

Rabah GAHOUAL<sup>1,2</sup>, Michaël BIACCHI<sup>1,3</sup>, Nassur SAID<sup>1</sup>, Alain BECK<sup>4</sup>, Emmanuelle LEIZE-WAGNER<sup>1</sup>, Yannis-Nicolas FRANÇOIS<sup>1</sup>

## Caractérisation fine de protéines thérapeutiques à l'aide du couplage de l'électrophorèse capillaire et de la spectrométrie de masse

### RÉSUMÉ

Les protéines thérapeutiques représentent à ce jour la classe d'agents thérapeutiques qui enregistre la croissance la plus forte. La complexité de ces protéines ainsi que des questions évidentes de santé publique justifient la nécessité d'améliorer constamment les techniques de caractérisation. Ce travail donne un aperçu d'une méthode mettant en jeu le couplage de l'électrophorèse capillaire et de la spectrométrie de masse pour la caractérisation de la structure primaire des anticorps monoclonaux à plusieurs niveaux. En une seule analyse, elle permet de caractériser la séquence complète d'acides aminés, d'établir la détermination structurale de 15 glycosylations ainsi que l'identification de plusieurs modifications post-traductionnelles d'intérêt, telles que la déamidation de l'asparagine et l'isomérisation de l'acide aspartique.

### MOTS-CLÉS

Anticorps monoclonaux - électrophorèse capillaire - spectrométrie de masse - peptide mapping - glycosylation - modifications post-traductionnelles

*Multi-level characterization of biotherapeutics using sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry*

### SUMMARY

*Biotherapeutic protein, although introduced only since two decades, represents the class of therapeutic agent with the fastest growth regarding market shares. The complexity of such molecules requires advanced and comprehensive characterization in order to guarantee their potency and safety. This work provides an overview of a methodology using an innovative capillary electrophoresis - tandem mass spectrometry coupling for the characterization of biologics primary structure. This method allows to completely characterize the amino acid sequence. Concomitantly localization, structures and relative abundances of up to 15 glycoforms could be achieved. Finally, different posttranslational modifications of interest could be characterized, including asparagine deamidation and aspartic acid racemization.*

### KEYWORDS

*Monoclonal antibody - capillary electrophoresis - mass spectrometry - peptide mapping - glycosylation - posttranslational modifications*

### I - Introduction

Depuis le milieu des années 1980 et l'approbation du murumomab par l'agence américaine de régulation des médicaments et des aliments (FDA), les protéines thérapeutiques ont rencontré un succès exceptionnel dans l'industrie pharmaceutique. Ces composés se réfèrent à des mo-

lécules issues de technologies recombinantes à visée thérapeutique dont les formats les plus évolués sont les anticorps monoclonaux (mAbs), les anticorps bispécifiques, les protéines fusions et plus récemment les anticorps conjugués (ADCs). Les mAbs mettent clairement en évidence cette évolution car ils représentent actuellement la catégorie de molécules thérapeutiques ayant la

<sup>1</sup> Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes (LSMIS), UMR 7140 (Unistra-CNRS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Laboratory of bioanalytical chemistry and spectroscopy, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands

<sup>3</sup> Laboratoire de Biochimie Biologie Moléculaire Nutrition Métabolisme, UF 3544 Dépistage Néonatal, CHRU Nancy, France

<sup>4</sup> Centre d'immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien-en-Genevois, France

\* Pour correspondance : yfrancois@unistra.fr

plus forte croissance en termes de part de marché (1). Un tel succès s'explique par les propriétés pharmacologiques favorables de ce type de protéines, leur mécanisme d'action thérapeutique et leur spécificité pour l'antigène ciblé. Ces caractéristiques ont ainsi permis l'accès à de nouvelles voies de traitement pour des maladies complexes telles que le cancer, les maladies inflammatoires, les maladies auto-immunes ou plus récemment la maladie d'Alzheimer.

Les mAbs, tout comme leurs dérivés, sont des glycoprotéines complexes qui peuvent porter un grand nombre de micro-hétérogénéités au niveau moléculaire, potentiellement introduites au cours du processus de production ou lors de stockage à long terme (2, 3). Pour des raisons de sécurité et de santé publique, les agences de régulations telles que la FDA ou l'agence européenne du médicament (EMA) exigent une caractérisation poussée de ces protéines et de leurs micro-hétérogénéités car celles-ci peuvent influencer sur l'activité biologique des médicaments. En parallèle, l'introduction récente des biosimilaires soulève de nombreuses problématiques pour les agences de régulation. Notamment sur la capacité des industries biopharmaceutiques à fournir des données analytiques détaillées afin de prouver la similitude entre un candidat biosimilaire et son original déjà approuvé (4, 5). Dans un tel contexte réglementaire et en raison de la complexité des mAbs, la caractérisation de ces protéines représente actuellement un défi permanent pour les sciences analytiques.

Le haut niveau de variabilité (6-8) justifie le développement de méthodologies analytiques innovantes. 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 et sensibilité, mais aussi car elle permet dans certains cas d'obtenir des informations structurales. La MS est couramment utilisée dans les activités de R&D dans l'industrie biopharmaceutique (9, 10). En raison de la complexité de ce type de protéines, leur caractérisation structurale porte sur de nombreux paramètres tels que la séquence d'acides aminés, les ponts disulfures, les glycosylations ou certaines modifications post-traductionnelles (PTMs) pouvant influencer sur leurs propriétés thérapeutiques. Ceci nécessite souvent la mise en œuvre de méthodes orthogonales à la MS, comme la chromatographie liquide (LC) ou l'électrophorèse capillaire (CE).

Récemment, nous avons développé une méthode analytique mettant en jeu l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse à source électrospray (CE-ESI-MS/MS) appliquée à la caractérisation de mAbs. Pour ce développement, une nouvelle interface « *sheathless* » CE-ESI-MS récemment commercialisée et notée CESI-MS, a été utilisée. Ce système produit par la société Sciex (Redwood Shores, CA) s'inspire d'une idée originale de Moini *et al.* (11). Le maintien du champ électrique

est réalisé à l'aide d'un capillaire de séparation rendu poreux à son extrémité par une attaque acide. Aucun liquide additionnel n'est donc utilisé, ce qui permet d'obtenir une excellente sensibilité du signal MS (12). Pour cette étude, le trastuzumab (Herceptin®, Genentech) a été sélectionné en tant que mAb de référence. Le trastuzumab est utilisé pour le traitement du cancer du sein de type HER-2 positif. Il a été décrit dans de nombreuses études, ce qui en fait un très bon modèle pour développer et évaluer de nouvelles méthodes de caractérisation des mAbs.

Dans notre étude, l'échantillon de trastuzumab a été digéré par de la trypsine suivant un protocole classique de digestion enzymatique en solution. Avant analyse en MS/MS, le mélange peptidique a été séparé par électrophorèse capillaire de zone permettant de séparer les analytes suivant leur charge et leur rayon hydrodynamique (13). L'analyse d'une seule injection du digestat tryptique issu de trastuzumab correspondant à une quantité de 200 femtomoles (fmol) a permis de caractériser la séquence d'acides aminés du mAb. En utilisant les mêmes données, la structure et l'abondance relative des glycosylations portées par le trastuzumab ont été déterminées. Enfin, différentes modifications post-traductionnelles (PTMs) d'intérêt ont pu également être caractérisées. Les résultats générés par l'analyse CE-ESI-MS/MS ont démontré l'intérêt de mettre en place une séparation électrophorétique en amont d'une analyse MS/MS, notamment pour des peptides ayant une différence de conformation d'un seul acide aminé. La sélectivité de la CE ainsi que son aptitude à améliorer le processus d'ionisation ESI permettent d'enrichir le niveau de caractérisation des protéines thérapeutiques.

## II - Méthodologie analytique par CE-ESI-MS/MS

### 1. Préparation d'échantillons

La caractérisation des mAbs par CE-ESI-MS/MS est adaptée du protocole classiquement mis en œuvre en analyse protéomique dite « *bottom-up* ». L'échantillon de mAbs subit une digestion tryptique réalisée en solution. Afin d'optimiser l'étape de digestion enzymatique, l'échantillon est dans un premier temps dénaturé à l'aide du tensioactif RapiGest® (Waters, Milford, MA). Après digestion, la baisse du pH par ajout d'acide provoque la précipitation de ce surfactant avec pour effet son élimination. Le mélange peptidique obtenu est dilué dans une solution d'acétate d'ammonium (pH 4,0) afin d'obtenir une concentration finale de 2,2  $\mu$ M.

### 2. Couplage CE-ESI-MS

L'interface entre les instruments de CE et de MS est un paramètre primordial pour réaliser des expériences de CE-ESI-MS de manière optimale. En effet, il est

nécessaire de pouvoir maintenir le champ électrique, indispensable à la séparation électrophorétique, tandis que l'extrémité du capillaire est positionnée à l'intérieur de la source ESI. Depuis la fin des années 1980, de nombreuses interfaces CE-ESI-MS ont été développées selon différents principes physiques, présentant chacune des caractéristiques spécifiques (14, 15). Pour la caractérisation fine de mAbs et de ses dérivés, notre travail a été réalisé à l'aide de l'interface CESI8000 (Sciex, Brea, CA), noté CESI.

Cette interface repose sur l'utilisation d'un capillaire de séparation de faible diamètre interne (30 µm) rendu poreux à son extrémité par attaque acide. Cette porosité permet le passage des électrons et des sels contenus dans l'électrolyte support (BGE), et ainsi la préservation du champ électrique obligatoire pour la séparation électrophorétique. Aucun liquide additionnel n'est nécessaire, ce qui garantit une sensibilité optimale et la réduction des phénomènes de suppression d'ions due aux ultra faibles débits mis en jeu durant la séparation (<50 nL/min) (16). Le BGE utilisé dans cette étude est composé de 10 % d'acide acétique et la séparation est réalisée sous une tension de +20 kV. L'injection hydrodynamique de l'échantillon à l'intérieur du capillaire (diamètre interne 30 µm, longueur 92 cm) représente un volume de 90 nL correspondant à une quantité d'échantillon de 200 fmol.

Le CESI8000 a été couplé à un spectromètre de masse TripleTOF 5600+ (Sciex, Brea, CA). Le TripleTOF 5600+ est un spectromètre de masse hybride composé de plusieurs quadripôles suivis d'un analyseur à temps de vol. Lors de cette étude, les expériences de CE-ESI-MS/MS ont été obtenues à l'aide d'un mode IDA (« *information dependent*

*acquisition* »). Les 10 fragments les plus abondants sont systématiquement sélectionnés pour être fragmentés avec un cycle d'acquisition d'une durée de 1,79 sec, tout en garantissant des résolutions de 40000 et 25000 en MS et MS/MS respectivement.

### 3. Traitement des données

L'identification peptidique a été réalisée de manière automatique à l'aide des algorithmes de recherche tels que Mascot ou BiopharmaView (Sciex, Brea, CA), qui sont dédiés à ce genre de caractérisation. Cependant, une analyse manuelle des données CE-ESI-MS/MS peut être nécessaire, notamment dans le cas de petits peptides ( $\leq 3$  acides aminés) ou la caractérisation des glycopeptides afin d'obtenir la totalité de l'information.

## III - Application à la caractérisation d'anticorps monoclonaux

### 1. Caractérisation de la séquence d'acides aminés

L'électrophérogramme de l'analyse par CE-ESI-MS/MS du digestat trypsique du trastuzumab résulte de la séparation des peptides du mAb suivant leur charge et leur rayon hydrodynamique. L'identification des peptides dépend de la mesure de la masse du peptide mais également de l'identification des fragments générés par collision en MS/MS, ce qui permet d'augmenter la confiance des identifications. Les données CE-ESI-MS/MS ont permis en une simple injection d'obtenir

**Figure 1**  
Couverture de séquence du trastuzumab obtenue par CE-ESI-MS/MS.

Reproduit avec permission de [18].  
Copyright (2013)  
American Chemical Society

<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT</u>	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTA</u>
<u>YIHVVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV</u>	<u>VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG</u>
<u>KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC</u>	<u>SRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPT</u>
<u>SRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGP</u>	<u>FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA</u>
<u>SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTY</u>	<u>SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE</u>
<u>SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV</u>	<u>SVTETEQDSDKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY</u>
<u>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC</u>	<u>ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
<u>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI</u>	
<u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH</u>	
<u>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK</u>	
<u>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL</u>	
<u>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u>	
<u>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u>	
<u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</u>	

100 % de couverture de séquence des chaînes lourdes et légères composant le trastuzumab (Figure 1) (17, 18). Il est à noter que malgré la grande diversité des peptides tryptiques générés par la digestion protéolytique, la totalité de la couverture de séquence peut être obtenue par des peptides, sans erreur de clivage ou modifications post-traductionnelles (18). Cette performance est principalement expliquée par les propriétés intrinsèques de la séparation électrophorétique. En effet, en l'absence de phase stationnaire, la séparation peptidique n'induit aucun phénomène de rétention. Ainsi, quelle que soit la nature chimique des peptides, ceux-ci migrent sous l'influence du champ électrique et sont transférés dans la MS. Cette caractéristique permet l'identification, dans les mêmes conditions de séparation, d'une grande variété de peptides comprenant des peptides de faible taille ( $\leq 3$  acides aminés), tout comme ceux de plus grande taille, allant jusqu'à une soixantaine d'acides aminés et dont la masse moléculaire est supérieure à 6 kDa.

De plus, les performances des spectromètres de masse de dernière génération donnent l'opportunité d'obtenir une qualité spectrale MS/MS suffisante pour observer une grande quantité d'ions  $\gamma$  et  $b$ , correspondant à la fragmentation du squelette peptidique. Cette stratégie basée sur l'analyse des spectres MS/MS augmente la confiance sur l'identification des peptides. À l'aide des données CE-ESI-MS/MS issues d'une seule expérience, il a été systématiquement possible d'identifier plus de 70 % des ions  $\gamma/b$  composant différents mAbs étudiés et, dans le cas du trastuzumab, cette valeur est supérieure à 90 % (18). Les spectres de fragmentation donnent alors des informations importantes concernant

l'enchaînement exact des acides aminés. Dans le cas du trastuzumab, il a été possible de caractériser la séquence complète des parties variables de l'anticorps. Ces parties variables du mAb, qui contiennent les régions déterminant la complémentarité (CDR) de l'anticorps, sont impliquées dans la reconnaissance avec l'antigène ciblé. La capacité à déterminer de manière robuste la succession d'acides aminés de cette partie de la protéine thérapeutique est un énorme atout du point de vue R&D, et renforce l'intérêt de la caractérisation analytique par CE-ESI-MS/MS. Cette instrumentation est donc idéale pour ce type d'applications, donnant en une simple analyse une importante quantité d'informations sur la séquence d'acides aminés des protéines étudiées. Elle permet en outre dans certains cas d'identifier des substitutions d'acides aminés ou de potentielles erreurs de PTMs, notamment pour l'évaluation de la biosimilarité (19).

## 2. Caractérisation structurale et estimation de l'abondance des glycosylations

Les mAbs sont des glycoprotéines. L'expression des glycosylations de ces protéines thérapeutiques

Figure 2

Spectre MS/MS correspondant au peptide [TKPREEQYNSTYR] + GOF (précurseur  $m/z$  1039.81 ; état de charge 3+)

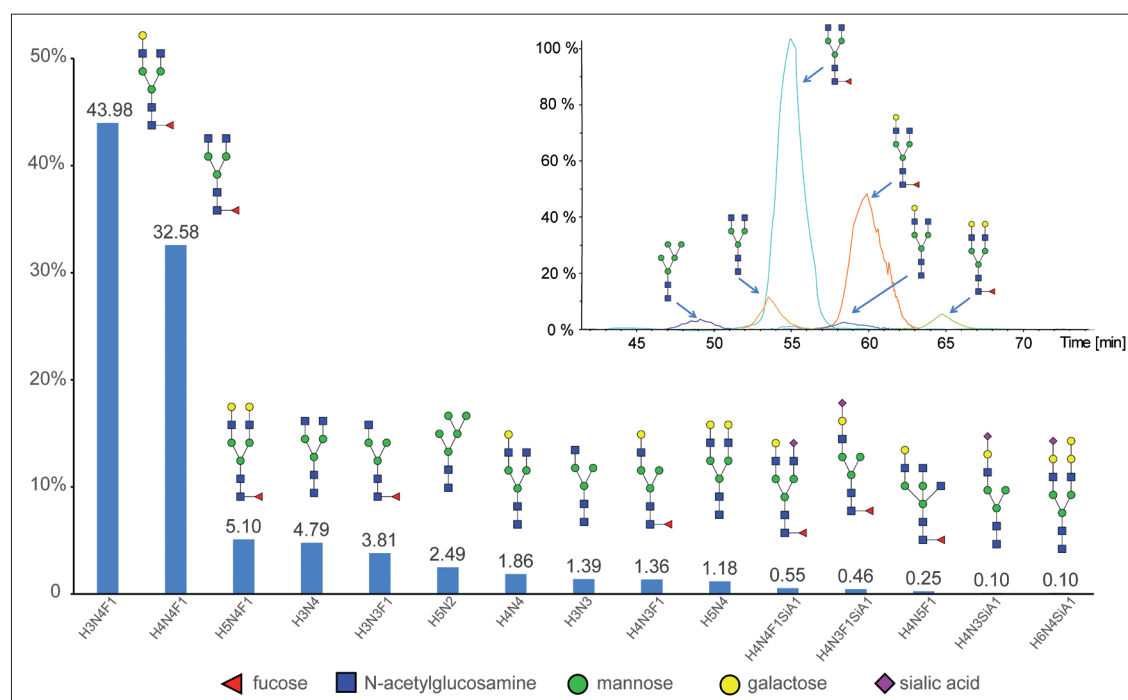
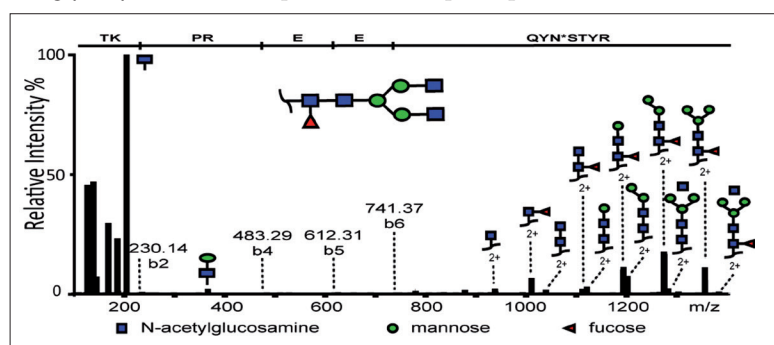


Figure 3

Profil des abondances relatives des glycoformes obtenus pour trastuzumab par CE-ESI-MS. Reproduit avec permission de [18]. Copyright (2013) American Chemical Society



est classée comme attribut critique de qualité (CQA) et fait l'objet d'une grande attention de la part des industries biopharmaceutiques et des agences de régulation. Elle représente en effet une source majeure d'hétérogénéité pouvant influencer les propriétés biologiques (20). Par exemple, la nature des glycosylations peut influencer sur la stabilité ou la solubilité de mAbs et sur leur structure quaternaire.

Les données CE-ESI-MS/MS précédemment utilisées pour la caractérisation de la séquence d'acides aminés ont aussi permis de localiser et de caractériser la structure des différents glycoformes des protéines thérapeutiques étudiées. La fragmentation MS/MS des glycopeptides par dissociation induite par collision (CID) permet d'identifier la composition des glycanes (Figure 2). Dans ce cas aussi, l'excellente qualité des spectres MS/MS génère un grand nombre de fragments donnant l'opportunité, la plupart du temps, de caractériser sans ambiguïté la structure des glycanes portée par les anticorps thérapeutiques étudiés. De plus, les spectres MS ont été utilisés pour estimer l'abondance relative de chaque glycoforme et représenter le profil des glycosylations du trastuzumab (Figure 3). Les résultats obtenus ont démontré la capacité de cette approche analytique pour obtenir simultanément la caractérisation d'un nombre important de glycoformes ainsi que leur abondance relative. Par exemple, pour le trastuzumab, 15 glycosylations différentes ont été identifiées en une unique analyse. La quantification relative obtenue permet de caractériser les glycoformes majoritaires mais aussi des glycoformes de faible abondance, ainsi que certains portant des acides sialiques (18).

La caractérisation des glycosylations a été réalisée sans libération préalable des glycanes, comme c'est communément le cas dans des études similaires (21). La présence des glycanes toujours liés sur les peptides tend à leur conférer des propriétés hydrophiles. Par conséquent, dans une stratégie mettant en jeu la chromatographie en phase liquide, ils pourraient ne pas être suffisamment retenus sur une phase stationnaire inverse et donc difficiles à caractériser parmi les autres peptides (22). L'absence de phase stationnaire en CE permet de séparer les glycopeptides indépendamment de leur hydrophobicité, suivant leur charge et leur rayon hydrodynamique. Les performances de la CE dans ce domaine ont été rapportées par différents groupes (23).

Un autre avantage à l'étude des glycopeptides est qu'il est possible de localiser précisément l'acide aminé modifié avec le glycan. Ceci permet, dans le cas très courant des protéines multi-glycosylées, de considérer les différents sites de glycosylation indépendamment, que ce soit pour la caractérisation structurale et/ou pour estimer l'abondance relative. L'efficacité d'ionisation obtenue par la mise en place de séparation à très faible débit explique la sensibilité optimale pour la caractérisation des glycopeptides. De plus, la

CE permet d'observer la séparation partielle de différents glycopeptides générés lors de la digestion trypsique. Par exemple, deux glycopeptides ayant une différence d'un galactose sur la structure du glycan peuvent être complètement séparés par CE, alors qu'une différence d'un fucose mène à une séparation partielle des peptides en question. En cas de co-migration, ces différents glycopeptides entraîneraient des phénomènes de compétitions durant le processus d'ionisation ESI, réduisant la sensibilité du signal et impactant principalement les glycopeptides en faible abondance.

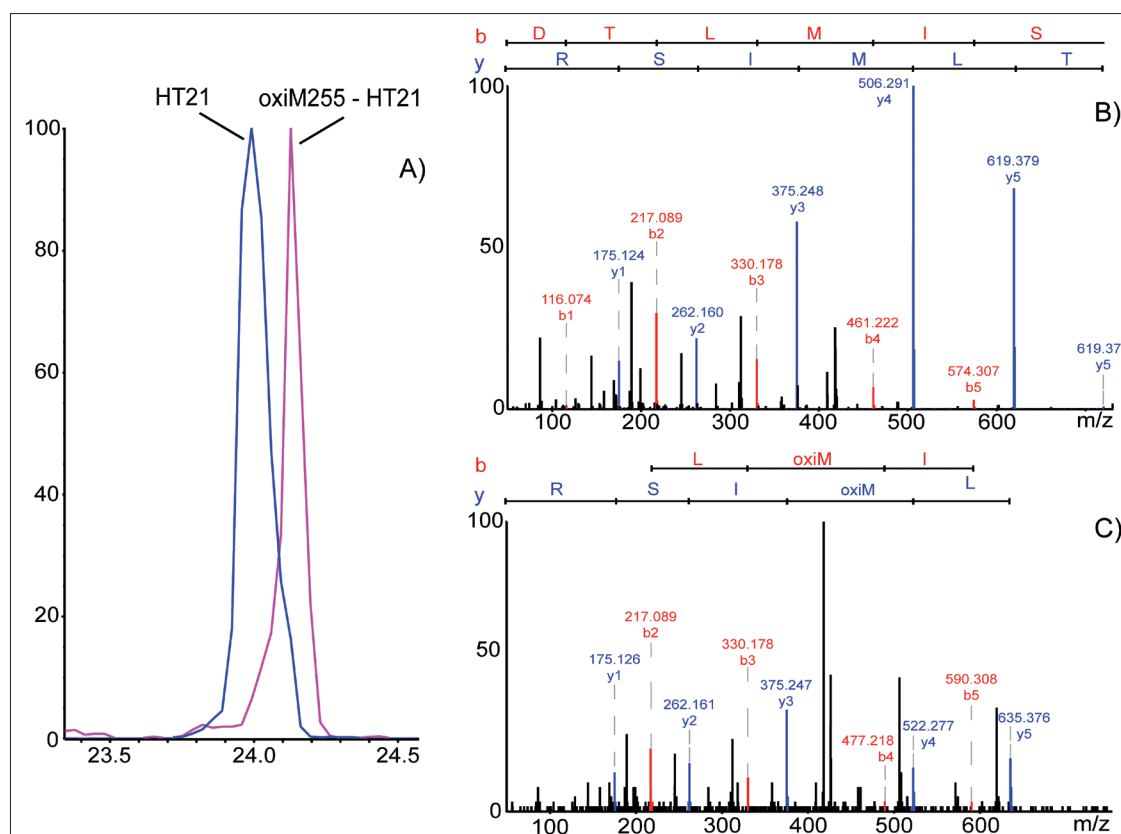
Les données CE-ESI-MS/MS permettant de représenter le profil des glycosylations en fonction de l'abondance relative démontrent que cette méthode est parfaitement compatible avec la caractérisation de glycosylation. De plus, elle peut être mise en place pour la comparaison d'échantillons lot à lot. Récemment, notre groupe a ainsi pu démontrer l'efficacité de cette technique pour une évaluation de biosimilarité, reposant sur la caractérisation et la quantification relative des glycoformes du cetuximab et d'un candidat biosimilaire (19).

### 3. Identification des PTMs dites « points chauds »

Comme toutes les protéines, les mAbs sont sujets à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que l'oxydation, la déamidation ou l'acétylation de certains acides aminés. Pour les protéines thérapeutiques, certaines de ces PTMs peuvent être induites à la protéine en raison de la difficulté à contrôler le processus de production ou pendant le stockage des échantillons à long terme. Pour l'industrie biopharmaceutique, certaines de ces PTMs sont désignées comme « points chauds ». Ces PTMs sont spécifiques à chaque protéine thérapeutique et sont décrites dans la littérature comme pouvant influencer de manière significative l'activité pharmacologique de la protéine. Par conséquent, ces PTMs peuvent être considérées comme CQA pour le contrôle qualité et sont utilisées pour surveiller les dégradations potentielles de l'échantillon, dans des études de stabilité à long terme.

Les données CE-ESI-MS/MS précédemment utilisées pour la caractérisation de la séquence d'acides aminés et des glycosylations ont aussi pu être utilisées pour identifier les PTMs « points chauds » du trastuzumab.

La première PTM d'intérêt étudiée est la cyclisation de l'acide glutamique en N-terminal de la chaîne lourde du trastuzumab. Les données de la séparation CE ont montré que le peptide modifié était séparé de plusieurs minutes de son homologue intact. La sélectivité de la CE concernant cette PTM peut s'expliquer par le fait que cette modification induit une différence de masse de 17,02 Da, ce qui entraîne une différence importante de la mobilité effective des peptides. De plus, l'annotation des


**Figure 4**

A) Electrophérogramme d'ions extrait (EIE) correspondant au peptide de la HC 252-258 du trastuzumab portant une méthionine potentiellement oxydée en position Met255. Spectres MS/MS correspondant au B) peptide non modifié et au C) peptide modifié.

spectres MS/MS correspondant aux peptides intacts et modifiés permettent de caractériser sans ambiguïté la cyclisation de l'acide glutamique en position N-terminal (18).

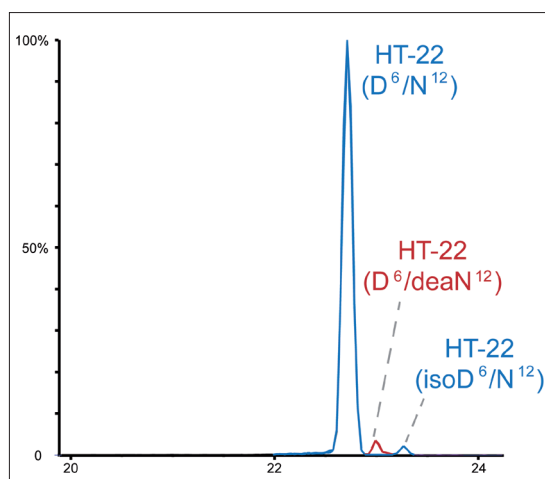
Parallèlement à cette PTM, l'oxydation de méthionines a été étudiée. En effet, ce type d'oxydation de certains sites spécifiques, en particulier sur le domaine constant du mAb, est considéré comme une PTM « point chaud ». Cette modification entraîne une augmentation de la masse de 15,99 Da pour le peptide modifié, par rapport à celle du peptide non modifié. Tout comme la PTM précédente, la sélectivité fournie par la CE permet de séparer le peptide oxydé de son homologue intact. De plus, dans ce cas aussi, la qualité spectrale de la fragmentation MS/MS (Figure 4) sert à caractériser la position exacte de la méthionine portant la modification, et ceci même dans le cas de peptides trypsiques comportant plusieurs méthionines (18).

La déamidation est une PTM couramment observée sur les arginines. Cette modification implique une différence de masse de 0,98 Da entre les peptides concernés (24). Tout comme l'oxydation des méthionines, l'électrophorégramme CE-ESI-MS/MS obtenu pour l'analyse du trastuzumab a montré la séparation complète entre les peptides portant une déamidation d'asparagine et les peptides non modifiés. De même, les arginines concernées par cette modification peuvent être caractérisées sans ambiguïté en utilisant les spectres MS/MS. La capacité de la CE à séparer

ces peptides uniquement sur la base du rayon hydrodynamique est un avantage important dans le contexte de la caractérisation de la structure primaire du trastuzumab. En effet, sans séparation en amont de la détection ESI-MS, ces peptides ne pourraient être indépendamment caractérisés à cause de la superposition de leur profil isotopique. Ils génèreraient des phénomènes de compétition pendant le processus d'ionisation, ce qui aurait pour effet de réduire la sensibilité MS et donc la perte d'informations. De plus, l'apport de la séparation CE des peptides déamidés donne l'opportunité d'estimer le taux de modification en mesurant l'abondance relative des peptides modifiés par rapport à leurs homologues en mesurant l'intensité sur les spectres MS. Les résultats ont démontré que l'optimisation du traitement de l'échantillon permet une réduction significative du niveau de déamidation induit lors de la digestion trypsique (18).

Enfin, l'isomérisation de l'acide aspartique est aussi considérée dans la caractérisation de la structure primaire du trastuzumab. La recherche de cette PTM est particulièrement complexe car la modification n'implique aucune différence de charge ni de masse sur l'acide aspartique. Cependant, les résultats obtenus en CE-ESI-MS/MS ont montré la séparation complète des peptides portant une isomérisation de l'acide aspartique (Figure 5) (25). Dans ce cas, les spectres MS/MS n'ont pas permis de différencier le peptide intact du peptide modifié du fait de leur similitude.

**Figure 5**  
EIE correspondant  
aux différentes  
formes du  
peptide HT-22 du  
trastuzumab (HC  
151-216) obtenue  
par CE-ESI-MS.  
*Reproduit avec  
permission de [25].  
Copyright (2016)  
Wiley-VCH*



Cependant, pour chaque couple de peptide portant potentiellement cette modification, deux pics distincts correspondant à la masse recherchée et dont le spectre MS/MS est identique sont toujours observés. Afin de prouver la sélectivité de la séparation concernant les peptides portant cette modification, plusieurs études ont été réalisées sur des peptides synthétiques. La capacité de la CE à séparer ce type de peptides peut s'expliquer par la modification du rayon hydrodynamique de la molécule en fonction de la conformation de l'acide aspartique. En effet, cette variation du rayon hydrodynamique engendre une différence de mobilité effective entre ces différents peptides. Il est important de noter que, lors de la caractérisation du trastuzumab, chaque peptide ciblé comme potentiellement modifié sur l'acide aspartique a pu être systématiquement identifié et caractérisé. Dans ce cas précis, la mise en œuvre d'une séparation électrophorétique avant l'analyse MS a permis d'enrichir la quantité d'informations pour la caractérisation de la structure primaire du trastuzumab. De plus, tout comme l'identification de la déamidation des asparagines, la séparation du peptide modifié garantit une ionisation optimale des deux peptides permettant d'empêcher tout phénomène de compétition et donc de maximiser la sensibilité du signal en MS. Cela donne la possibilité de détecter et de quantifier de manière relative de faibles niveaux de modification (<2 %) pour l'isomérisation de l'acide aspartique, ainsi que pour la déamidation des asparagines.

#### IV - Conclusion

Récemment, notre équipe a développé une méthode analytique innovante pour caractériser la structure primaire de protéines thérapeutiques mettant en jeu une instrumentation CE-ESI-MS/

MS, introduite depuis peu sous le nom de CESI-MS. L'analyse d'une seule injection d'un digestat tryptique de trastuzumab correspondant à une quantité de 200 fmol a permis d'obtenir la caractérisation complète du mAb du point de vue de la couverture de séquence. Le fait d'utiliser une interface CE-MS ne nécessitant pas de liquide additionnel pour maintenir le courant de la séparation électrophorétique permet de favoriser le processus ESI. L'excellente sensibilité fournie par le système a montré un impact positif sur la qualité spectrale MS/MS. Dans le cas du trastuzumab, cela a permis d'obtenir systématiquement plus de 90 % des ions  $\gamma/b$  et ainsi d'approfondir le niveau de caractérisation, en ce qui concerne la succession des acides aminés de la protéine. En parallèle à l'étude de la couverture de séquence du trastuzumab, les glycosylations ont également été étudiées en utilisant les mêmes données CE-ESI-MS.

Nous avons montré qu'il était possible de caractériser la structure et la position de 15 glycoformes exprimées par le trastuzumab, tout en estimant l'abondance relative de chaque glycoforme d'une manière cohérente. De même, toujours sur les résultats de la même analyse, différentes PTMs dites « points chauds » ont pu être caractérisées et leur niveau de modification estimé. L'étude de ces PTMs, incluant les glycosylations, a mis en lumière les avantages de l'implémentation d'une étape de séparation électrophorétique précédant l'analyse MS. En effet, la grande sélectivité de la CE a démontré la capacité de cette méthode à séparer des peptides ayant de très faibles différences, comme la déamidation d'une asparagine ou l'isomérisation de l'acide aspartique. La possibilité de séparer un peptide modifié de son homologue intact avant analyse MS aide à identifier précisément l'acide aminé concerné par la modification. Elle permet également d'éviter tout phénomène de compétition dans le processus d'ionisation ESI. Ceci donne aussi l'opportunité d'accéder à la quantification relative de chaque modification.

Compte tenu des attentes des agences de réglementation concernant le niveau de caractérisation pour la mise sur le marché de protéines thérapeutiques telles que les biosimilaires par exemple, la CE-ESI-MS apparaît comme une méthode attractive et robuste. En effet, les développements réalisés par notre équipe tendent à démontrer que la CE-ESI-MS apporte des informations significatives dans une perspective de R&D, et représente par conséquent un outil analytique innovant en complément de l'arsenal des méthodes déjà appliquées.

## REFERENCES

- [1] BECK A., WURCH T., BAILLY C., CORVAIA N., Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies, *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10, 345-352.
- [2] ARNOLD J.N., WORMALD M.R., SIM R.B., RUDD P.M., DWEK R.A., The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins, *Annual Review of Immunology*, 2007, 25, 21-50.
- [3] ZHANG Z.Q., PAN H., CHEN X.Y., Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies, *Mass Spectrometry Reviews*, 2009, 28, 147-176.
- [4] BECK A., SANGLIER-CIANFERANI S., VAN DORSSELAER A., Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 2012, 84, 4637-4646.
- [5] BECK A., REICHERT J.M., Approval of the first biosimilar antibodies in Europe A major landmark for the biopharmaceutical industry, *Mabs*, 2013, 5, 621-623.
- [6] ROSATI S., THOMPSON N.J., HECK A.J.R., Tackling the increasing complexity of therapeutic monoclonal antibodies with mass spectrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 48, 72-80.
- [7] FORNELLI L., AYOUB D., AIZIKOV K., BECK A., TSYBIN Y.O., Middle-Down Analysis of Monoclonal Antibodies with Electron Transfer Dissociation Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 2014, 86, 3005-3012.
- [8] BIACCHI M., BHAJUN R., SAID N., BECK A., FRANCOIS Y.N., LEIZE-WAGNER E., Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface, *Electrophoresis*, 2014, 35, 2986-2995.
- [9] BECK A., DIEMER H., AYOUB D., DEBAENE F., WAGNER-ROUSSET E., CARAPITO C., VAN DORSSELAER A., SANGLIER-CIANFERANI S., Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 48, 81-95.
- [10] BECK A., WAGNER-ROUSSET E., AYOUB D., VAN DORSSELAER A., SANGLIER-CIANFERANI S., Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products, *Analytical Chemistry*, 2013, 85, 715-736.
- [11] MOINI M., Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip, *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 4241-4246.
- [12] BUSNEL J.M., SCHOENMAKER E., RAMAUTAR R., CARASCO-PANCORBO A., RATNAYAKE C., FEITELSON J.S., CHAPMAN J.D., DEELDER A.M., MAYBORODA O.A., High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Coupling a Porous Sheathless Interface with Transient-Isotachopheresis, *Analytical Chemistry*, 2010, 82, 9476-9483.
- [13] JORGENSON J.W., LUKACS K.D., Capillary zone electrophoresis, *Science*, 1983, 222, 266-272.
- [14] OLIVARES J.A., NGUYEN N.T., YONKER C.R., SMITH R.D., On-line mass-spectrometric detection for capillary zone electrophoresis, *Analytical Chemistry*, 1987, 59, 1230-1232.
- [15] WOJCIK R., DADA O.O., SADILEK M., DOVICH N.J., Simplified capillary electrophoresis nanospray sheath-flow interface for high efficiency and sensitive peptide analysis, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, 24, 2554-2560.
- [16] GAHOUAL R., BUSNEL J.M., WOLFF P., FRANCOIS Y.N., LEIZE-WAGNER E., 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, 1029-1038.
- [17] GAHOUAL R., BURR A., BUSNEL J.M., KUHN L., HAMMANN P., BECK A., FRANCOIS Y.N., LEIZE-WAGNER E., Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *Mabs*, 2013, 5, 479-490.
- [18] GAHOUAL R., BUSNEL J.M., BECK A., FRANCOIS Y.N., LEIZE-WAGNER E., Full Antibody Primary Structure and Microvariant Characterization in a Single Injection Using Transient Isotachopheresis and Sheathless Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 2014, 86, 9074-9081.
- [19] GAHOUAL R., BIACCHI M., CHICHER J., KUHN L., HAMMANN P., BECK A., LEIZE-WAGNER E., FRANCOIS Y.N., Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry, *Mabs*, 2014, 6, 1464-1473.
- [20] DANMEN C.W.N., CHEN W., CHAKRABORTY A.B., Oosterrhout M., MAZZEO J.R., GEBLER J.C., SCHELLENS J.H.M., ROSING H., BEIJNEN J.H., Electrospray ionization quadrupole ion-mobility time-of-flight mass spectrometry as a tool to distinguish the lot-to-lot heterogeneity in N-glycosylation profile of the therapeutic monoclonal antibody trastuzumab, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20, 2021-2033.
- [21] RUHAAK L.R., MIYAMOTO S., KELLY K., LEBRILLA C.B., N-Glycan Profiling of Dried Blood Spots, *Analytical Chemistry*, 2012, 84, 396-402.
- [22] STAVENHAGEN K., PLOMP R., WHURER M., Site-specific protein N- and O-glycosylation analysis by a C18-porous graphitized carbon-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry approach using pronase treated glycopeptides, *Analytical Chemistry*, 87, 11691-11699.
- [23] JAYO R.G., THAYSEN-ANDERSEN M., LINDENBURG P.W., HASELBERG R., HANKEMEIER T., RAMAUTAR R., CHEN D.D.Y., Simple Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Method for Complex Glycan Analysis Using a Flow-Through Microvial Interface, *Analytical Chemistry*, 2014, 86, 6479-6486.
- [24] YANG H., ZUBAREV R.A., Mass spectrometric analysis of asparagine deamidation and aspartate isomerization in polypeptides, *Electrophoresis*, 2010, 31, 1764-1772.
- [25] GAHOUAL R., BECK A., FRANCOIS Y.N., LEIZE-WAGNER E., Independent highly sensitive characterization of asparagine deamidation and aspartic acid isomerization by sheathless CZE-ESI-MS/MS, *Journal of Mass Spectrometry*, 2016, 51, 150-158.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Jim Thorn et Stephen Lock, de Sciex separations Inc. (Brea, Etats-Unis), pour le prêt du CESI8000. Ils remercient également pour leurs contributions le Dr. E. Wagner-Rousset, MC. Janin-Bussat et O. Colas, le Centre d'immunologie Pierre Fabre à St Julien en Genevois.