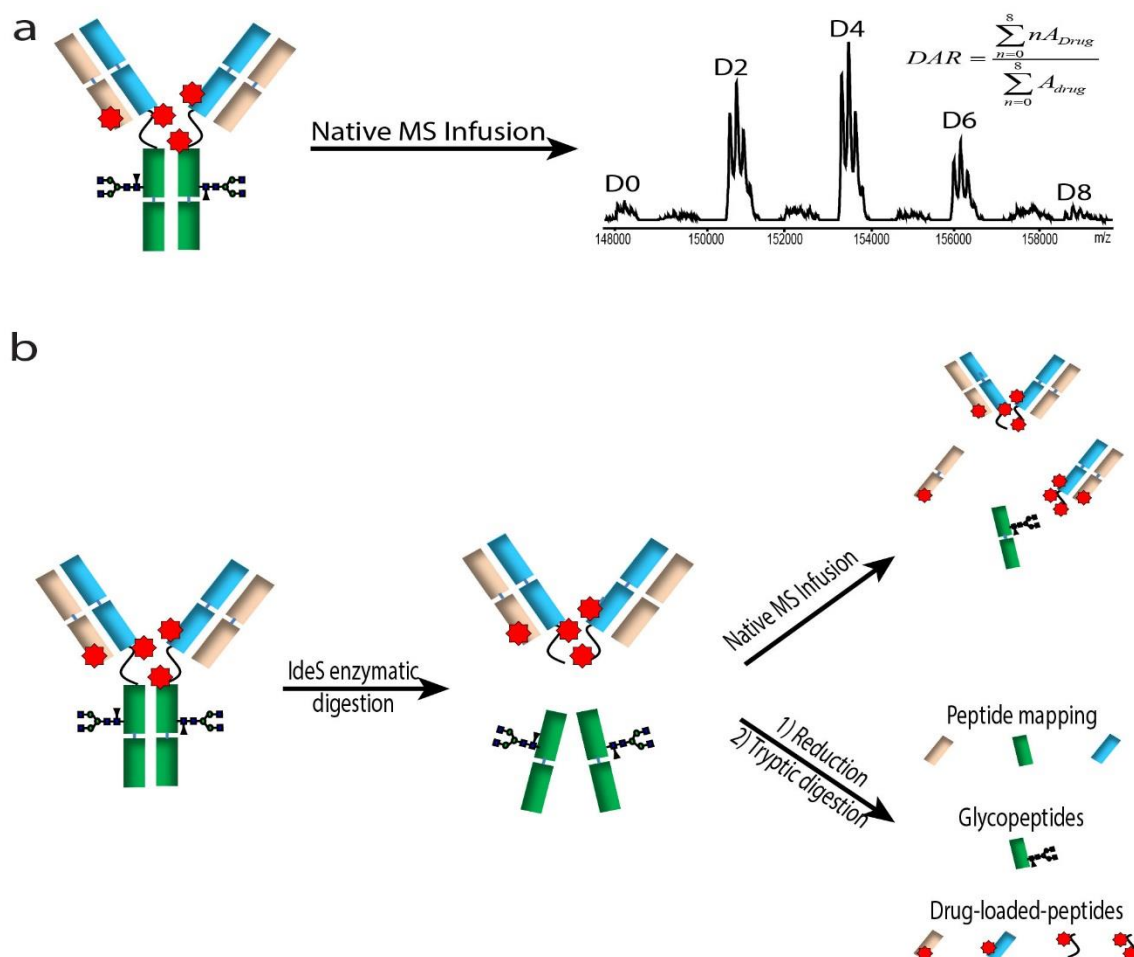


Figure 1. Overview of brentuximab vedotin structural characterization using sheathless CE-MS. (a) Native MS infusion for average DAR determination and drug loaded distribution assessment, (b) middle-up and bottom-up analysis.

2.4. Results and discussions

2.4.1. Average DAR determination using sheathless CE-MS Interface as a nanoESI emitter

For the first level of the characterization of ADCs, we determined the average DAR of BV and we assessed the drug load distribution by native MS on a high resolution Q-TOF instrument using sheathless CE-MS interface as a nanoESI emitter (Figure 1-a). In a recent work, we demonstrated the suitability of sheathless CE-MS system to be used as nanoESI infusion platform [25]. Benefits of nanoESI as the lower source temperature and spraying voltage, the increase of sensitivity and the decrease of ion suppression phenomenon make this interface a particularly suitable system for biotherapeutic characterization. To achieve optimal MS resolution and sensitivity, BV was systematically desalted before infusion removing any components in the formulation buffer that can affect the stability of the spray. Within a single run of 5 min at a flow rate of 50 nL/min which represent an infused sample volume of 250 nL, we obtained a distribution of baseline resolved species of BV (Figure 1-a) with masses corresponding to the intact mAb linked with zero to eight payloads (Table S-1). Mass

accuracies on intact BV using Q-TOF instrument is in total agreement with results reported in the literature [15, 24]. As expected, no detection of ions corresponding to dissociated BV, referring to free drug loaded Lc or Hc formed during the ionization or the ion transfer inside the mass spectrometer, were observed confirming that the combination of sheathless CE-MS interface with native MS enhances the detection of drug load species and allows to obtain the drug-load distribution. Based on charge state deconvoluted mass spectrum of intact and deglycosylated BV, average DAR value of 3.8 and 3.9 respectively were calculated using the relative quantification from the peak area of each peak and the corresponding number of drugs loaded. Obtained average DAR values are in good agreement with values described in the literature [15, 24] [23]. It demonstrated the ability of the sheathless CE-MS system used as nanoESI infusion platform to get structural information of intact BV within a single run and consuming in total less than of 3 µg of ADC samples.

2.4.2. Middle-up analysis of brentuximab vedotin

Dozens of recent reports from the FDA, Industry and academic clearly show that to extensively characterize large biopharmaceuticals such as mAbs, ADC, biosimilars to name a few, consistent data must be reported at multiple levels [26-34]. To investigate deeper the structure of BV using the same system, we performed the middle-up analysis of BV by IdeS proteolysis. Middle-up refers to the mass measurements of large fragments of proteins after proteolysis [27]. IdeS is a cysteine endopeptidase enzyme naturally secreted by *Streptococcus pyogenes* [35], IdeS enzymatic reaction cleaves specifically immunoglobulin G (IgG) between the two consecutive glycine residues present in the hinge region (Figure 1-b). IdeS cleavage results in two fragments (Figure 1-b) : Fc/2 domain carrying a N-glycosylation site in the Asn 297 with a mass of approximately 25 kDa (Table S-1) depending on the glycoform and F(ab)'2 domain potentially linked by zero to eight payloads with masses of approximately 97 kDa to 108 kDa (Table S-1). Following the same protocol used for intact ADC, within a single run of 5 min at a flow rate of 50 nL/min, we obtained a raw MS data with three main charge envelope profiles (Figure 2-a). The resulting most intense charge envelope between m/z 2000 and 3300 (Figure 2-b) corresponds to the light chain (Lc) with the incorporation of one payload ($M_w = 25040.1 \pm 0.1$ Da). Of note, two glycations corresponding to a difference of mass of 162 Da were characterized (Figure 2-b1). The second part of the raw data matching to the most intense charge envelope between m/z 3500 and 4800 corresponds to two different subunits of the BV. First, as shown in Figure 2-b2, the measured masses correspond to the Fab domain linked by zero to four payloads (Table S-1). This confirms that, even in native condition, IdeS reaction affects BV with the partial loss of noncovalent interaction certainly due to the hydrophobicity of the drug whose the chemical impact is greater on 100 kDa subunits as compared to intact ADC.

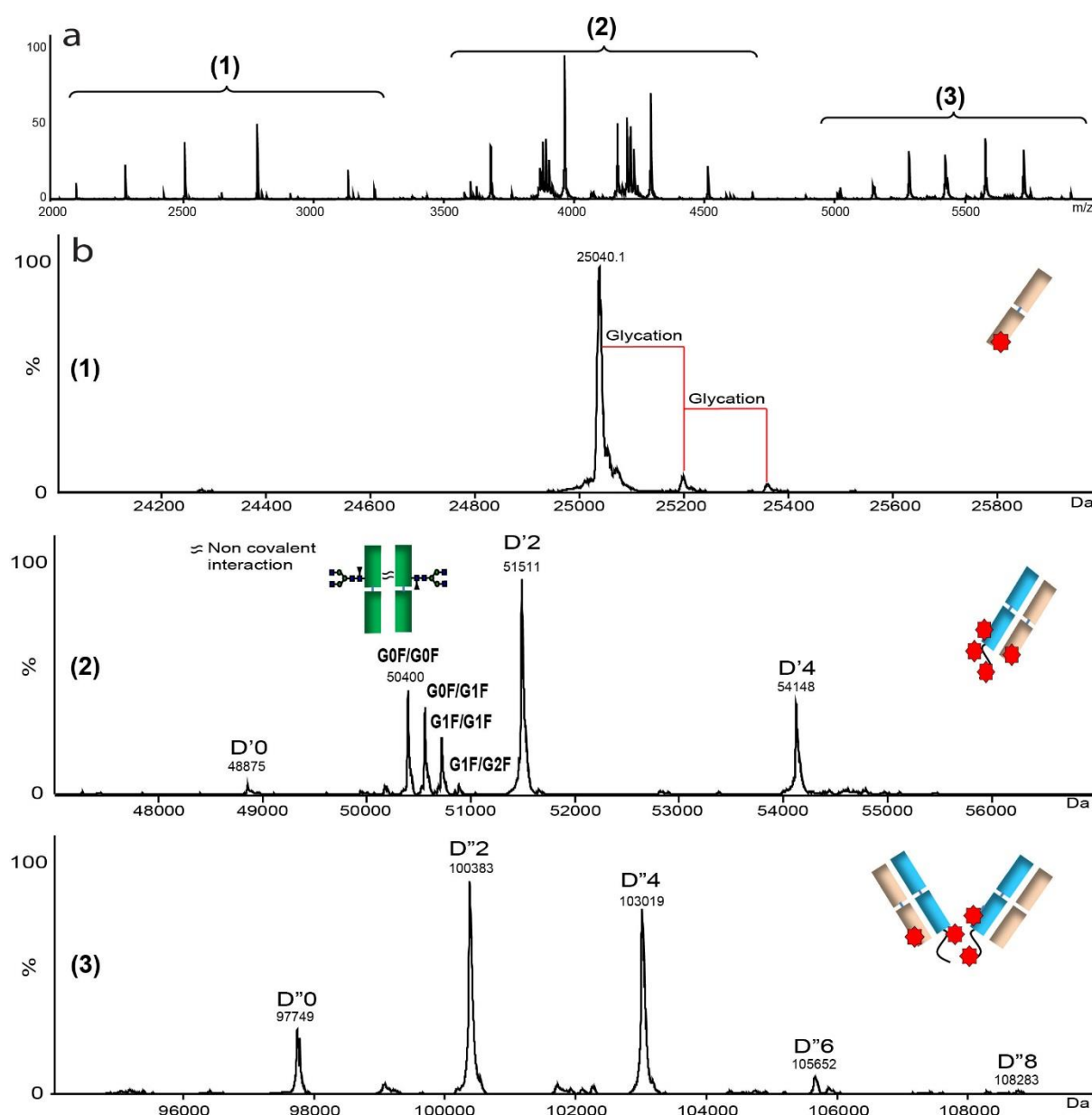


Figure 2. (a) MS spectra corresponding to Native MS NanoESI infusion of middle-up brentuximab vedotin. (b) Charge state deconvoluted mass spectra of (1) Lc-drug conjugated subunit, (2) Fab subunits with the incorporation of 0 to 4 payloads and $F_{c/2}$ homodimers and (c) $F(ab)'_2$ subunits with the incorporation of 0 to 8 payloads.

In second way, charge variant deconvoluted mass spectra also generated multiple masses between 50.4 kDa to 50.8 kDa (Figure 2-b2). These peaks correspond to the formation of protein-protein aggregates due to noncovalent interactions between $F_{c/2}$ subunits. Indeed, mass peak 50400 ± 1 Da correspond to the mass of $F_{c/2}$ subunits homodimer bearing two G0F glycosylation (Table S-2). Other mass peaks between 50.4 kDa and 50.8 kDa correspond to the expected presence of the combination of neutral glycosylation variants of this dimer (Table S-1). In addition, no deconvoluted mass spectrum have been observed at 25 kDa that excludes the presence of free $F_{c/2}$ variants in ammonium acetate 200mM at pH 7.0. To our knowledge, this is the first time that non-covalent dimers of ADC $F_{c/2}$ subunits have been observed and characterized. Finally, the third profile

of the raw data (Figure 2-a) corresponding to the most intense charge envelope between m/z 5000 to 6000 is in agreement with the theoretical masses of $F(ab')_2$ subunits with the incorporation of 0, 2, 4, 6 and 8 payloads (Figure 2-c3 and Table S-1). The profile obtained for the middle-up analysis shows that IdeS digestion generates for the same part of the protein different kind of fragments which is illustrated for example by the detection of free Lc and $F(ab')_2$ incorporating also the Lc of the ADC. Therefore the mixture generated from the limited digestion did not allow to estimate a satisfying DAR value justifying the intact analysis described previously. However IdeS proteolytic digestion still remains relevant in order to study specific traits defining the structure of therapeutic proteins due to the lowered and distinctive m/z range, especially to evaluate the efficiency of the coupling reaction for each proteolytic fragment. Therefore MS resolution and mass accuracy is improved supported by the increase of sensitivity and the decrease of ion suppression phenomenon provided by the nanoESI infusion demonstrated the ability of the sheathless CE-MS system to obtained structural information of BV after proteolysis.

2.4.3. Primary structure characterization of brentuximab vedotin.

MS based bottom-up analysis is commonly used to determine protein amino acid sequence and to locate or quantify PTMs. For primary structure characterization (Figure 1-b), this methodology is particularly crucial in early development of therapeutic antibodies as well as during long-term life cycle management of the biopharmaceutical products [36]. As part of this work, one of the objectives was to investigate the possibility to perform robust and confident peptide mapping of BV by sheathless CZE-ESI-MS/MS.

BV was characterized in a bottom-up proteomic adapted strategy, samples were digested by trypsin using an in solution digestion protocol. Recently, we described a method using sheathless CZE-ESI-MS to perform the simultaneous characterization of several aspects of a mAb in one injection including amino acid sequence and in comitance several types of PTMs [19, 37]. However, for the BV analysis, the intensity of some peptide signals on the electropherogram was low or non-existent due to the presence of hydrophobic drug-loaded-peptides. More recently, Janin-Bussat et al. described the first Lys-C digestion protocol for the characterization of drug-loaded-peptides of ADC by LC-MS analysis. They improved the classical protocol by several steps of reduction, fractionation, enrichment and addition of organic solvent during the digestion protocol to maintain the drug-loaded peptides in solution [17].

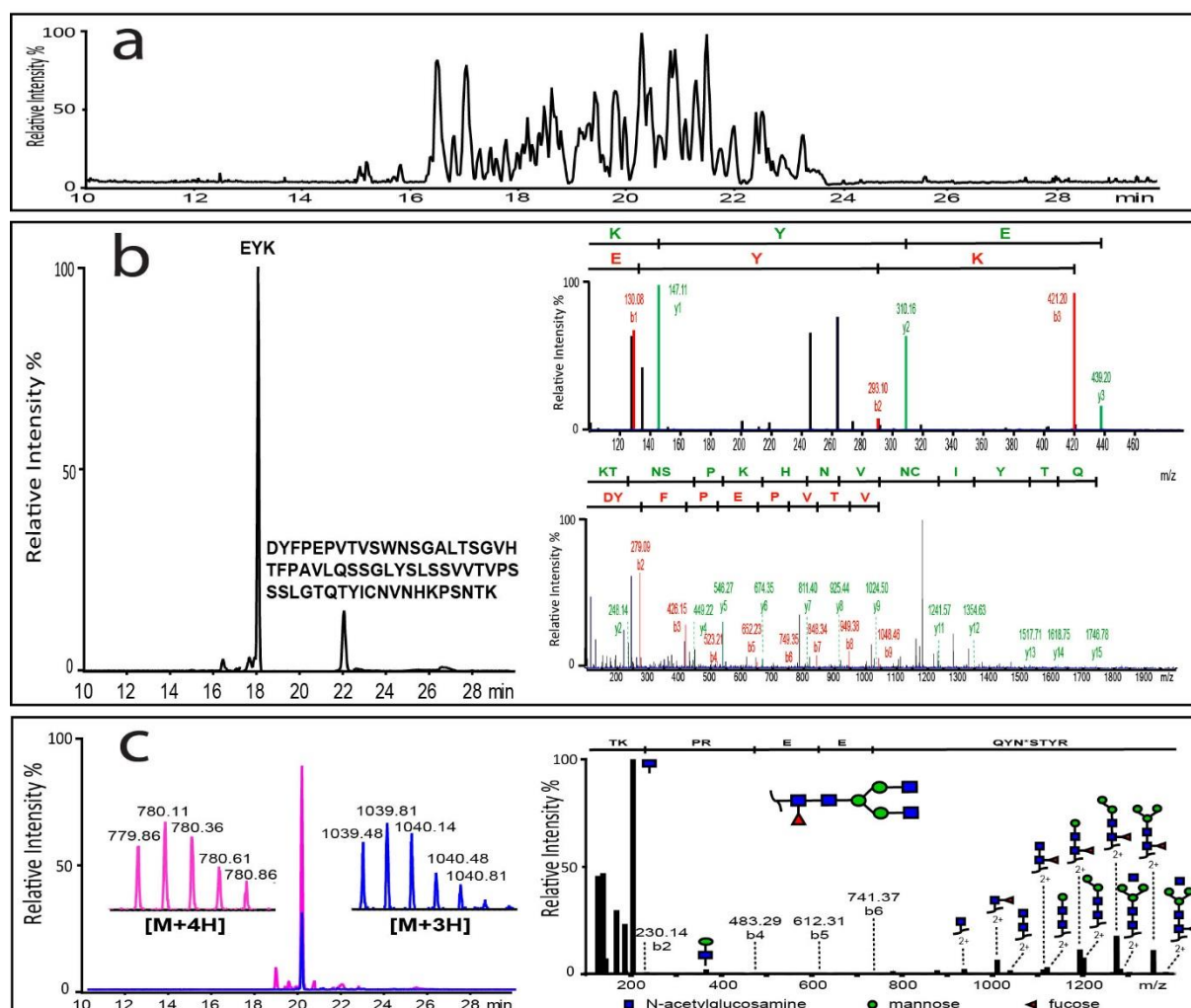


Figure 3. (a) Base Peak Electropherogram corresponding to the analysis by CESI-MS of brentuximab tryptic digest. (b) Extracted Ion Electropherogram (EIE) corresponding to the m/z ratios of [EYK] and [DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK]. MS/MS fragmentation spectra for both peaks (right-hand side). (c) EIE of m/z ratios 780.11 and 1039.81 ([TKPREEQYNSTYR] + G0F) and corresponding MS/MS fragmentation spectra (right-hand side).

Taking that into account and to enhance the level of characterization especially regarding ADCs amino acid sequence, glycoforms and drug-loaded-peptides, the sample treatment was adapted for trypsin digestion while still compatible with the electrophoretic separation, and modified with the elimination of the enrichment and LC collection steps. Briefly, prior to trypsin digestion protocol, IdeS enzymatic reaction was performed to cleave BV between the two consecutive glycine residues present in the hinge region to obtain the Hc peptide [THTCPPCPAPELLG] which can be conjugated by one or two payloads. After IdeS digestion completion, sample was buffer exchanged against 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0. Before trypsin digestion, 10% of acetonitrile was added to the sample and 40% of isopropanol after digestion [17]. Sample was finally diluted to a final concentration in protein of 2.2 μ M using ammonium acetate 50 mM, pH 4.0. BV digests were analyzed through sheathless CZE-ESI-MS/MS with an injection volume corresponding to a quantity of 200 fmol of digested peptides.

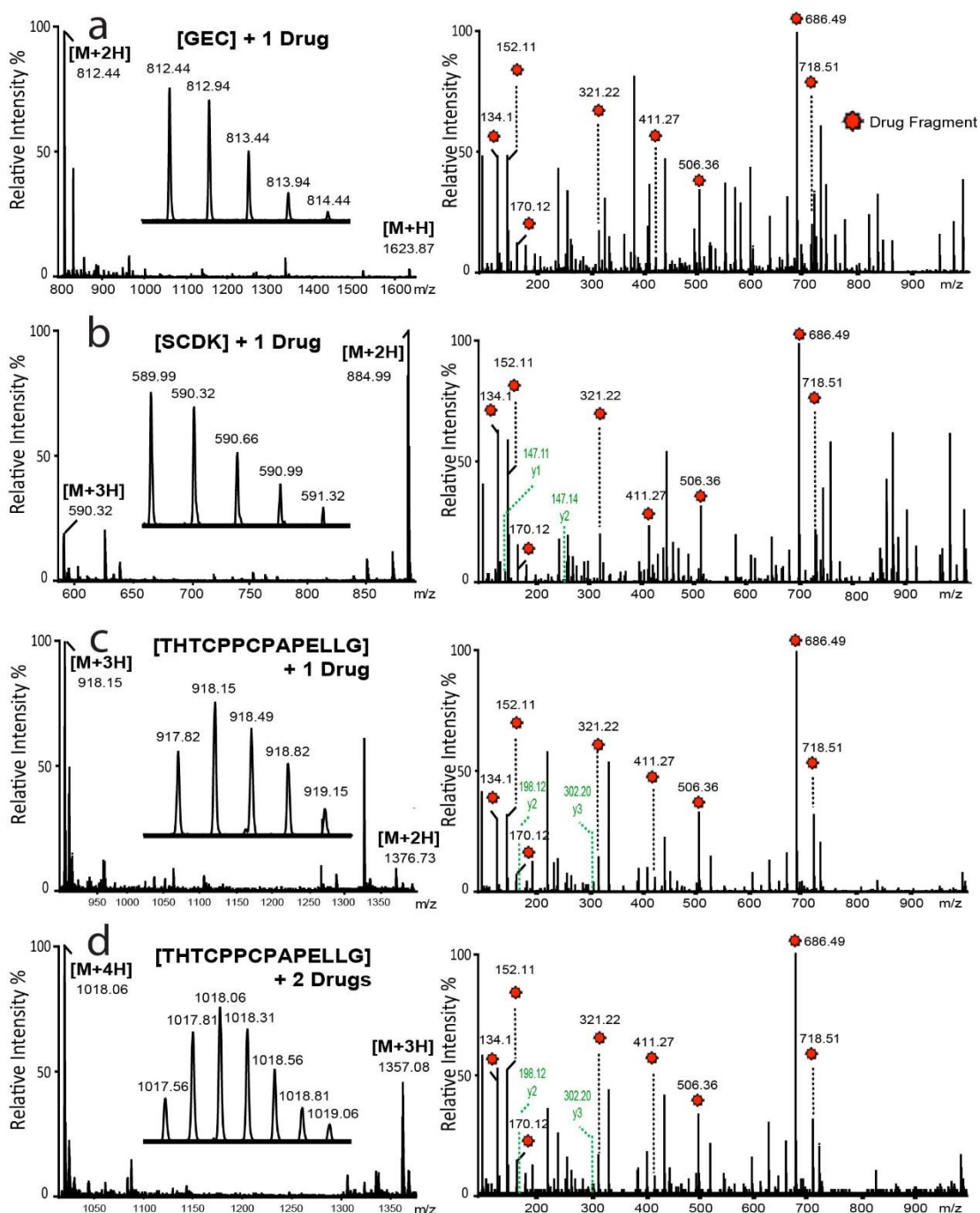


Figure 4. MS and MS/MS spectra of drug-loaded peptides. (a) [GEC] + 1 payload, (b) [SCDK] + 1 payload, (c) [THTCPPCPAPELLG] + 1 payload and (d) [THTCPPCPAPELLG] + 2 payloads

The total duration of the separation was less than 35 min and the resulting electropherogram showed that all peptides were detected between 14 to 28 min (Figure 3-a). The tremendous efficiency of CZE separation allows peak widths at half height ranging from 0.15 min down to 0.8 min representing a number of theoretical plates ranging from 200000 up to 600000 plates. Digested peptides were analyzed by MS/MS enabling to characterize in a single injection the complete sequence coverage of BV. These results confirm the absence of any detrimental effect due to the modification of the enzymatic proteolysis protocol on the amino acid sequence characterization compared to previously published results [19]. The presence of organic solvent during

reduction and digestion steps did not prevent the electrophoretic separation and detection of tryptic peptides regardless of their properties. Indeed, tryptic digestion produces a heterogeneous mixture of peptides, especially with regard to their number of amino acids. The identification during the analysis of very small peptide of 3 amino acids are observed alongside to a 63 amino acids peptide having a molecular mass of 6656.29 Da (Figure 3-b). Additionally, peptide identification was based on both peptide mass measurement and fragmentation products using MS/MS spectra in order to enable unambiguous characterization. Results demonstrate the possibility to perform characterization of ADCs amino acid sequence using the sheathless CZE-ESI-MS/MS method developed advanced and using only a single injection of 200 fmol of digested BV peptide mixture.

2.4.4. Characterization of brentuximab vedotin N-glycosylation.

ADCs are glycosylated proteins and those glycans are naturally incorporated in the protein during secretion into the extracellular environment [6]. BV is N-glycosylated on the Asn 297 in the CH2 region. The excellent ionization efficiency provided by sheathless CZE-ESI-MS allows detection of glycopeptides with significant intensities, generating good quality MS/MS identification of even lowly abundant species. N-glycosylation characterization of BV was performed using the same data sets used for peptide mapping. In the case of BV, the extracted ion electropherograms (XIE) of the m/z ratio matching to the peptide TKPREEQYN297STYR bearing 11 glycosylations were observed (Table S-2). Identifications were based on accurate mass measurement in MS1 (Figure 3-c) provided by high resolution MS and additionally fragmentation spectra. MS/MS spectra corresponding to the fragmentation of the different glycopeptides were subsequently extracted from the data. As expected with low energy collision induced dissociation (CID), product ions observed in MS/MS mainly correspond to the fragmentation of the glycan moiety. Very low intense b ions fragment can be observed but the peptide backbone is usually preserved (Figure 3-c). All detected glycopeptides have a charge state of 3 and 4. The similarity of the glycoforms characterization of BV in terms of number of glycosylation and MS/MS quality spectra as compared to the mAb characterization previously described [19], allows to conclude that the modification of the enzymatic protocol, especially the presence of acetonitrile and isopropanol did not affect the characterization of glycopeptides.

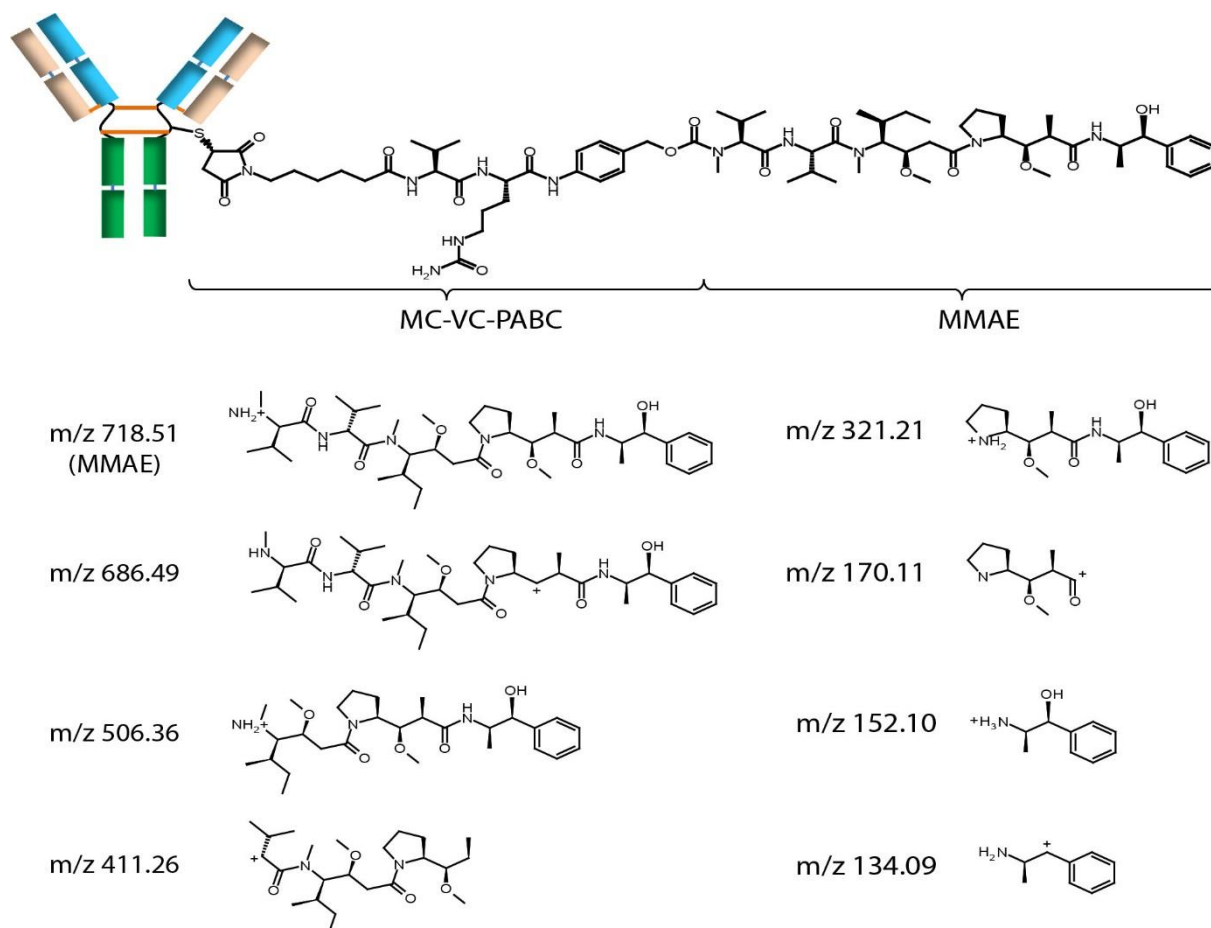


Figure 5. Schematic structures of brentuximab vedotin and characteristic fragments of MMAE payload

2.4.5. Identification of drug-loaded-peptide of BV

The final aim of this work was to propose a methodology using CZE-ESI-MS/MS allowing to obtain structural information of ADCs especially regarding drug-loaded-peptides. The major issue concerning the characterization of drug-loaded-peptide is based on their hydrophobic properties because of the presence of the conjugated drug [24]. Using the protocol we developed in a previous work for the characterization of mAbs based on an aqueous solution trypsin digestion [19], no or very low intensity of these modified peptides was observed due to a possible precipitation during the reduction or digestion steps. Hydrophobic drug-loaded peptides generated from the tryptic digestion of BV could be successfully maintained in solution by incorporating acetonitrile and isopropanol in the sample preparation. These peptides could be successfully identified (Figure 4). Each peptide were characterized based on accurate mass measurement in MS1 provided by high resolution MS and additionally by the characteristic in-source fragmentation ions (m/z 718.51) described by Junutula et al [38] and also with seven additional diagnostic ions (m/z 686.49, 506.36, 411.26, 321.21, 170.11, 152.10, 134.09) observed in all MS/MS spectra of molecules containing MMAE (Figure 4). As glycopeptide characterization, product ions, observed in MS/MS with low energy CID, mainly correspond to

the fragmentation of the MMAE moiety. Very low y ion fragment can be observed but the peptide backbone is usually preserved. However, while glycopeptide MS/MS spectra allow to detect ions corresponding to fragments of glycopeptide, drug-loaded-peptide MS/MS spectra only allow to detect the fragmentation of the drug. This makes it necessary to have a few signing ions on the MS/MS spectrum to characterize those peptides without ambiguity. The seven diagnostic ions have been identified by a molecular modeling study using Mass Spec Calculator Pro (BCP Instrument, France). Figure 5 shows the structures of MMAE fragments matching with the theoretical masses detected in all drug-loaded-peptides MS/MS spectra.

Brentuximab vedotin drug localization			
Peptide	Unmodif	+ 1 payload	+ 2 payload
GEC	31.2 ± 3.4	68.8 ± 3.4	
SCDK	89.8 ± 6.3	10.2 ± 6.3	
THTCPPCPAPELLG	88.8 ± 2.5	10.4 ± 2.2	0.9 ± 0.5

Table 1. Table summarizing the study regarding drug-loaded-peptides occurrence levels for brentuximab vedotin (distribution %intact/%modification) were determined through signal intensity for each targeted drug-loaded-peptide.

Using the same set of data, we identified four different drug-loaded-peptides. Peptides presented a [M+2H] mass of 812.44 (Figure 4-a) and a [M+2H] of 884.99 (Figure 4-b), were corresponding the theoretical masses of the Lc peptide [GEC] and the Hc peptide [SCDK] both conjugated to 1 payload. The peptide corresponding to m/z 918.15 exhibiting a charge state of 3+ (Figure 4-c) was consistent to the Hc peptide [THTCPPCPAPELLG] conjugated to 1 MMAE molecule. Finally, the peptide presented a [M+4H] mass of 1018.06 was compatible the Hc peptide [THTCPPCPAPELLG] conjugated to 2 payloads. For [GEC] and [SCDK], Cys 218 and Cys 220 are involved in the disulfide bond with the Lc peptide and the Hc peptide respectively, while for [THTCPPCPAPELLG] Cys 226 and Cys 229 are involved in the disulfide bonds between the two Hc. Those results confirm the characterization of the expected drug-loaded-peptides linked to the interchain cysteines of the Hc and Lc [17]. The capacity to separate peptides having payload is clearly interesting because they tend to compete against each other during the ionization process, potentially interfering with relative quantification. Using the sheathless CZE-ESI-MS/MS methodology, the m/z ratios corresponding to the native peptide and the peptide incorporating 1 or 2 payloads (Table 1) migrate as two different peaks separated by several minutes. In the context of characterization of BV, results of relative quantitation allowed to estimate site by site the yield of drug incorporation (Table 1). To evaluate the robustness of this method, the analysis was repeated six times and considered as technical replicates, allowing us to obtain equivalent results. The same data were used for MS/MS peptide mapping, glycoforms and drug-loaded-peptide characterization without requiring additional experiments. Results detailed in this section clearly shows the ability using sheathless CZE-ESI-MS/MS analysis to perform a site specific localization study of the conjugation between the mAb and the drug employed giving additional information required in the development pipeline of ADCs therefore completing the primary structure characterization of this type of therapeutic proteins.

2.5. Conclusion

To summarize, we report here the implementation of new analytical approaches based on a sheathless capillary electrophoresis (CE) interface used as nanoESI infusion platform or as separation method, hyphenated to tandem MS for the detailed and rapid structural characterization of a gold standard ADC. Starting with an intact ADC native MS study (top level) and going through middle-up and then bottom-up MS approach, we were able to characterize BV from intact mass measurement to the amino acid sequence level. At the intact ADC level, we evaluated sheathless CE-MS system used as nanoESI infusion platform for native MS determination of the average DAR and drug load distribution of BV. We show native sheathless CE-MS is applicable to interchain cysteine-linked ADCs without any detrimental effect on the noncovalent structure. Within a single run of few minutes and consuming less than of 3 µg BV sample, calculated DAR value were in good agreement with already published values. To investigate deeper the characterization of BV, middle-up analysis using IdeS enzymatic digestion has been performed following the same experimental protocol used for intact BV analysis. Structural information of the expected Fc/2 subunits and F(ab')₂ subunits with the incorporation of zero to eight payloads have been obtained. Additionally, other subunits as Lc conjugated to one payload and Fab conjugated to zero to four payloads have been observed and characterized. Of note, regarding native MS analysis of Fc/2, results showed the formation of Fc/2 non-covalent dimers following BV IdeS treatment. To the best of our knowledge, this is the first time that non-covalent dimers of ADC Fc/2 subunits have been observed and characterized. Finally, we report here the use of sheathless CZE-ESI-MS/MS for the bottom-up analysis of BV to enhance the level of characterization, especially regarding amino acid sequence, glycoforms and drug-loaded-peptides. Using a single injection of 200 fmol, we were able to characterize the primary structure of those conjugates in a robust manner. We managed to perform the complete amino acid sequence characterization. Simultaneously, using the same set of data, glycosylations and drug-loaded-peptides were also characterized. Concerning glycosylation, 11 different N-glycans could be characterized for BV, confirming the advantages of using sheathless CZE-ESI-MS improved sensitivity. Regarding the drug-loaded-peptides, we identified four drug-loaded-peptides linked to the interchain cysteines of the Hc and Lc which gave precious information regarding the localization of the conjugated drugs on the studied ADC and the assessment of the yield of drug incorporation. In order to characterize unambiguously these drug-loaded-peptides, seven diagnostic ions have been identified and structurally characterized as MMAE fragments present in MS/MS fragmentation spectra. The CZE-ESI-MS/MS data reported here indicate that electrophoretic separation, combined to the highly efficient sheathless CE-MS interface become a relevant alternative to LC-ESI-MS/MS for innovative approaches in MS for the characterization of a large panel of highly complex biotherapeutics.

2.6. Acknowledgments

Authors would like to thank Sciex separations Inc. for lending a CESI8000 system and Dr. M. Anselme from Sciex separations Inc. for his support. The authors would like also to express their gratitude to Dr. M. Biacchi (LSMIS, Strasbourg, France), P. Hammann and J. Chicher (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France), Dr. E. Wagner-Rousset, MC. Janin-Bussat and O. Colas (Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France) for helpful discussions around antibody structural characterization by LC-MS. This work was supported by the CNRS (UMR 7140), the University of Strasbourg and a doctoral fellowship from the General Council of Mayotte to NS.

2.7. References

- [1] R.V.J. Chari, Targeted cancer therapy: Conferring specificity to cytotoxic drugs, *Accounts Chem. Res.*, 41 (2008) 98-107.
- [2] S. Ornes, Antibody-drug conjugates, *P. Natl. acad. Sci. USA*, 110 (2013) 13695-13695.
- [3] P. Sapra, B. Shor, Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and Challenges, *Pharmacol. Therapeut.*, 138 (2013) 452-469.
- [4] A. Beck, J.M. Reichert, Antibody-drug conjugates, *Mabs*, 6 (2014) 15-17.
- [5] R.S. Zolot, S. Basu, R.P. Million, Antibody-drug conjugates, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12 (2013) 259-260.
- [6] A. Beck, J.F. Haeuw, T. Wurch, L. Goetsch, C. Bailly, N. Corvaia, The Next Generation of Antibody-drug Conjugates Comes of Age, *Discov. Med.*, 53 (2010) 329-339.
- [7] A. Younes, N.L. Bartlett, J.P. Leonard, D.A. Kennedy, C.M. Lynch, E.L. Sievers, A. Forero-Torres, Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas, *New Engl. J. Med.*, 363 (2010) 1812-1821.
- [8] S. Verma, D. Miles, L. Gianni, I.E. Krop, M. Welslau, J. Baselga, M. Pegram, D.Y. Oh, V. Dieras, E. Guardino, L. Fang, M.W. Lu, S. Olsen, K. Blackwell, E.S. Grp, Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer, *New Engl. J. Med.*, 367 (2012) 1783-1791.
- [9] U. Iyer, V.J. Kadambi, Antibody drug conjugates - Trojan horses in the war on cancer, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 64 (2011) 207-212.
- [10] S. Krapp, Y. Mimura, R. Jefferis, R. Huber, P. Sondermann, Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity, *J. Mol. Biol.*, 325 (2003) 979-989.
- [11] R. Jefferis, Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action, *Trends Pharmacol. Sci.*, 30 (2009) 356-362.
- [12] A. Beck, F. Debaene, H. Diemer, E. Wagner-Rousset, O. Colas, A.V. Dorsselaer, S. Cianférani, Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies, *J Mass Spectrom.*, 50 (2015) 285-297.

- [13] M. Biacchi, R. Gahoual, N. Said, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.-N. François, Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 6240-6250.
- [14] D.R. Stoll, D.C. Hannes, J. Danforth, E. Wagner, D. Guillaume, S. Fekete, A. Beck, Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 8307-8315.
- [15] F. Debaene, A. Boeuf, E. Wagner-Rousset, O. Colas, D. Ayoub, N. Corvaia, A. Van Dorsselaer, A. Beck, S. Cianferani, 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 (2014) 10674-10683.
- [16] 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.
- [17] M.-C. Janin-Bussat, M. Dillenbourg, N. Corvaia, A. Beck, C. Klinguer-Hamour, Characterization of antibody drug conjugate positional isomers at cysteine residues by peptide mapping LC-MS analysis, *J. Chromatogr. B*, 981 (2015) 9-13.
- [18] D. Firth, L. Bell, M. Squires, S. Estdale, C. McKee, A rapid approach for characterization of thiol-conjugated antibody–drug conjugates and calculation of drug–antibody ratio by liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 485 (2015) 34-42.
- [19] R. Gahoual, J.-M. Busnel, A. Beck, Y.-N. François, E. Leize-Wagner, Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 86 (2014) 9074-9081.
- [20] R. Gahoual, M. Biacchi, J. Chicher, L. Kuhn, P. Hammann, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.N. Francois, Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, *Mabs*, 6 (2014) 1464-1473.
- [21] J.A. Francisco, C.G. Cervený, D.L. Meyer, B.J. Mixan, K. Klussman, D.F. Chace, S.X. Rejniak, K.A. Gordon, R. DeBlanc, B.E. Toki, C.L. Law, S.O. Doronina, C.B. Siegall, P.D. Senter, A.F. Wahl, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity, *Blood*, 102 (2003) 1458-1465.
- [22] E. Oflazoglu, K.M. Kissler, E.L. Sievers, I.S. Grewal, H.P. Gerber, Combination of the anti-CD30-auristatin-E antibody-drug conjugate (SGN-35) with chemotherapy improves antitumour activity in Hodgkin lymphoma, *Brit. J. Haematol.*, 142 (2008) 69-73.
- [23] J.F. Valliere-Douglass, W.A. McFee, O. Salas-Solano, Native Intact Mass Determination of Antibodies Conjugated with Monomethyl Auristatin E and F at Interchain Cysteine Residues, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 2843-2849.
- [24] J. Chen, S. Yin, Y. Wu, J. Ouyang, Development of a Native Nanoelectrospray Mass Spectrometry Method for Determination of the Drug-to-Antibody Ratio of Antibody–Drug Conjugates, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 1699-1704.
- [25] R. Gahoual, J.M. Busnel, P. Wolff, Y.N. Francois, E. Leize-Wagner, Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 406 (2014) 1029-1038.

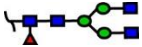
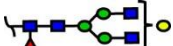
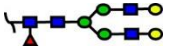
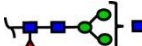
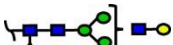
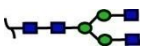
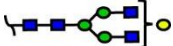
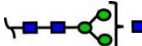
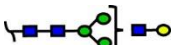
- [26] B. Wang, A.C. Gucinski, D.A. Keire, L.F. Buhse, M.T. Boyne, Structural comparison of two anti-CD20 monoclonal antibody drug products using middle-down mass spectrometry, *Analyst*, 138 (2013) 3058-3065.
- [27] Z.Q. Zhang, H. Pan, X.Y. Chen, mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies, *Mass Spectrom. Rev.*, 28 (2009) 147-176.
- [28] A. Wakankar, Y. Chen, Y. Gokarn, F.S. Jacobson, Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates, *mAbs*, 3 (2011) 161-172.
- [29] S. Fekete, D. Guilleme, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals, *Anal. Chem.*, (2016) 10.1021/acs.analchem.5b04561.
- [30] Z. Kalman-Szekeres, M. Olajos, K. Ganzler, Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 69 (2012) 185-195.
- [31] L. Fornelli, D. Ayoub, K. Aizikov, A. Beck, Y.O. Tsybin, Middle-Down Analysis of Monoclonal Antibodies with Electron Transfer Dissociation Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 86 (2014) 3005-3012.
- [32] A. Beck, G. Terral, F. Debaene, E. Wagner-Rousset, J. Marcoux, M.-C. Janin-Bussat, O. Colas, A. Van Dorsselaer, S. Cianf  rani, Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates, *Expert Rev. Proteomics*, (2015) 10.1586/14789450.2016.1132167.
- [33] A. Resemann, W. Jabs, A. Wiechmann, E. Wagner, O. Colas, W. Evers, E. Belau, L. Vorwerk, C. Evans, A. Beck, D. Suckau, Full validation of therapeutic antibody sequences by middle-up mass measurements and middle-down protein sequencing, *mAbs*, (2016) 10.1080/19420862.2015.1128607.
- [34] E.A. Redman, J.S. Mellors, J.A. Starkey, J.M. Ramsey, Characterization of Intact Antibody Drug Conjugate Variants Using Microfluidic Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, (2016) 10.1021/acs.analchem.5b03866.
- [35] K. Wenig, L. Chatwell, U. von Pawel-Rammingen, L. Bjorck, R. Huber, P. Sondermann, Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG, *P. Natl. acad. Sci. USA*, 101 (2004) 17371-17376.
- [36] S. Flatman, I. Alam, J. Gerard, N. Mussa, Process analytics for purification of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. B*, 848 (2007) 79-87.
- [37] R. Gahoual, A. Burr, J.M. Busnel, L. Kuhn, P. Hammann, A. Beck, Y.N. Francois, E. Leize-Wagner, Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *Mabs*, 5 (2013) 479-490.
- [38] J.R. Junutula, H. Raab, S. Clark, S. Bhakta, D.D. Leipold, S. Weir, Y. Chen, M. Simpson, S.P. Tsai, M.S. Dennis, Y. Lu, Y.G. Meng, C. Ng, J. Yang, C.C. Lee, E. Duenas, J. Gorrell, V. Katta, A. Kim, K. McDorman, K. Flagella, R. Venook, S. Ross, S.D. Spencer, W. Lee Wong, H.B. Lowman, R. Vandlen, M.X. Sliwkowski, R.H. Scheller, P. Polakis, W. Mallet, Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index, *Nat. Biotech.*, 26 (2008) 925-932.

Supporting information

Table S-1. Masses measured in native MS for intact and middle-up analysis of brentuximab vedotin

	Number of drug load	Glycoform	Mw exp (Da)	Mw theo (Da)	Δ mass (Da)
Brentuximab vedotin	D0	G0F/G0F	148125	148116	9
	D2	G0F/G0F	150766	150749	17
	D4	G0F/G0F	153404	153383	21
	D6	G0F/G0F	156039	156017	22
	D8	G0F/G0F	158671	158649	22
F(ab')₂	D''0		97749	97751	2
	D''2		100383	100384	1
	D''4		103019	103018	1
	D''6		105652	105651	1
	D''8		108283	108285	2
Fab	D'0		48875	48876	1
	D'2		51511	51509	2
	D'4		54144	45142	2
F_{c/2} dimer		G0F/G0F	50400	50399	1
		G0F/G1F	50562	50561	1
		G1F/G1F	50724	50723	1
		G1F/G2F	50887	50885	2
Lc	D1		25040.1	25040.2	0.1

Table S-2: Glycan mass, monoisotopic mass and migration time of the identified glycoforms

Glycan abbreviation	Glycan mass (Da)	Monoisotopic mass [M+H] ⁺	Migration time (min)	Glycan structures
G0F	1444.53	2634.047	20.01	
G1F	1606.59	2796.099	20.23	
G2F	1768.64	2958.152	20.41	
G0F-GlcNac	1241.45	2430.967	19.9	
G1F-GlcNac	1403.51	2593.019	19.99	
G0	1298.48	2487.989	19.98	
G1	1460.53	2650.041	20.20	
G0-GlcNac	1095.40	2284.909	19.90	
G1-GlcNac	1257.45	2446.962	19.99	
Man5	1216.42	2405.935	19.90	
Man6	1378.46	2567.988	20.05	

3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons appliqué une approche globale mettant en œuvre l'utilisation du couplage CESI-MS en tant que plateforme d'infusion nanoESI et méthode séparative afin obtenir la caractérisation structurale à différents niveaux du brentuximab vedotin (BV). Le premier niveau de caractérisation a consisté à évaluer le couplage CESI-MS en tant que plateforme nanoESI en MS native pour la détermination du DAR moyen du BV et pour obtenir la distribution de conjugués sur le BV. Nous avons démontré que l'utilisation de l'interface CESI-MS est totalement compatible pour l'infusion en condition native d'ADCs de type « cycteine-linked » sans effet destructeur sur la structure non-covalente du BV. En une seule infusion MS de quelques minutes représentant moins de 3 µg d'échantillon, nous avons déterminé une valeur du DAR moyen de $3,9 \pm 0,1$ totalement en accord avec la littérature. Ensuite, dans le but d'approfondir la caractérisation du BV en utilisant le même système, nous avons réalisé une approche middle-up par digestion IdeS. Des informations structurales attendues sur les fragments Fc/2 et F(ab')₂ avec l'incorporation de zéro à huit conjugués ont été obtenues. De plus, des informations de structure complémentaires concernant la chaîne légère conjuguée à un médicament et le fragment Fab avec l'incorporation de zéro à quatre médicaments, ont été observées et caractérisées. A noté, nous avons confirmé les résultats décrits dans la partie 2 (Chapitre 2 - Caractérisation de dimères de fragments Fc/2 de cetuximab par Off-line CZE-UV/ESI-MS) sur la mise en évidence d'interactions non-covalentes expliquant la formation de dimères de Fc/2. Enfin, une méthode séparative CESI-MS basée sur une approche bottom-up protéomique a été développée dans le but d'améliorer le niveau de caractérisation du BV particulièrement au niveau de la séquence d'acides aminés, du profil de glycosylations et des peptides liés aux médicaments. En analysant les résultats obtenus sur une injection de 200 fmol d'un digeste de BV, nous avons été capables de caractériser la totalité de la séquence d'acide aminé du BV. Sur le même set de données, nous avons aussi pu caractériser un grand nombre de glycosylations et la totalité des peptides liés aux médicaments. En effet, 11 N-glycosylations différentes ont été caractérisées pour le BV confirmant les performances du couplage CESI-MS sur la caractérisation de glycoprotéines thérapeutiques. Concernant les peptides liés aux médicaments, nous avons identifiés quatre peptides modifiés correspondant aux peptides portant une ou plusieurs cystéines inter-chaines du BV. Cette identification permet d'obtenir des informations sur la localisation des médicaments sur le BV ainsi que des estimations de rendement de réaction de l'incorporation de la drogue par site de modifications. De plus, dans le but d'identifier sans aucune ambiguïté la structure des peptides liés à un médicament, nous avons caractérisé sept ions diagnostiques correspondant à des fragments de MMAE sur les spectres MS/MS. Cette étude confirme donc que le couplage CZE-ESI-MS mettant en jeu l'interface CESI, devient une bonne alternative au couplage LC-ESI-MS pour la caractérisation de protéines thérapeutiques complexes.

Conclusion générale et perspectives

Durant ces trois années de thèses, nous avons utilisé différentes stratégies analytiques basées sur le couplage direct ou indirect de l'électrophorèse capillaire (CE) et la spectrométrie masse (MS) pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux (mAbs) et d'anticorps monoclonaux conjugués (ADCs).

Lors de la première partie de ce manuscrit consacrée à l'étude bibliographique, nous avons rappelé brièvement les principes de l'électrophorèse capillaire, ses différents couplages à la spectrométrie de masse ainsi que les généralités de la spectrométrie de masse pour la caractérisation de complexes biologiques. Cette étude bibliographique permet d'avoir les informations nécessaires à la compréhension des stratégies abordées et placer dans son contexte les différents travaux réalisés durant cette thèse. En effet, bien que la chromatographie liquide (LC) couplée à la MS reste la technique de référence pour l'analyse des molécules thérapeutiques, nous avons proposé durant ces travaux une méthode alternative qui permet d'obtenir des informations complémentaires.

La seconde partie du manuscrit qui se compose en quatre chapitres est centrée sur la caractérisation middle-up d'un anticorps monoclonaux, le cetuximab, sur trois couplages direct ou indirect avec la spectrométrie de masse. Dans une première partie, mes travaux de thèse ont porté sur le développement méthodologique du couplage Off-line CZE-UV/MALDI-MS pour la caractérisation du cetuximab partiellement digérés à l'IdeS. Cela nous a permis de séparer les variants de charge des fragments Fc/2 et F(ab)'2 en CE-UV et de les caractériser par spectrométrie de masse MALDI-MS. Les résultats obtenus ont permis d'identifier pour la première fois la séparation de glycoformes de mAbs à l'aide d'une méthode séparative couplée à la MS. Une analyse structurale par fragmentation ISD-MALDI a été réalisée après enrichissement des variants de charges du fragment Fc/2 afin d'identifier une possible différence structurale entre eux. Cela a permis d'obtenir des ions c identiques entre ces trois variants de charge mais des ions y présentant une différence de 128Da entre le pic 1 et le pic 3. Toutefois la qualité spectrale des fragmentations ISD étant moindre à cause des performances du MALDI-MS utilisées, nous avons développé une nouvelle stratégie Off-line CZE-UV/collection de fraction suivie d'une nano-infusion des différentes fractions par CESI-MS. Cette stratégie a permis, grâce à la haute résolution du spectromètre de masse, la caractérisation de différents glycoformes et l'identification du mécanisme de séparation des variants de charges du fragment Fc/2 qui est dû à une séparation d'homo ou hétérodimères ainsi que le mécanisme des variants de charges du fragment F(ab)'2 qui sont dû à la présence de résidus d'acide sialique de type NGNA. Enfin dans l'optique de réduire les différentes étapes d'analyses, nous avons développé de nouvelles méthodes de séparation du cetuximab middle-up sur un couplage direct par CESI-MS. Les premiers résultats préliminaires sont très prometteurs quant à la séparation des variants du fragment Fc/2 puisque l'on

obtient, comme attendu, une séparation de dimère des variants du fragment Fc/2. Toutefois la détection en MS des variantes du fragment F(ab)'2 est actuellement très difficile.

La troisième partie de ces travaux de thèse est focalisée sur la caractérisation à différent niveaux d'un ADC, le brentuximab vedotin, en intact, en middle-up et bottom-up protéomique à l'aide du couplage CESI-MS. L'analyse de l'ADC intact a permis l'identification de la distribution des drug fixées sur l'anticorps monoclonal ainsi que la détermination en MS native du ratio moyen anticorps-médicament (DAR). C'est deux critères de qualités nous permettent de vérifier de l'état de notre échantillon et d'introduire la CESI-MS comme une technique alternative à la LC-MS quant à l'analyse des ADCs en condition native. L'approche middle-up protéomique après une digestion à l'IdeS a permis l'identification des fragments conjugués en MS native et de mettre en évidence la présence de dimères du fragment Fc/2 de l'ADC en accord avec les résultats obtenus sur la caractérisation des variants du cetuximab en condition pseudo-native. Enfin la méthode de séparation CESI-MS basée sur une approche bottom-up protéomique a permis la caractérisation simultanée de la séquence complète du BV, l'identification de différentes modifications post-traductionnelles ainsi que les peptides conjugués, et la caractérisation structurales de différents ions diagnostiques du médicament conjugué.

La plupart de ces travaux de thèse ont déjà fait l'objet d'une valorisation dans différentes revues scientifiques. Toutefois, nous pouvons envisager différentes perspectives sur l'analyse du cetuximab et du brentuximab vedotin par CE-MS. En effet la caractérisation du cetuximab middle-up par CESI-MS apporte des difficultés quant à l'identification des variants de charges du fragment F(ab)'2. Différents axes de recherche peuvent être envisagés afin d'apporter des solutions à ce problème :

- Une optimisation des conditions expérimentales peut être envisagée en réalisant par exemple la séparation avec un BGE avec une force ionique élevée (25 à 50 mM d'acétate d'ammonium) ainsi qu'un faible voltage afin d'éviter les limites liées à l'effet joule.

- L'utilisation d'autre greffages, en particulier un greffage positif qui permet une séparation rapide des protéines. Toutefois il faut un développement de méthode approfondie sur ce type de greffage notamment en conditions pseudo-native.

- Les conditions expérimentales optimisées sur le greffage à 10% d'HPC permettent la séparation des variantes de charges du cetuximab middle-up en CE-UV. De ce fait, on peut envisager un couplage « sheath liquid » dans ces conditions. Toutefois la nature micro-débit du système suggère une perte de résolution et de sensibilité en MS comparé au couplage nanoESI-MS. Mais la possibilité d'utiliser des capillaires de longueur et de diamètre interne plus grand (75µm) afin d'injecter une quantité plus importante d'échantillon couplée à une spectrométrie de masse à haute résolution peut compenser cette perte de sensibilité.

- Une stratégie CE-UV/nanoESI-MS peut aussi être envisagée. En effet la possibilité de collecter et d'enrichir le fragment F(ab)'2 en CE-UV et de le séparer par CESI-MS permettrait de cibler le problème

d'identification des variants de ce fragment et ainsi apporter des solutions rapides notamment dans l'optimisation des conditions de séparation en CE ainsi que les paramètres de transfert en masse.

Une fois la caractérisation des variantes du cetuximab middle-up réalisée, il faudra tendre vers la séparation des anticorps monoclonaux intacts par CESI-MS.

L'étude sur la caractérisation du brentuximab vedotin a été réalisée de la manière la plus exhaustive possible. Toutefois différentes perspectives peuvent être proposées :

- Les caractérisations de l'ADC en intact et en middle-up ont été réalisées par infusion en condition native. De ce fait, on peut envisager la séparation des différentes formes de l'anticorps conjugué à la drug c-à-d le D0, D1, D2,..., D8 en électrophorèse capillaire avant la caractérisation par spectrométrie de masse.

- La caractérisation middle-up du brentuximab vedotin a montré la présence de différents fragments conjugués rendant difficile le calcul du DAR sur le fragment F(ab)'₂. Ces fragments peuvent se former après la digestion partielle à l'IdeS ou lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Pour ce dernier, une diminution progressivement l'énergie de collision en masse peut être réalisée afin de garder les drugs conjugués uniquement sur le fragment F(ab)'₂. Dans ces conditions, le calcul du DAR peut être réalisé sur l'approche middle-up protéomique du brentuximab vedotin.

- Enfin la caractérisation à différents niveaux d'un autre ADC tel que l'ado-trastuzumab emtasine peut être la suite logique à cette étude.

Résumé

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont des glycoprotéines complexes possédant de nombreuses micro-hétérogénéités qui peuvent influencer leur efficacité dans l'organisme. Il est par conséquent nécessaire de développer des méthodes analytiques robustes, sensibles et spécifiques pour les caractériser avec la plus grande précision. L'objectif de cette thèse a été de développer des méthodes analytiques permettant la caractérisation fine et à différents niveaux d'un anticorps monoclonal, le cetuximab, ainsi qu'un anticorps monoclonal conjugués à un principe actif, le brentuximab vedotin, sur des couplages direct ou indirect de l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse. Dans une première partie, une approche middle-up protéomique du cetuximab a été réalisée sur le couplage indirect CZE-UV/MALDI-MS afin de séparer et caractériser les variants de charges du fragment Fc/2 et F(ab)'2 ainsi que la caractérisation top-down des fragments Fc/2. Ensuite une nouvelle stratégie indirecte CZE-UV/nanoESI-MS a été développée pour permettre la caractérisation fine de ce mAbs partiellement digéré. Enfin un couplage direct par CESI-MS a été développé pour permettre l'analyse rapide et précise du cetuximab middle-up. Dans une deuxième partie, la combinaison d'analyse de mAbs d'intact, middle-up et bottom-up protéomique a été réalisée sur le couplage CZE-UV/nanoESI-MS et CESI-MS. Cela a permis la caractérisation à différent niveau du brentuximab vedotin. Cette méthodologie a permis l'analyse du DAR, l'identification de fragments conjugués, la caractérisation simultanée de la séquence complète de l'anticorps, d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles, la caractérisation des peptides conjugués ainsi que l'identification d'ions diagnostiques du principe actif.

Mots-clés : Electrophorèse capillaire, spectrométrie de masse, anticorps monoclonaux, glycosylations, modification post-traductionnelles, anticorps monoclonaux conjugués à un principe actif.

Summary

Monoclonal antibodies (mAbs) are highly complex glycoproteins having a lot of micro-heterogeneities which can influence their effectiveness. As a consequence, it is necessary to develop robust analytical methods, sensitive and specific to characterize them with high accuracy. The purpose of this thesis was to develop analytical methods allowing the multi-level characterization of monoclonal antibody (cetuximab), and antibody drug conjugates (brentuximab vedotin), using on-online or off-line capillary electrophoresis – mass spectrometry coupling. In the first section, a middle-up proteomic approach of cetuximab was carried out using Off-line CZE-UV/MALDI-MS coupling to separate and to characterize Fc/2 and F(ab)'2 charge variants. A top-down characterization of Fc/2 fragments was also employed. Then a new strategy off-line CZE-UV/nanoESI-MS was used to allow the characterization of this partially digest mAbs. Finally, an online coupling by CESI-MS was developed to allow the fast and accurate analysis of middle-up cetuximab. In a second part, the combination of intact, middle-up and bottom-up proteomic carried out on CZE-UV/nanoESI-MS and CESI coupling allowed the most exhaustive characterization of brentuximab vedotin. This methodology allowed the analyze of DAR, the identification of fragments drug conjugates, the simultaneous characterization of the complete structure of antibody, a significant number of post-translational modifications, all peptides drug conjugates and the identification of diagnostic ions.

Keywords: capillary electrophoresis, mass spectrometry, monoclonal antibodies, glycosylation, post-translational modifications, antibodies drug conjugates.