

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur  
tient lieu de  
THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE  
METHODE DE DOSAGE PAR UPLC-MS/MS DE  
L'EMICIZUMAB**

Intérêt pour le suivi thérapeutique pharmacologique

**Soutenu le 20/11/2020**

**Par M. Benjamin LIMA**

**Membres du jury :**

**Présidente :**

Madame la Professeure Delphine ALLORGE

**Asseseurs :**

Madame la Professeure Myriam LABALETTE  
Monsieur le Docteur Antoine RAUCH

**Directeur de thèse :**

Monsieur le Docteur Benjamin HENNART





### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie

Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

### Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie

M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

### ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurie	Immunologie

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière



***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



## **Remerciements**

### **A Madame la Professeure Delphine Allorge**

Pour avoir accepté la présidence de ce jury, de m'avoir incité à réaliser cet exercice et accordé votre confiance dans son accomplissement. Je vous remercie également de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre service de Toxicologie et Génopathies à l'issue de mon internat. J'en tire une expérience très enrichissante.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

### **A mes juges, Madame la Professeure Myriam Labalette et Monsieur le Docteur Antoine Rauch**

Pour avoir accepté, avec enthousiasme, de juger ce travail avec bienveillance et avec la rigueur que vous appliquez au quotidien dans vos instituts respectifs.

Soyez assurés de mon entière reconnaissance.

### **A mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Benjamin Hennart**

Pour avoir accepté de m'encadrer sur ce travail. Je te remercie pour ton aide et tes remarques, toujours pertinentes et constructives. Je te suis reconnaissant de ton entière disponibilité et ton abnégation. Merci, pour avoir partagé, tant sur le plan professionnel que personnel ton expérience, toujours avec aisance, un ton rieur et un air jovial.

Cher futur confrère, je te témoigne ici mon respect et ma sincère considération.

### **A ma maman et à mes frères,**

Pour m'avoir encouragé durant toutes ces années d'études, pour ces moments, toujours précieux que l'on partage en famille. Pour m'avoir persuadé que le jeu en vaut la chandelle. Pour me rappeler aussi, sur qui compter en toutes circonstances. Pour votre amour.

### **A ma gazelle, ma douce,**

Pour m'apporter tous les jours ton sourire, ta gentillesse, ta sagesse, ton humour. Pour ce que tu as sacrifié pour être à mes côtés, je te serais toujours extrêmement reconnaissant. Pour m'avoir choisi et gardé pour partager ta vie et de donner toujours le meilleur de toi-même.

Tu seras toujours ma petite femme, idéale à mes yeux. Je t'aime de tout mon cœur.

### **A mes deux amis d'enfance,**

Pour m'avoir accueilli il y a treize ans si généreusement et accompagné jusqu'ici à la faveur d'actions inimaginables, particulièrement au sein d'une colocation ahurissante, répugnante et chaleureuse à la fois, que seule une amitié sincère pouvait faire durer.

### **A mes amis de pharma Dijon,**

Pour m'avoir invité à partager vos galères pour les rattrapages, votre appart pour une soirée, votre canapé pour une nuit, votre table pour un gueuleton. Pour m'avoir inculqué l'amour du *quantum*. Et surtout de m'avoir fait réaliser ce qu'est prendre du P.

### **A LA débauche,**

Pour avoir été à mes côtés durant ces semestres Amiénois. Aussi surprenant qu'inattendu, vous avez débarqué de partout en France, avec votre imagination délirante pour retourner l'internat. A jouer, se battre, ventre-glisser, déguster, fêter, prendre le TGV... Une ambiance inégalée.

**A mes co-internes,**

Pour avoir partagé avec moi ces quatre années d'internat. Sans vous je n'aurai jamais eu une aussi bonne « marge de progression ».

**A toutes celles et ceux**

Avec qui j'aurai toujours plaisir à partager une coupe à chaque fois que l'occasion se présentera.



## Table des matières

Introduction.....	21
Hémophilie .....	23
Généralités.....	23
Diagnostic des patients hémophiles.....	23
Evolution de prise en charge thérapeutique de l'hémophilie A.....	25
Place de l'Emicizumab.....	26
Suivi biologique des patients hémophiles A.....	27
Les anticorps : de l'immunité à la thérapeutique .....	31
Généralités sur les anticorps.....	31
Développement, croissance et intérêt des immunoglobulines monoclonales ....	34
Aspects pharmacodynamiques et pharmacocinétiques .....	39
Dosage plasmatique des anticorps monoclonaux thérapeutiques .....	40
Suivi thérapeutique pharmacologique.....	51
Validation d'une méthode de dosage : Définition .....	53
Matériels et méthodes .....	55
Réactifs.....	55
Méthode LC-MS/MS.....	56
Validation de méthode .....	59
Activité plasmatique de l'Emicizumab .....	60
Echantillons patients et éthique .....	61
Résultats.....	63
Méthode LC-MS/MS.....	63
Validation de méthode .....	78
Echantillons patients .....	79
Discussion .....	83
Conclusion.....	93
Bibliographie.....	95
Annexes.....	105



## Table des figures et tableaux

Figure 1 - Comparaison des données pharmacocinétiques des essais cliniques HAVEN, en fonction du schéma posologique adapté et de l'âge du patient – QW : dose d'entretien de 1,5mg/kg/semaine ; Q2W : dose d'entretien de 3 mg/kg toutes les 2 semaines ; Q4W : dose d'entretien de 6 mg/kg toutes les 4 semaines ; * adultes et adolescents HA sévère sans inhibiteurs ; ** adultes et adolescents HA sévère avec et sans inhibiteurs. Figure modifiée de Le Quellec S.,2020.	27
Figure 2 - Structure générale d'une immunoglobuline - Isotype gamma (IgG) et fragments Fab, Fc et ScFv générés in vitro pour la production des anticorps monoclonaux	32
Figure 3 - Evolution du nombre de mAbs thérapeutique depuis 1986 – Estimation du nombre de mAbs incluant les anticorps actuellement en révision réglementaire par les organisme compétents pour l'année 2020 (US FDA et EMA) (n=13) selon <a href="http://antibodysociety.org">http://antibodysociety.org</a> (18)	34
Figure 4 – Illustration schématique du mode d'action de l'Eemicizumab – Interaction du FVIIIa (A) ou de l'Eemicizumab (B) avec le facteur IX activé et facteur X (43)	38
Figure 5 – Représentation schématique du principe de la spectrométrie de masse conventionnelle. (a) Selon un mode d'acquisition simple. (b) Selon un mode d'acquisition en tandem (MS/MS).	46
Figure 6 – Représentation schématique du principe d'ionisation par ESI.	47
Figure 7 - Représentation schématique d'un analyseur de type quadripolaire.	48
Figure 8 - Représentation schématique du mode d'analyse Product ion scan au sein d'un système QqQ.	49
Figure 9 - Représentation schématique du mode d'analyse single (multiple) reaction monitoring au sein d'un système QqQ.	50
Figure 10 - Evolution du gradient de solvant polaire (H <sub>2</sub> O/ACN) dans le système chromatographique en phase inverse assurant l'élution des peptides avant détection au spectromètre de masse.	58
Figure 11 - Localisation des peptides définis in silico dans la séquence d'AA de la CH2 de l'Eemicizumab.	65
Figure 12- Fullscan de solution trypsinée d'ECZ dans un TBA à différentes concentrations : (a) 0,3 mg/mL et (b) 3 mg/mL.	66

Figure 13 - Illustration de l'identification du peptide <sup>55</sup> SGGSIYNEEFQDR <sup>67</sup> en mode fullscan. (a) Mise en évidence (mass display) des ions [M-H <sup>+</sup> ], [M/2-H <sup>+</sup> ] et [M/3-H <sup>+</sup> ]. (b) Spectre de masse à 5,65 minutes. _____	68
Figure 14 – Evaluation de l'impact de la tension de cône sur l'intensité du signal émis par la masse 751,331 Da du peptide <sup>55</sup> SGGSIYNEEFQDR <sup>67</sup> (mass display). _____	69
Figure 15 – Illustration de la spécificité des peptides vis-à-vis d'un pool d'IgG polyvalentes Clayrig® en solution pure dans du TBA en appliquant l'outil de recherche de masse (mass display). _____	70
Figure 16 – Extraction des spectres de masse après analyse fullscan d'une solution d'IgG polyvalente, du peptide <sup>24</sup> ASGYTFTDNNMDWVR <sup>38</sup> en absence (en vert) et en présence (en rouge) d'Emicizumab. _____	71
Figure 17 – Illustration de l'identification du SIL-peptide par mode de balayage fullscan sur le Xevo® TQ-XS. (a) Chromatogramme de la solution pure de SIL-ECZ. (b) Spectre des masses à 5,50 minutes. (c) Identification du peptide pas ces différentes formes d'ionisation (une, deux ou trois charges à l'ESI). _____	72
Figure 18 - Illustration de la fragmentation des peptides selon la nomenclature de Biemann (73). _____	73
Figure 19 - Illustration des spectres de masses obtenus après fragmentation (daughter Scan) du peptide <sup>55</sup> SGGSIYNEEFQDR <sup>67</sup> (a) et du peptide <sup>68</sup> VIMTVDK <sup>74</sup> (b) à différentes CE au niveau du q2. A partir d'une solution pure d'ECZ à 300 µg/mL.	74
Figure 20 – Cinétique des concentrations en Emicizumab mesurées par la technique UPLC-MS/MS - multiple reaction monitoring (MRM), chez deux patients inclus dans le projet EMICARE. _____	80
Figure 21 – Comparaison des mesures de concentrations de l'Emicizumab entre les techniques par spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) et par mesure chromatographique (activité ECZ, STA R-Max) – Echantillons issus de la plasma/sérothèque EMICARE. _____	82

Tableau 1 - Caractéristiques des différents isotypes d'immunoglobulines humaines.	32
Tableau 2 – Spécificité des peptides évaluée par la correspondance avec des séquences d'AA répertoriées dans la base de données UniProtKB_Human, après protéolyse et analyse in silico - Zéro clivage manqués, taille < 2kDa, nombre d'AA ≥ 7 et ≤15.	64
Tableau 3 – Récapitulatif des paramètres pouvant être utilisés, en mode MRM, pour l'analyse quantitative de l'ECZ en utilisant un étalon interne de type SIL-ECZ	75
Tableau 4 - Evaluation des pertes et du rendement en IgG totales et de ces différents isotypes lors du processus de purification	77
Tableau 5 – Concentration (g/L) des différents isotypes d'IgG à l'issu de la purification sur protéine A.	77
Tableau 6 – Biais sur les concentrations recalculées par rapport à la valeur théorique de trois gammes d'Emicizumab – Impact du ratio TRP (mol/mol d'ECZ).	78
Tableau 7 – Principaux résultats de la validation de méthode analytique.	79
Tableau 8 – Données relatives aux dosages plasmatiques des échantillons patient issus de la sérothèque du projet EMICARE	81



## Liste des abréviations

AA	Acide(s) aminé(s)
ACN	Acétonitrile
ADA(s)	Anticorps anti-médicament
AMM	Autorisation de mise sur le marché
CE	Energie de collision
CID	Dissociation induite par collision
COFRAC	Comité français d'accréditation
CRH	Centre de référence de l'hémophilie
Da	Dalton
DTT	Dithiotréitol
EBM	Examen de biologie médicale
ECZ	Emicizumab
ESI	Electrospray Ionization
FVIII	Facteur VIII ou facteur anti-hémophilique A
FVIII :C	Activité chromogénique du facteur VIII
FIX	Facteur IX ou facteur anti-hémophilique B
FXI	Facteur XI
FXII	Facteur XII
HA	Hémophilie A
IAA	Iodoacétamide
Ig	Immunoglobuline
IgIV	Immunoglobuline par voie intraveineuse
ITI	Induction d'une tolérance immune
LBM	Laboratoire de biologie médicale
LLOQ	Limite inférieure de quantification
mAb(s)	Anticorps monoclonal(aux)
MAG4	Maladie liée aux IgG4
MGUS	Gammopathie monoclonale de signification indéterminée
MS	Spectrométrie de masse
PBMCs	Cellules mononuclées du sang périphérique
PK/PD	Pharmacocinétique/pharmacodynamie
QqQ	Triple quadripôle
STP	Suivi thérapeutique pharmacologique
TCA	Temps de céphaline avec activateur
TP	Taux de prothrombine
tr	Temps de rétention
TRP	Trypsine
(UP)LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
vWF	Facteur de von Willebrand



## Introduction

La prise en charge des patients atteints d'hémophilie A sévère, avec ou sans inhibiteur (allo-anticorps anti-FVIII) est révolutionnée par le développement d'un traitement sous-cutané : l'Emicizumab, commercialisé sous le nom d'HEMLIBRA® par la société Roche. L'Emicizumab (ECZ) est un anticorps monoclonal humanisé bispécifique mimant l'activité coagulante du facteur VIII (FVIII). Il exerce une activité hémostatique chez les hémophiles A sévères indépendamment de la présence ou non d'un inhibiteur. Il n'existe, à ce jour, pas d'examen biologique de référence permettant le suivi d'un traitement par Emicizumab. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) pour le suivi des concentrations circulantes en anticorps monoclonaux thérapeutiques se présente comme une méthode candidate pour le dosage de l'Emicizumab. Ce mémoire présente le développement et la validation d'une technique de dosage plasmatique de l'Emicizumab par UPLC-MS/MS. Il s'inscrit dans un projet plus global, piloté par le laboratoire d'hémostase et le service de consultation des maladies hémorragiques du CHU de Lille, visant à évaluer l'intérêt pronostique du dosage plasmatique de l'Emicizumab pour le suivi d'une prophylaxie chez les patients hémophiles A sévères. Au cours de ce mémoire seront présentées les étapes de développement du dosage de l'Emicizumab ainsi que la validation, selon les exigences de la norme NF ISO 15189, de la méthode adoptée en exposant ses avantages et ses limites. Ce travail est une première étape indispensable dans la détermination de l'intérêt et des conditions de mise en œuvre du suivi thérapeutique pharmacologique de cet anticorps monoclonal thérapeutique. Il s'agira enfin d'évaluer sa mise en application à des échantillons patients.



# Hémophilie

## Généralités

L'hémophilie est une maladie hémorragique héréditaire liée à un déficit en FVIII (facteur anti-hémophilique A) pour l'hémophilie A (HA) ou en FIX (facteur anti-hémophilique B) pour l'hémophile B. La transmission de l'hémophilie est récessive liée à l'X, c'est-à-dire que, classiquement, les hommes sont atteints de la maladie et les femmes en sont conductrices. La prévalence dans le monde de la maladie est globalement de 1/5 000 naissances de garçons pour l'hémophilie A et 1/30 000 naissances de garçons pour l'hémophilie B, répartis de façon similaire dans le monde. L'histoire naturelle de la maladie est la répétition des saignements. Les épisodes hémorragiques sont préférentiellement articulaires et musculaires. Avec pour les formes sévères, le risque d'apparition d'une arthropathie chronique (arthropathie hémophilique) en cas de saignements répétés sur une même articulation. Aujourd'hui, le traitement repose encore essentiellement sur l'utilisation de FVIII ou FIX soit en curatif à la demande, soit en prophylaxie par administrations régulières de ces médicaments. Si le suivi doit être assuré par une structure du Centre de référence de l'hémophilie (CRH), tout médecin peut être amené à prendre en charge un patient atteint d'une hémophilie.

## Diagnostic des patients hémophiles

Que ce soient les formes familiales ou dans les cas d'hémophilies *de novo* (forme sporadique), la symptomatologie hémorragique est la raison principale faisant évoquer une hémophilie. A noter que l'HA sévère est actuellement majoritairement sporadique, en absence d'antécédents familiaux (1). L'apparition d'un symptôme hémorragique conduit à une exploration du bilan de coagulation. En première intention, il s'agit d'une mesure du temps de céphaline avec activateur (TCA) et du taux de prothrombine (TP). Ce sont des tests globaux, dits chronométriques, réalisés dans tous les laboratoires de biologie médicale (LBM). Ils sont basés sur le temps nécessaire à la coagulation et plus précisément de formation d'un caillot de fibrine dans un échantillon plasmatique citraté (pauvre en plaquettes). Pour le TCA, en présence d'un activateur de la coagulation (kaolin ou silice), additionné de phospholipides, l'ajout de chlorure de calcium permet de déclencher *in vitro* la

cascade de coagulation permettant d'explorer la voie intrinsèque de la coagulation et les anomalies associées aux facteurs VIII, IX (FIX), XI (FXI) et XII (FXII). La mesure du TP se fait en présence d'un facteur tissulaire (thromboplastine), selon le même principe et permet d'explorer la voie extrinsèque de la coagulation et les anomalies associées au facteur VII (FVII). Un allongement isolé du TCA, c'est-à-dire, sans modification du TP, permet d'évoquer une hémophilie, parfois en absence de toute suspicion clinique. A noter que l'allongement du TCA, en dehors d'une éventuelle non-conformité pré-analytique (défaut de remplissage, contamination par héparine), peut être observé dans différentes situations cliniques ou associé à un traitement anticoagulant par exemple. Par ailleurs, certaines différences entre les deux facteurs anti-hémophiliques existent et doivent être prises en compte dans la recherche d'un déficit : augmentation du FVIII lors de contexte inflammatoire et pendant la grossesse par exemple, concentration dépendante du facteur de von Willebrand (vWF) pouvant présenter une anomalie qualitative ou quantitative (diagnostic différentiel). Le FIX, facteur dit vitamine K-dépendant, peut-être diminué en cas de pathologie sous-jacente : insuffisances hépatiques, malabsorption intestinale.

L'hémophilie peut être diagnostiquée à la suite d'un dépistage familial en connaissance d'antécédents familiaux (maman conductrice) ou encore, de manière fortuite, devant un allongement du TCA, réalisé dans un autre contexte, bilan préopératoire notamment. Le diagnostic biologique de l'hémophilie est donc porté sur la mise en évidence d'un déficit isolé en FVIII ou en FIX inférieur à 40% en dehors de toute situation pathologique susceptible de modifier les concentrations plasmatiques en facteur. Le taux, on parle aussi d'activité de facteur, définit la sévérité de l'hémophilie. Une forme mineure d'hémophilie pour une activité de facteur comprise entre 5 et 40%, une forme modérée entre 1 et 5 % enfin une forme sévère d'hémophilie si l'activité du facteur est inférieure à 1%. La mesure d'activité est généralement réalisée selon une méthode chromométrique, basée sur le principe du TCA par correction du temps de coagulation d'un plasma déficient en FVIII. La prise en charge, dépendante de la sévérité de la maladie vise à améliorer la qualité de vie des patients et répond à différents objectifs : identifier les situations à risques hémorragiques en particulier les hémarthroses, discuter les modalités thérapeutiques, prévenir, dépister et traiter la douleur, les complications du

traitement, organiser la prise en charge de gestes invasifs ou encore proposer un accompagnement éducatif aux patients et aux parents.

### **Evolution de prise en charge thérapeutique de l'hémophilie A**

Parmi les outils thérapeutiques utilisés dans la prise en charge de l'hémophilie, on distingue les facteurs anti-hémophiliques (FVIII, FIX) employés à visée substitutive de la protéine déficiente, et les médicaments contournant ou mimant l'action de la protéine déficiente, on parle alors d'agents « by-passants ». Les concentrés de facteurs (en absence d'inhibiteur et/ou avec inhibiteur à titre faible) peuvent être administrés à la demande, avec un réel bénéfice de l'éducation thérapeutique des patients ou pour améliorer l'efficacité d'une prise en charge en cas de symptômes évocateurs d'un saignement. Les posologies étant adaptées à la situation clinique et au taux de FVIII ou FIX souhaité. Ils sont également utilisés en prophylaxie pour la prévention des hémarthroses et saignements graves. Sont également utilisés des traitements hémostatiques dits non spécifiques tels que l'acide tranexamique, la desmopressine, plutôt utilisés chez les patients hémophiles mineurs ou modérés.

Pour la suite de ce mémoire, nous nous intéresserons uniquement au cas de l'HA marquée par un déficit constitutionnel en FVIII. Une des préoccupations principales pour le traitement de l'HA est l'apparition d'inhibiteur, anticorps anti-FVIII. C'est une complication majeure, liée au traitement substitutif par le facteur VIII et rendant celui-ci inefficace. Ces inhibiteurs apparaissent chez environ 30% des patients atteints d'HA sévère, responsable d'une augmentation de la mortalité, du risque de saignement et une diminution de la qualité de vie pour les patients hémophiles (2). Deux types de stratégies thérapeutiques sont possibles et complémentaires : l'éradication de l'inhibiteur par l'induction d'une tolérance immune (ITI) en injectant fréquemment des doses de FVIII sur plusieurs mois, parfois plusieurs années (2,3) ; traitement prophylactique ou curatif des accidents hémorragiques par les agents dits by-passants : concentré de facteur de coagulation VII activé (NOVOSEVEN®) ou complexe prothrombinique activé (aPCC, FEIBA®), court-circuitant l'action du FVIII.

## **Place de l'Emicizumab**

Plus récemment, l'Emicizumab, un anticorps monoclonal bispécifique mimant l'activité coagulante du FVIII déficient s'est avéré être une autre alternative thérapeutique prometteuse. Initialement prescrit en ATU (autorisation temporaire d'utilisation) puis avec AMM en 2018 (4), il exerce une activité hémostatique efficace en présence d'un anticorps anti-FVIII. Deux études ont confirmé la supériorité de l'Emicizumab sur les traitements anti-hémophiliques de référence dans la prévention des hémorragies chez l'hémophile A sévère avec ou sans inhibiteur (5,6). Le bénéfice apporté par ce traitement était suffisant pour qu'en 2019, l'EMA et la Haute Autorité de Santé (HAS) aient, secondairement, donné un avis positif pour une utilisation chez les patients hémophiles A sévères, ayant l'indication d'une prophylaxie, même en absence d'inhibiteur (7,8). Dans les essais cliniques de Phase 3 (HAVEN 3), la prophylaxie par Emicizumab a réduit significativement le nombre de saignements par rapport aux concentrés de FVIII chez les adolescents et les enfants avec ou sans inhibiteurs du FVIII et a été généralement bien tolérée (9). L'Emicizumab est administré par voie sous-cutanée permettant une amélioration très significative de l'observance et de la qualité de vie comparés aux autres traitements anti-hémophiliques existants. Sa demi-vie d'absorption est de 1,7 jours. La posologie usuelle en prophylaxie de survenue d'évènement hémorragique est d'une dose de charge (3 mg/kg/semaine) pendant les quatre premières semaines, relayée par une dose hebdomadaire, bihebdomadaire ou quadrihebdomadaire d'entretien (respectivement de 1,5 mg/kg/semaine, 3 mg/kg toutes les 2 semaines et 6 mg/kg toutes les 4 semaines). Les données des différents essais cliniques HAVEN ont montré un profil PK similaire chez les HA sévères, en présence et en absence d'inhibiteurs, avec des concentrations plasmatiques moyennes, à l'état d'équilibre, soit à l'issue des quatre semaines de dose de charge, de l'ordre de 50 µg/mL (5,6,10,11) chez l'adulte et les enfants (Figure 1).

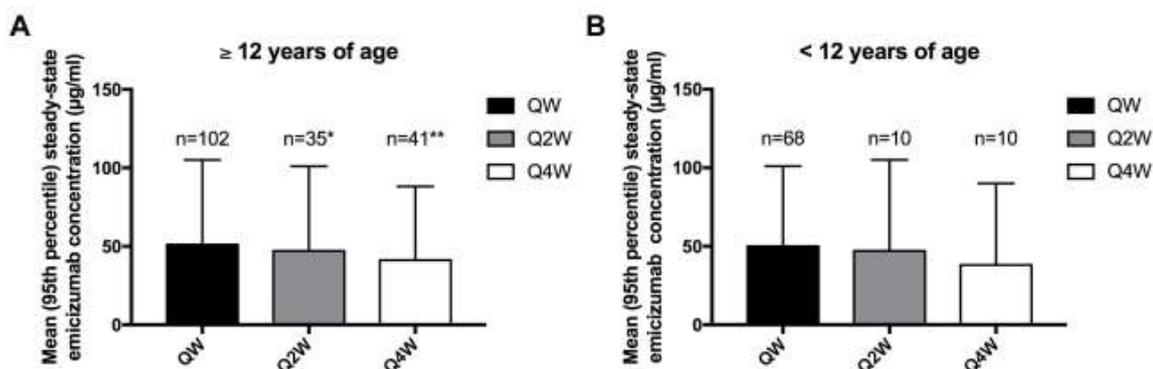


Figure 1 - Comparaison des données pharmacocinétiques des essais cliniques HAVEN, en fonction du schéma posologique adapté et de l'âge du patient – QW : dose d'entretien de 1,5mg/kg/semaine ; Q2W : dose d'entretien de 3 mg/kg toutes les 2 semaines ; Q4W : dose d'entretien de 6 mg/kg toutes les 4 semaines ; \* adultes et adolescents HA sévère sans inhibiteurs ; \*\* adultes et adolescents HA sévère avec et sans inhibiteurs. Figure modifiée de Le Quellec S.,2020.

Les concentrations résiduelles (Cmin) sont respectivement de 51,1, 46,7 et 38,3 µg/mL en fonction du schéma d'administration de la dose d'entretien : 1,5 mg/kg/semaine, 3 mg/kg toutes les 2 semaines ou 6 mg/kg toutes les 4 semaines. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 28 jours. Les études n'ont pas mis en évidence d'élimination cible-dépendante. Son élimination, en absence d'ADA, est due à une protéolyse lysosomale.

### **Suivi biologique des patients hémophiles A**

En absence de traitement susceptible d'influencer les résultats du bilan d'hémostase, les tests chromométriques, TCA, le taux de FVIII et le titrage d'inhibiteurs sont généralement suffisants pour le suivi des patients hémophiles avec et sans inhibiteurs. Ils sont à distinguer cependant des tests chromogéniques (ou amidolytiques) basés sur l'activité enzymatique d'un facteur de la coagulation sur un substrat chromogène (détectable à une longueur d'onde précise). Ceux-ci sont plus pertinents dans des situations particulières, où les tests chromométriques sont ininterprétables (dans leur version standard) : patients hémophiles sévères avec inhibiteur neutralisant ou les patients traités par Emicizumab. Les inhibiteurs sont habituellement les immunoglobulines IgG dirigées contre l'activité coagulante du FVIII et titrés en Unités Bethesda (UB). Chez les patients présentant un titre élevé

d'inhibiteur ( $\geq 5$  UB), le traitement par FVIII est inefficace. La recherche d'un inhibiteur se fait obligatoirement par un test fonctionnel mettant en évidence l'effet neutralisant de l'anticorps vis-à-vis de l'activité coagulante du FVIII présent dans un plasma témoin.

Aucun examen du bilan de coagulation quotidiennement réalisé dans les LBM ne permet actuellement un suivi biologique du traitement par Emicizumab. Le dosage de l'activité du FVIII par la méthode chromométrique et le TCA sont ininterprétables. Les patients traités par Hemlibra® ont un TCA drastiquement raccourci avec un ratio  $< 0,8$  à partir d'une concentration plasmatique en Emicizumab à  $10 \mu\text{g/mL}$ . Un impact concentration-dépendant sur le taux de prothrombine et le calcul de l'INR a également été mis en évidence chez des patients sous anti-vitamine K (AVK). (12). Compte tenu du mécanisme d'action de l'Emicizumab, les études ont également mis en évidence un impact important, même à très forte dilution plasmatique, sur l'activité du FVIII par méthode chromométrique, supérieure à 150%. Une méthode chromogénique de dosage du FVIII (FVIII:C) peut être réalisée. Il a été montré également qu'en fonction de la nature des réactifs utilisés (cofacteurs de la réaction FIX et FXa = facteur X activé), certaines réactions croisées peuvent être observées. Les réactifs d'origine humaine interagissent avec à l'Emicizumab : une activité FVIII:C est retrouvée et surestime le potentiel hémostatique clinique de l'Emicizumab. Les réactifs de nature bovine montrent bien l'absence d'une activité FVIII:C (12,13). La méthode chromogénique est la seule technique viable pour explorer l'apport exogène de FVIII et le titrage d'un éventuel inhibiteur anti-FVIII. Certains laboratoires mesurent l'activité spécifique de l'Emicizumab, basée sur le principe d'un test chromométrique où la correction du temps de coagulation d'un plasma déficient en FVIII est proportionnel à la concentration en Emicizumab (14,15).

Aucun suivi biologique ne paraît nécessaire chez les patients HA sous Emicizumab mais des dosages de la concentration plasmatique sont en cours d'évaluation et pourraient s'avérer utiles pour détecter des anticorps anti-ECZ (ADA), dans les situations où l'Emicizumab serait associé à un traitement en concentré de FVIII ou en cas de problème de compliance au traitement et l'apparition de saignements. De même, ces dosages de la concentration protéique circulante pourraient aider à évaluer le pouvoir prédictif du taux plasmatique résiduel d'Emicizumab, un mois après l'introduction du traitement (à l'équilibre), dans la survenue d'un saignement

cliniquement significatif (projet collaboratif au CHU de Lille). Ces exemples illustrent ainsi l'intérêt de la mise au point du dosage d'ECZ par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS) pour un éventuel STP des patients atteints d'HA sévère constitutionnelle avec ou sans inhibiteur.



## Les anticorps : de l'immunité à la thérapeutique

### Généralités sur les anticorps

L'immunité décrite par l'historien Thucydide lors de l'épidémie de fièvre typhoïde à Athènes en 430 av J.-C ; la pratique de la « variolisation » en Chine, ensuite répandue en Angleterre puis dans toute l'Europe ; l'inoculation en 1796 par Edward Jenner du virus de la vaccine (variole de la vache). Chacune de ces observations ou pratiques ont impliqué la réponse immunitaire de l'organisme humain contre un agent extérieur et sont consécutives à une réaction entre un antigène et un anticorps.

Les anticorps sont des protéines impliquées dans la réponse immunitaire dite adaptative (distincte de la réponse immunitaire innée) et permettent à l'organisme de réagir en présence d'un antigène. La structure générale de ces anticorps a été décrite en 1959 par Porter à la suite des travaux d'Exelmans. Ces deux chercheurs ont été associés pour le prix Nobel de Physiologie décerné en 1972 (16). Ce sont des protéines de haut poids moléculaire, appartenant à la superfamille des immunoglobulines formées de 4 chaînes polypeptidiques (150 000 Da ou Dalton environ) : deux chaînes lourdes (H pour *heavy* de 50 000 Da chacune) et deux chaînes légères *kappa* ou *lambda* (L pour *light* de 25 000 Da chacune) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule (Figure 2). Chacune des chaînes lourdes ou légères est constituée de domaines constants (CH ou CL) et variables (VH ou VL). Leurs nombres varient en fonction des isotypes d'Ig.

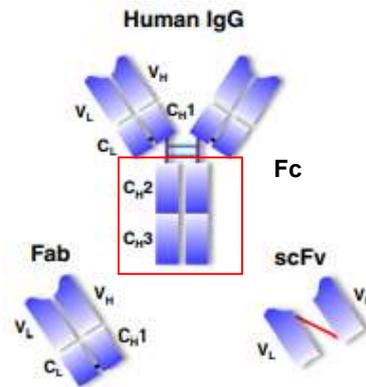


Figure 2 - Structure générale d'une immunoglobuline - *Isotype gamma (IgG) et fragments Fab, Fc et ScFv générés in vitro pour la production des anticorps monoclonaux*

En effet il existe, chez l'Homme, cinq classes ou isotypes d'Ig : *gamma* IgG, *mu* IgM, *alpha* IgA, *epsilon* IgE et *delta* IgD, qui diffèrent selon la nature de la chaîne lourde, leur poids moléculaire, leur demi-vie plasmatique, leur concentration sérique et également par leurs fonctions dans la réponse immunitaire (Tableau 1).

	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Molecular weight	160 kDa, 400 kDa	175 kDa	190 kDa	150 kDa	950 kDa, 1150 kDa
Molecular form	Monomer, dimer	Monomer	Monomer	Monomer	Pentamer, hexamer
Valence	2, 4	2	2	2	10, 12
Serum concentration (mg/mL)	1.5–2.6	0.04	0.0003	9.5–12.5	0.7–1.7
Serum half-life (days) <sup>a</sup>	6	3	2.5	23	5

Tableau 1 - Caractéristiques des différents isotypes d'immunoglobulines humaines.

Les domaines variables (V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub>) possèdent des zones appelées CDR (*complementary determining regions*) pour régions déterminantes de complémentarités. La grande variabilité des CDR en acides aminés d'un anticorps à l'autre lui confère sa spécificité vis-à-vis d'un antigène donné. On parle également de régions hypervariables séparées par des séquences d'acides aminés relativement conservées, l'armature. Ce sont également les sites d'interactions entre l'anticorps et l'antigène. Cette interaction est la reconnaissance d'un épitope ou déterminant antigénique par l'anticorps. Les travaux d'élucidation de la structure des Ig ont permis de définir différents fragments d'Ig : le fragment Fab obtenu après digestion par la papaïne ou F(ab)<sub>2</sub> après digestion par la pepsine. Le fragment scFv est lui obtenu par biologie moléculaire uniquement. Les anticorps sont dits polyclonaux lorsqu'ils reconnaissent plusieurs épitopes d'un même antigène. A l'inverse, lorsqu'ils sont

spécifiques d'un seul épitope, on parle d'anticorps monoclonaux. A l'autre extrémité de l'anticorps sont situés, au niveau du fragment Fc, les sites d'interaction avec les cellules effectrices du système immunitaire par le biais de récepteurs appelés FcR. Ils sont constitués des domaines constants des chaînes lourdes (CH) dont le nombre varie en fonction des isotypes de l'immunoglobuline.

La réponse immunitaire dite humorale est initiée en présence d'un antigène. Ceci induit la sélection et l'activation des lymphocytes B (cellules immunitaires) et leur prolifération. Ces lymphocytes, une fois différenciés sous forme de plasmocytes, produisent les anticorps et se distribuent dans le plasma, les liquides extravasculaires et les sécrétions. *In vivo* la réponse immunitaire chez les individus sains est polyclonale. En effet, les Ig produites sont hétérogènes et issues de multiples clones plasmocytaires. Cette multiplicité est due aux modifications génétiques : la recombinaison V(D)J des différents gènes codants pour les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères ; l'hyperstimulation somatique induisant des modifications dans les zones hypervariables (CDR) des domaines variables ; suivie de la commutation isotypique au niveau des fragments Fc (domaines constants) des IgM en IgG, A ou E pouvant être médiée par les cytokines produites au cours de la réponse immune. L'hétérogénéité des Ig polyclonales s'oppose à l'homogénéité des Ig monoclonales, qui possèdent toutes les mêmes chaînes lourde et légère, les mêmes déterminants idiotypiques, la même spécificité vis-à-vis d'un anticorps. Certaines pathologies comme les gammopathies monoclonales sont associées à la production d'Ig monoclonales. Elles peuvent être dues à une prolifération anormale d'un clone de plasmocytes malin : myélome multiple, maladie de Waldenström ou de lymphocytes matures pour certains lymphomes malins (leucémie lymphoïde chronique, lymphome non hodgkinien). Certaines gammopathies monoclonales sont bénignes, dites de signification indéterminée (MGUS) ou survenant lors d'autres pathologies : cirrhoses, maladies auto-immunes. Elles peuvent induire la sécrétion d'Ig monoclonale. La vaccination, par l'inoculation d'antigène peut induire également la production d'Ig monoclonale.

## Développement, croissance et intérêt des immunoglobulines monoclonales

Depuis l'approbation en 1986 par la US FDA (*United States Food and Drug Administration*) du premier anticorps monoclonal (mAb) thérapeutique, le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3), un mAb d'origine murine utilisé dans le rejet de greffe rénale, le nombre de mAbs produits par les laboratoires pharmaceutiques augmente d'année en année (Figure 3). En 2019, plus des 570 mAbs thérapeutiques ont été inclus dans les différentes phases d'essai clinique (17). Cent-un mAbs thérapeutiques ont été approuvés par l'US FDA et/ou l'EMA (*European medicines agency*) dont 9 entre le 1er Janvier et le 09 Novembre 2020 (source à mettre à jour au dernier moment). Seize autres mAb thérapeutiques sont en cours de révision pour approbation (18). L'utilisation croissante de cette classe médicamenteuse est telle que depuis les cinq dernières années, les mAbs thérapeutiques dominent le marché pharmaceutique, notamment en termes de vente et de revenus. L'estimation de l'ampleur du marché en 2014, d'un point de vue monétaire, a été dépassée de près de 20%, représentant 150 milliards de dollars de vente en 2019 (19,20).

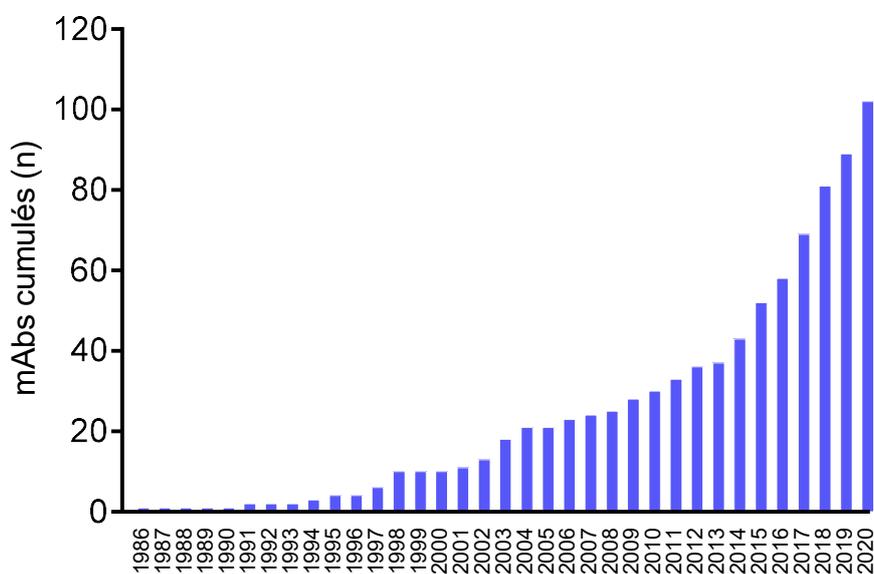


Figure 3 - Evolution du nombre de mAbs thérapeutique depuis 1986 – *Estimation du nombre de mAbs incluant les anticorps actuellement en révision réglementaire par les organismes compétents pour l'année 2020 (US FDA et EMA) (n=13) selon <http://antibodysociety.org> (18)*

Cet essor est dû à différentes techniques d'ingénierie également évolutives au cours du temps. En 1975, Georges Köhler et César Milstein ont permis, grâce aux

hybridomes, de produire *in vitro* des anticorps murins dirigés contre un antigène bien spécifique (21). Ces hybridomes sont issus de la fusion de cellules lymphoïdes murines (lymphoblastes B) productrices d'un anticorps d'intérêt (par immunisation du modèle murin) avec des cellules myélomateuses ayant une capacité de reproduction infinie, dans un milieu de culture spécifique HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine).

Malgré un faible coût et une rapidité de production, les mAbs thérapeutiques d'origine murine (terminologie –momab) présentent différents inconvénients. Une capacité réduite de recrutement des fonctions effectrices via le fragment Fc murin et la mise en évidence de la production d'anticorps humains anti-souris (HAMA pour *human anti-mouse antibodies*) réduisent sa demi-vie et son efficacité thérapeutique et sont parfois responsables d'évènements indésirables (rash cutané, réaction inflammatoire systémique), facteurs limitants dans le développement d'un médicament lors des essais cliniques. Malgré cela, certains mAbs thérapeutiques produits aujourd'hui sont toujours d'origine murine. L'Inolimomab, anti-CD25 en essai clinique de phase 3 dans le traitement des GVH (graft-versus-host) aigus réfractaires aux stéroïdes (22), en est un exemple.

Cependant, les techniques de l'ADN recombinant et de transfection ont considérablement augmenté le potentiel des hybridomes, en permettant la production d'anticorps chimériques (terminologie –ximab) et humanisées (terminologie –zumab). Les anticorps monoclonaux chimériques sont ainsi obtenus dès 1980 en combinant les gènes des régions variables d'Ig murine, présentant des sites antigéniques d'intérêts et synthétisés par les hybridomes, et les gènes de régions constantes d'Ig humaine (23,24). Cette technique d'ingénierie, ou génie génétique, a permis l'autorisation de mise sur le marché (AMM) du premier anticorps chimérique, l'abciximab (Réopro®) anti-GpIIb/IIIa en 1994 indiqué pour ses propriétés d'inhibition de l'agrégation plaquettaire (25) et le rituximab (MabThera®) anti-CD20 indiqué dans le traitement du lymphome non hodgikien en 1997 (26). En utilisant des fragments Fc d'Ig humaine, les anticorps chimériques ont permis d'améliorer l'efficacité des mAbs, vis-à-vis des cellules effectrices du système immunitaire et leur tolérance en diminuant leur immunogénicité. Toutefois, ils ne sont pas totalement exempts de la production d'anticorps anti-médicament (ADA pour *anti-drug antibody*) (27).

Les mêmes techniques d'ADN recombinant permettent le développement dès 1988 des mAbs humanisés où seules les séquences codant pour les CDRs des chaînes légères et lourdes, d'origine murine sont combinées à l'Ig humaine, on parle alors de CDR-grafting (28–30). Ils diminuent, de surcroît, le potentiel immunogène avec une incidence plus faible d'apparition d'ADA (27). Le premier mAb thérapeutique humanisé obtient l'AMM par l'US FDA en 1997 pour le Daclizumab, qui se lie au récepteur IL-2 et est indiqué dans la prévention du rejet de greffe. D'autres techniques d'ingénierie ont vu naître les anticorps monoclonaux entièrement humains : le *phage display* (31), l'utilisation de souris transgéniques (32). Bien que ces techniques aient été décrites dans les années 90, leurs applications dans le développement de mAbs thérapeutiques a permis la mise sur le marché de mAbs encore très utilisés aujourd'hui : l'Adalimumab Humira®, anti-TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*), indiqué, entre autres, dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde en 2002 (33) comme huit autres mAbs obtenus par *phage display*. Le Panitumumab VECTIBIX®, anti-EGFR (*Endothelial Growth Factor Receptor*), indiqué dans le cancer colorectal métastatique en 2006 (34) a lui été obtenu à partir de souris transgéniques. Le *phage display*, en utilisant la recombinaison de l'ADN, consiste à fusionner un peptide d'intérêt à une protéine d'enveloppe (pIII) du bactériophage M13, majoritairement utilisé, en exprimant à la surface des filaments du bactériophage le peptide d'intérêt. Ceci permet ainsi d'étudier les interactions entre les protéines et dans le cas précis des mAbs d'identifier les épitopes correspondants à une séquence peptidique ou un fragment d'anticorps d'intérêt (Fab ou scFv pour *single chain Fragment variable* d'un anticorps). La constitution de librairie de phages spécifiques de séquences ou fragments d'intérêts peut permettre l'identification d'anticorps, utilisés pour la réalisation de vaccin, pour le *design* d'un mAb thérapeutique ou pour la production de mAbs utilisés pour le diagnostic (35,36). Enfin, la production des mAbs complètement humains a été marquée par l'utilisation des cellules mononuclées du sang périphérique, PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*). Il s'agit d'extraire et d'amplifier les régions VH et VL d'anticorps directement produits par l'homme, secondairement à une infection par exemple. Quelques exemples laissent entrevoir son potentiel : anticorps augmentant la phagocytose dans les candidoses systémiques (37) ou mise en évidence d'un anticorps neutralisant de la dengue (38). En octobre 2020, la FDA a approuvé l'utilisation d'une trithérapie monoclonale, obtenue par *single B cell technology*

(atoltivimab/ maftivimab/ odesivimab), dans le traitement de l'infection par le virus Ebola (39). L'utilisation des PBMCs et de la technique *phage display* ont un réel intérêt dans le développement des mAbs dirigés contre les pathogènes émergents. La réponse immunitaire induite suite à une infection est très spécifique et robuste. C'est également ce qu'on observe aujourd'hui, avec une recherche intense, tant dans le développement d'outil diagnostique d'infection à SARS-Cov2 (40) mais également la bataille livrée dans la découverte d'un traitement efficace chez patients atteints de la COVID-19 ou sur le développement d'un vaccin. En date du 7 octobre 2020, les sociétés Eli Lilly and Compagny et Regeneron ont annoncé avoir soumis des demandes à la FDA pour des autorisations d'utilisation d'urgence de leurs anticorps monoclonaux anti-SRAS-CoV-2 sur la base de leurs essais cliniques (41,42).

L'utilisation, voire la combinaison, de ces différentes techniques d'ingénierie (hybridome, *phage display*, *CDR-grafting*) a permis le développement de mAbs thérapeutiques dits bispécifiques, présentant une affinité pour deux antigènes simultanément. Le premier mAb thérapeutique bispécifique approuvé par l'EMA en 2009 puis retiré du marché en 2017 est le Catumaxomab (Revomab®), indiqué dans le traitement de tumeurs solides. Depuis, seulement deux autres mAb bispécifiques ont été approuvés dont l'anticorps monoclonal thérapeutique faisant l'objet de ce mémoire, l'Emicizumab (Hemlibra®) indiqué dans la prophylaxie des hémorragies chez les patients atteint d'hémophilie A (5,10) en mimant la fonction coagulante du facteur VIII en se liant au facteur IX activé et au facteur X (Figure 4).

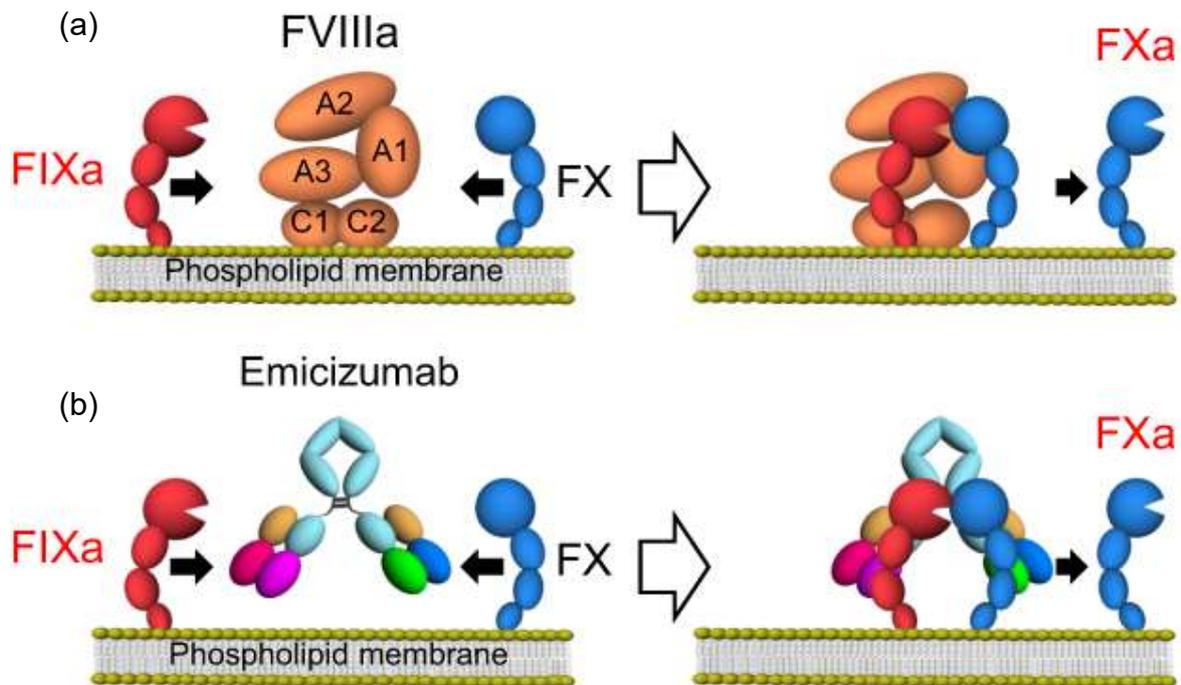


Figure 4 – Illustration schématique du mode d'action de l'Emicizumab – *Interaction du FVIIIa (A) ou de l'Emicizumab (B) avec le facteur IX activé et facteur X (43)*

Les anticorps monoclonaux sont aussi largement utilisés, *in vitro* dans les LBM. En effet, de nombreux examens de biologie médicale (EBM) utilisent le principe de formation des complexes immuns anticorps-antigènes et la spécificité d'anticorps monoclonaux pour la détection ou la quantification des marqueurs biologiques de nombreuses pathologies. L'interaction Ag-Ac est révélée par l'intermédiaire d'un composé marqué (atome, molécule enzymatique, ion). Les méthodes de marquages les plus répandues sont : le marquage radioactif, technique RIA (*radio immuno-assay*) ; le marquage enzymatique : technique EIA (*enzyme immuno-assay*), avec de nombreuses applications en biochimie, les ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ; ou le marquage luminescent (technique CLIA *chimioluminescence immuno-assay*). Il existe également des techniques immuno-chromatographiques (ICT *immuno-chromatographic tests*). Ces tests dits de diagnostic rapide (TDR) sont utilisés par exemple pour la recherche d'Ag de *Plasmodium sp*, ou le test de grossesse détectant la  $\beta$ -hCG (hormone chorio-gonadotrophique humaine). Les techniques immunoblot (western blot) utilisent également les Ig monoclonales : par exemple dans l'analyse de confirmation du sérodiagnostic de dépistage d'infection

au VIH (virus de l'immunodéficience humaine). Citons également les techniques d'hémagglutination utilisées en immuno-hématologie pour la réalisation des groupes sanguins ou la recherche d'agglutinines irrégulières (test de coombs indirect). Cette description reste non exhaustive tant l'utilisation des anticorps monoclonaux dans le diagnostic biologique est considérable et retrouvée dans toutes les disciplines de la biologie.

### **Aspects pharmacodynamiques et pharmacocinétiques**

La pharmacodynamie se définit par l'effet d'un médicament sur une cible dans l'organisme. Dans le cas des mAbs thérapeutiques, bien qu'il s'agisse toujours d'une interaction entre l'anticorps et son ou ses antigène(s) cible(s), leurs modes d'actions sont variables et liés à la pathogénicité des maladies que ce soit en traitement préventif ou curatif. On distingue grossièrement deux catégories. Les anticorps « nus » qui vont agir sur la cible, une protéine plasmique par exemple, pour bloquer précisément les mécanismes physiopathologiques responsables d'une maladie. A titre d'exemple, l'Infliximab (Remicade®) bloque le TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosing Factor*), une cytokine pro-inflammatoire, indiqué dans la prise en charge de la maladie de Crohn, maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Dans le cas de la prise en charge de certains cancers, les mAbs thérapeutiques, ciblent les médiateurs ou les récepteurs membranaires, par exemple : le Trastuzumab Herceptin® dans le cancer du sein cible HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*), le Rituximab Mabthera® dans le lymphome non hodgkinien ciblant le médiateur transmembranaire CD-20. Leurs modes d'action découlent d'une réaction immunitaire de type cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (*ADCC antibody-dependant cellular cytotoxicity*), dépendante du complément (*CDC complement dependant cytotoxicity*) ou une apoptose des cellules cancéreuses pour limiter la progression de la maladie. Les anticorps « nus » représentent la majorité des mAbs à visée thérapeutique approuvés à ce jour. La seconde catégorie, ce sont les mAbs conjugués : à un médicament (*ADC antibody drug conjugate*), à un radionucléide, les immunoliposomes, les bispécifiques ou encore les *CAR-T cells* (*chimeric antigen receptor T cell*). Chacun de ces types d'anticorps spécifiques présent un adduit susceptible d'augmenter le bénéfice du traitement. Le développement des mAbs conjugués est encore anecdotique compte-tenu de leur caractère innovant, d'autant

qu'ils combinent souvent plusieurs des techniques d'ingénierie évoquées précédemment.

La pharmacocinétique se définit quant à elle par le devenir du médicament dans l'organisme. Concernant les aspects pharmacocinétiques (PK) des anticorps monoclonaux, l'absorption par voie gastro-intestinale est impossible compte tenu de la taille de la molécule. Elle peut néanmoins être envisagée pour une action locale. Ils sont généralement administrés à dose fixe ou en fonction du poids par voie intraveineuse et plus rarement par voie intramusculaire, intravitréenne (Infliximab) ou sous-cutanée (Elicizumab). La distribution tissulaire des anticorps monoclonaux est relativement faible compte tenu de leur poids moléculaire élevé et de leur caractère hydrophilie. La diffusion tissulaire fait intervenir principalement un mécanisme d'endocytose médiés par un récepteur au fragment Fc (FcRn). Cette diffusion est dépendante de la vascularisation, du site de liaison à l'antigène, de l'affinité de l'anticorps pour l'antigène ainsi que de la masse antigénique, liées indirectement à la physiopathologie des maladies à traiter. L'élimination par catabolisme des mAbs est assurée par protéolyse lysosomale dans les cellules du système immunitaire via un sous type de récepteurs Fc (FcγR). La clairance des anticorps peut être toutefois régulée par l'interaction avec les récepteurs FcRns exprimés sur les cellules phagocytaires, protégeant ainsi les Ig d'une clairance rapide (44). L'élimination des mAbs peut être médiée par son mode d'action après fixation à sa cible, on parle d'élimination cible dépendante (*target-mediated drug disposition*). De nombreux facteurs, comme la liaison à des auto-anticorps anti-médicaments, la variabilité de la masse antigénique dépendante de la pathologie sont susceptibles d'influencer la PK des mAbs et peuvent induire une variabilité inter-individuelle de leur diffusion dans l'organisme, de leur catabolisme ou encore de leur élimination, conduisant en définitive à une variabilité de l'efficacité des anticorps monoclonaux d'un individu à l'autre.

### **Dosage plasmatique des anticorps monoclonaux thérapeutiques**

Le dosage des mAbs et des médicaments en général, est un prérequis essentiel dans l'évaluation de leur efficacité et de leur tolérance dès les études de PK/PD effectuées lors des essais cliniques de phase I et II. Ces essais sont précédés de la phase pré-clinique qui détermine, le mode d'action, l'efficacité *in vitro*

et chez l'animal, *in vivo*, du médicament en définissant la dose sans effet (NOEL *non observe effect level*) et la dose sans effet indésirable (NOAEL *non observe adverse effect level*). Elle est complétée par des études de toxicité aiguë, chronique, de reprotoxicité, de mutagénèse et de cancérogénèse. Ces essais sont d'ailleurs obligatoires, conformément à la réglementation européenne (REACH *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*) et aux directives des agences françaises : l'ANSM, agence française de sécurité du médicament et l'ANSES, agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail, pour tout xénobiotique, à travers une évaluation des risques rigoureuse. Cette évaluation de l'efficacité et de la tolérance chez l'homme constitue la phase I, réalisée à partir de petits effectifs de volontaires sains. Les données de PK du médicament sont collectées au décours de ces essais. L'évaluation de la relation effet-dose, l'intervalle thérapeutique et la posologie optimale sont déterminés lors des essais de phase II (études pilote) et III (étude pivot), effectués sur populations éligibles, concernées par l'AMM du médicament. L'essai de phase III permet également d'évaluer la supériorité du traitement par rapport à un traitement de référence ou face à un placebo. Dans l'ensemble du processus, les arguments cliniques du bénéfice apporté par un médicament à l'essai sont associés aux données biologiques de PK/PD et aux dosages plasmatiques du médicament quelle que soit la méthodologie employée. En ce qui concerne les mAbs ces méthodologies de dosage ont évoluées.

### **Immunodosage**

A l'heure actuelle, les techniques les plus utilisées pour identifier et quantifier les mAbs sont des méthodes de dosage immunologique de type ELISA par exemple. Comme exposé dans un précédent chapitre, ces méthodologies sont employées également pour le dosage de nombreux marqueurs biologiques plasmatiques ou présents dans d'autres échantillons de nature humaine : urine, liquide céphalo-rachidien... L'analyte d'intérêt n'est cependant pas l'antigène ciblé par l'anticorps monoclonal spécifique, comme il serait le cas dans le dosage de la procalcitonine ou du PSA (antigène prostatique spécifique), mais l'anticorps monoclonal lui-même détecté après interaction avec son antigène spécifique. L'identification, la quantification des mAbs font intervenir un composé marqué qui permet, à l'issue de la technique utilisée, de l'identifier ou de le doser sur la base d'une relation linéaire

entre le signal émis par le marquage et la concentration de l'analyte. Dans le cas des mAbs, il s'agit en majorité d'un marquage enzymatique et de techniques ELISA. Ces techniques ont été largement employées dans le dosage des mAbs, dès le lancement des essais cliniques de phase I de leur développement. Quelques exemples mettent en exergue, pour plusieurs mAbs développés au cours des deux précédentes décennies, l'utilisation des techniques ELISA dans leurs études PK : Rituximab (26), Bévacizumab (45), Natalizumab (46) et certains plus récents comme l'Emicizumab (47) ou mAb114, en évaluation dans le traitement de l'infection par le virus Ebola (48). Cette technique permet d'établir les profils PK des mAbs à l'étude grâce à une très bonne sensibilité, une simplicité de mise en œuvre avec des outils d'analyse à haut débit. Toutefois, il n'est pas rare d'observer des interférences analytiques avec d'autres protéines plasmatiques, des interférences liées à la matrice avec un risque de surestimation ou de sous-estimation de l'anticorps à doser ou de réactions croisées avec les immunoglobulines endogènes (49). La pratique a pu démontrer que l'administration d'anticorps monoclonaux est parfois associée à la production *in vivo* d'auto-anticorps dirigés contre le médicament, ce sont les ADAs. Comme décrit précédemment, en fonction de la nature de l'anticorps (murin, chimérique, humanisé ou humain), le potentiel immunogène, significativement amélioré avec les différentes techniques d'ingénierie des mAbs, est variable (27). La production de ces ADAs peut être associée à des interférences importantes lors de l'utilisation des immunodosages ou à un risque d'inefficacité du traitement, parfois conduisant à l'apparition d'effets indésirables, si bien que cette immunogénicité doit être évaluée durant les essais pré-cliniques et cliniques. Ils sont détectés à des taux très faibles avec parfois un réel questionnement sur la relevance clinique de leur présence (50). Les agences américaine FDA et européenne EMA propose, par ailleurs, des recommandations adressées aux industriels pharmaceutiques concernant le développement et la validation des examens de détection des ADA (51,52). En routine hospitalière, les immunodosages sont pour l'instant utilisés pour le suivi du traitement de certaines maladies auto-immunes (arthrites rhumatoïdes, maladie de Crohn, spondylarthrite ankylosante) traitées par les mAbs anti-inflammatoires, les anti-TNF $\alpha$  et la surveillance de l'apparition d'ADAs.

## Dosage par spectrométrie de masse en tandem MS/MS

### Avènement de la protéomique

Le terme « protéomique » a été employé pour la première fois en 1997 par Peter James (53) et désigne l'étude fonctionnelle ou structurale d'un ensemble de protéines exprimées dans un système biologique, soit une cellule ou un tissu. Elle a fait l'objet du prix Nobel de Chimie de 2002 décerné à l'américain John B. Fenn (Virginia Commonwealth University, Richmond, USA) et au japonais Koichi Tanaka (Shimadzu Corp., Kyoto, Japon) pour le développement de la technologie utile à l'analyse des protéines, la spectrométrie de masse (MS). La protéomique complète la notion de génomique et a pour objectif d'améliorer la compréhension des processus physiopathologiques, leurs associations à des symptômes, la description, l'identification de marqueurs biologiques diagnostiques ou pronostiques (54,55). Finalement, c'est avec cette approche issue de l'analyse protéomique par MS que sont apparus les dosages sanguins des médicaments de nature protéique comme les mAbs. La protéomique est un domaine à part entière, pour lequel de multiples méthodologies, techniques, outils analytiques sont employés (56). Pour le dosage des mAbs, elles se basent toutes sur l'analyse non pas de la protéine entière (environ 1000 AA) mais de peptides spécifiques de la protéine d'intérêt obtenus après protéolyse par la trypsine et de taille plus restreinte (inférieurs à 50 AA).

### Digestion protéique ou protéolyse

La trypsine est une endopeptidase, synthétisée par le pancréas, ayant la particularité de lyser les protéines après les acides aminés Lysine (L) et Arginine (R). Le poids moléculaire des immunoglobulines monoclonales avoisine les 150 000 Da, elles ne peuvent pas être analysées par MS sans cette étape préalable de digestion protéique ou protéolyse *in vitro*. L'étape de digestion protéique nécessite deux étapes au préalable : la dénaturation par réduction à chaud des ponts disulfures permettant de casser la structure tertiaire (chaotrope) de la protéine, à l'aide d'agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) ou la tris-(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP). L'emploi de l'urée à concentration très élevée, jouant le rôle d'agent chaotropique, peut parfois y être associé. La seconde étape est l'alkylation des résidus Cystéine (C) laissés libre après cassure des ponts disulfure. Elle est réalisée

par l'iodoacétamide (IAA), permettant en quelque sorte de stabiliser la dénaturation de la protéine. La trypsine agit afin de cliver les protéines en peptides.

### Simplification de l'échantillon biologique

La concentration en protéines totales dans le plasma est généralement comprise entre 60 et 80 g/L avec près de 230 protéines susceptibles de générer après protéolyse pas moins de 10 000 peptides (57). Ce milieu devient alors particulièrement complexe même dans le cas d'une analyse par spectrométrie de masse. Il est donc indispensable de procéder à une simplification de l'échantillon. Cette étape de simplification est réalisée en routine dans les laboratoires de pharmacologie par une technique simple d'extraction par précipitation des protéines en utilisant généralement un solvant comme l'acétonitrile (ACN) ou le méthanol. Elle n'est cependant pas adaptée à l'analyse des mAbs qui seraient également précipités. Les kits de déplétion des protéines majoritaires dans le sang ne sont pas adaptés non plus puisqu'ils extraient les immunoglobulines, abondantes dans le milieu sanguin ou en utilisant les kits qui soustraient uniquement l'albumine. Les méthodes de purification par la protéine A/G sont les plus utilisées pour ce type d'analyse. Ce sont des protéines d'origine microbienne qui se lient au fragment Fc des Ig de mammifères, particulièrement les Ig humaines avec une haute spécificité. L'utilisation des protéines A ou G est dictée par l'isotype de l'anticorps, en effet seule une différence d'affinité envers l'isotype IgG3 existe entre les deux protéines, la protéine A étant moins affine que la protéine G.

### Identification *in silico* des peptides

Pour l'analyse quantitative des peptides, la complexité de l'échantillon après digestion par la trypsine impose néanmoins certaines dispositions préalables avant la phase analytique en MS à proprement parler. En effet, des outils bio-informatiques et une analyse *in silico* sont indispensables pour identifier le(s) peptide(s) spécifique(s) du médicament à doser. Certains programmes permettent de prédire les peptides qui seront générés par simulation de la digestion protéique. Ces outils sont généralement disponibles gratuitement sur internet, comme le site [https://web.expasy.org/peptide\\_mass/](https://web.expasy.org/peptide_mass/) (58), ou le site <http://prospector.ucsf.edu> MS-Digest, (59). Par ailleurs, la digestion simultanée d'une concentration importante d'IgG endogènes contenues dans l'échantillon sanguin génère une multitude d'autres

peptides avec une probabilité de similitude de séquence peptidique importante. Un algorithme de prédiction par alignement de séquence BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) recherche les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences d'acides aminés : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. A chaque alignement sont attribuées deux valeurs informatives sur la qualité de l'alignement : le score S et le E-Value. Le score S est une valeur numérique normalisée, il est exprimé en bits et permet de mesurer la similitude entre une séquence d'intérêt, spécifique du mAb à doser et les séquences peptidiques des protéines connues de l'Homme, répertoriées dans les bases de données comme UniProt : plus sa valeur est élevée, plus les 2 séquences sont homologues. Le E-Value est le nombre d'alignements différents que l'on peut espérer trouver dans les banques avec un score supérieur ou égal au score S. Plus le E-value est faible plus l'alignement est significatif et donc la séquence d'intérêt peu spécifique. Cet outil permet de sélectionner parmi les peptides spécifiques préalablement identifiés, ceux présentant le moins de similitudes avec d'autres peptides issus de la protéolyse de l'échantillon sanguin.

### Instrumentation

Ne s'agissant pas de faire un exposé détaillé de l'instrumentation, il ne sera présenté ici que les principes généraux du système utilisé pour le développement, l'identification et la quantification des mAbs. La spectrométrie de masse (MS) est un outil de détection des molécules utilisant la masse d'un analyte d'intérêt comme principal critère de spécificité. Plus particulièrement son rapport « masse sur charge » ( $m/z$ ). En plus de sa grande spécificité, faisant parfois défaut aux immunodosages, elle présente également l'avantage de pouvoir analyser simultanément un nombre important de composés. La MS est très largement utilisée dans les laboratoires de pharmacologie, toxicologie (clinique ou environnementale) et de biochimie spécialisée pour le dosage des petites molécules, de nombreuses classes médicamenteuses et de divers toxiques, des composés organiques, des solvants volatiles, des métaux ou encore des acides gras. Elle est aussi utilisée en bactériologie pour l'identification de colonies bactériennes. En fonction de ses applications, la MS peut être couplée à une technique séparative de chromatographie liquide ou gazeuse.

La chromatographie liquide haute performance (HPLC ou UPLC) est une technique séparative qui se base sur les propriétés physico-chimiques intrinsèques des molécules à doser. Dans un système dit en phase inverse, les molécules sont séparées grâce à une colonne chromatographique en fonction de leur polarité. Cette séparation résulte d'un équilibre entre la phase stationnaire apolaire (dans la colonne de chromatographie), présentant une affinité avec les molécules à doser et la phase mobile composée d'un ou plusieurs solvants polaires. En jouant sur le gradient de la phase mobile, les molécules sont progressivement éluées en fonction de leur polarité et de leur affinité pour la phase stationnaire. Bien que la MS présente une grande spécificité, l'utilisation de l'UPLC est essentielle pour l'analyse d'échantillons sanguins complexes, composés de protéines en concentrations importantes.

Un spectromètre de masse se compose de trois parties distinctes : la source, un ou plusieurs analyseur(s) et le détecteur. On distingue deux principaux modes d'acquisition : simple et en tandem (MS/MS) qui se différencie par une étape de fragmentation supplémentaire de l'analyte d'intérêt en MS/MS (Figure 5).

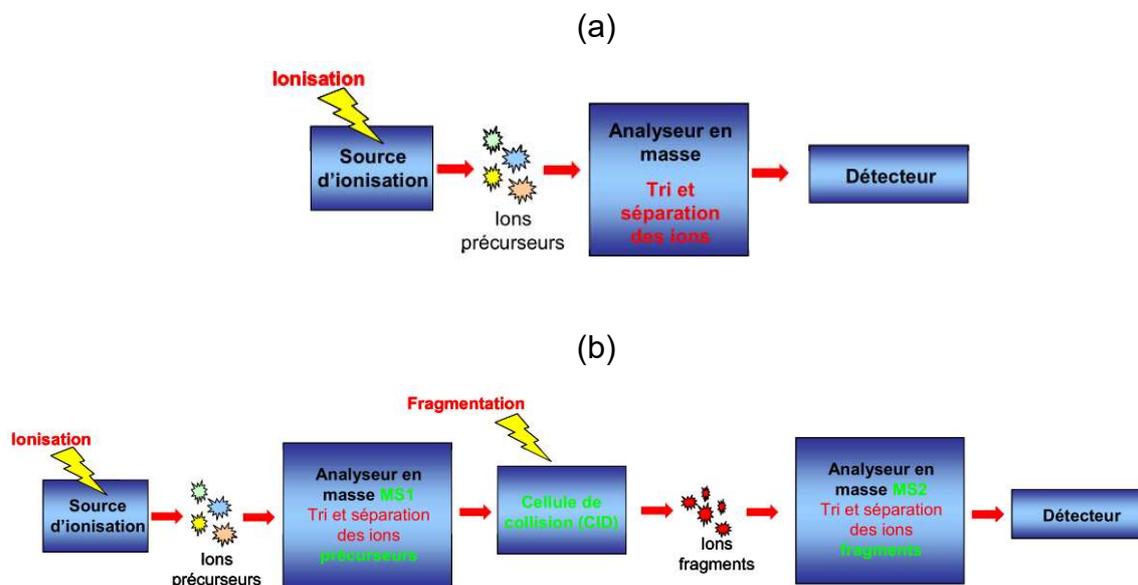


Figure 5 – Représentation schématique du principe de la spectrométrie de masse conventionnelle. (a) Selon un mode d'acquisition simple. (b) Selon un mode d'acquisition en tandem (MS/MS).

Le point de départ de la détection par MS est une ionisation de l'analyte d'intérêt dans la source, dite d'ionisation, dont il en existe différentes variantes. La source d'ionisation utilisée en routine pour le dosage des médicaments et toxiques au sein

du laboratoire de pharmacologie / toxicologie est l'*Electrospray Ionization* (ESI). L'ionisation se fait par l'application d'une différence de potentiel importante (1 à 5 kV) créant ainsi un champ électrique au niveau du cône où est véhiculé l'analyte d'intérêt par la phase mobile du système UPLC couplé. En fonction du mode d'ionisation, positif ou négatif, les espèces ainsi chargées positivement se repoussent (phénomène électrophorétique) et se dispersent. Un gaz inerte de nébulisation, généralement l'azote, contribue à créer un spray (Figure 6). A ce stade, l'intervention de ce gaz de séchage à contre-courant permet de soustraire par évaporation le solvant résiduel et toujours selon le principe de répulsions des charges, conduit à créer des ions unimoléculaires en phase gazeuse. Les molécules d'intérêt ainsi chargées, ayant un rapport  $m/z$  qui leur est propre, passent dans l'analyseur du spectromètre de masse. A noter qu'en ce qui concerne les molécules de tailles importantes comme les protéines et les peptides, le nombre de charges portées peut être variable dans ce processus de désorption / ionisation.

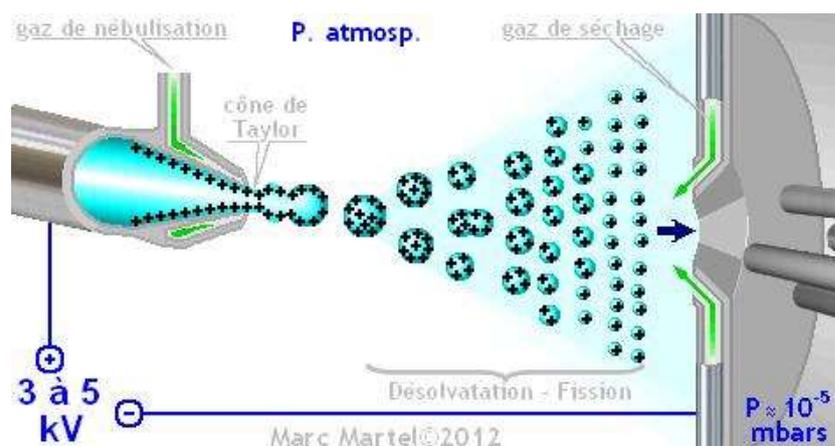


Figure 6 – Représentation schématique du principe d'ionisation par ESI.

Les analyseurs peuvent être de différentes conceptions, leur objectif étant de séparer, faire le tri, en fonction des rapports  $m/z$  des molécules. Nous ne parlerons que des analyseurs à faisceaux d'ions comme le quadripôle (

Figure 7) qui stabilise la trajectoire d'un ion de rapport  $m/z$  défini, sous vide, à travers un champ électrique oscillant décrit par Paul et Steinwedel en 1953. En fonction du paramétrage défini par l'utilisateur l'ion transite à travers le quadripôle où il est expulsé.

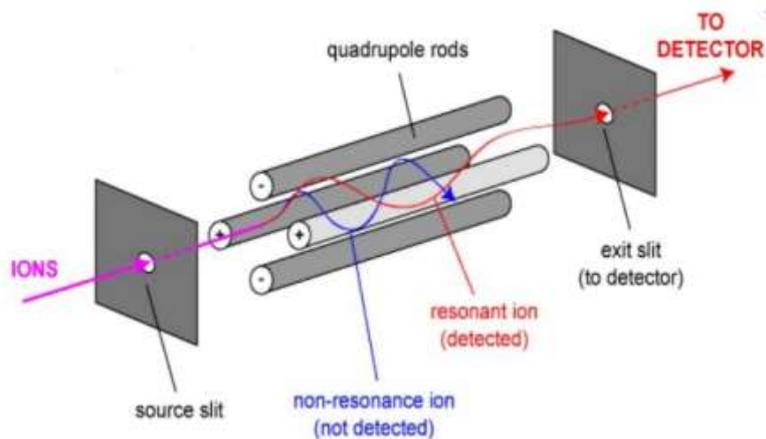


Figure 7 - Représentation schématique d'un analyseur de type quadripolaire.

Dans le cas d'un mode d'acquisition en tandem (MS/MS), les deux quadripôles sont séparés par une cellule de collision. Ces systèmes sont souvent définis comme des triples quadripôles (QqQ). La cellule de collision permet, par l'intermédiaire d'un gaz inerte, ici l'Argon, la fragmentation de l'ion unimoléculaire chargé en fragments de tailles et de masses réduites. C'est ce que l'on nomme la dissociation induite par collision (CID, *collision induced dissociation*). Cette dissociation est spécifique d'un composé, toujours identique à une énergie de collision (CE) précise et abouti à ce que l'on nomme un spectre de masse. Des outils *in silico* permettent, par ailleurs, de comparer les fragments peptidiques obtenus à des banques de données, c'est le *Peptide Fragment Fingerprinting*. L'objectif étant de prédire à partir du spectre de masse obtenu après fragmentation d'un peptide d'intérêt, la protéine correspondante, à l'aide d'algorithmes commerciaux : MASCOT développé par Matrix Science ou SEQUEST développé par ThermoFinnigan. *In fine*, cette fragmentation génère un couple d'ion dit « parent » et d'ion dit « fils » spécifique de la molécule à doser que l'on nomme une transition. Ce système de QqQ est essentiel pour réaliser des acquisitions en MS/MS. A l'issue du passage à travers le QqQ, le détecteur du système MS permet de convertir le signal électrique en intensité, proportionnellement au nombre d'ions détectés lors d'une acquisition simple ou tandem.

Les systèmes QqQ sont des outils de référence pour l'analyse quantitative en MS. La complexité de l'appareil permet de réaliser différents modes d'analyses qui sont complémentaires.

Ce sont les modes de balayage :

- le mode d'analyse le plus simple est le mode *full scan*, permettant de regarder, à un instant  $t$  ou durant toute la phase de séparation chromatographique, l'ensemble des ions unimoléculaires caractérisés par leur rapport  $m/z$  et générés sans faire de tri au niveau du système QqQ.
- le mode *product ion scan* (Figure 8) permet d'identifier, analyser l'intégralité des fragments générés après sélection d'un ion moléculaire chargé d'intérêt dans le premier quadripôle (Q1) et après collision (CID) dans le second quadripôle (q2) sans tri au niveau du troisième quadripôle (Q3).

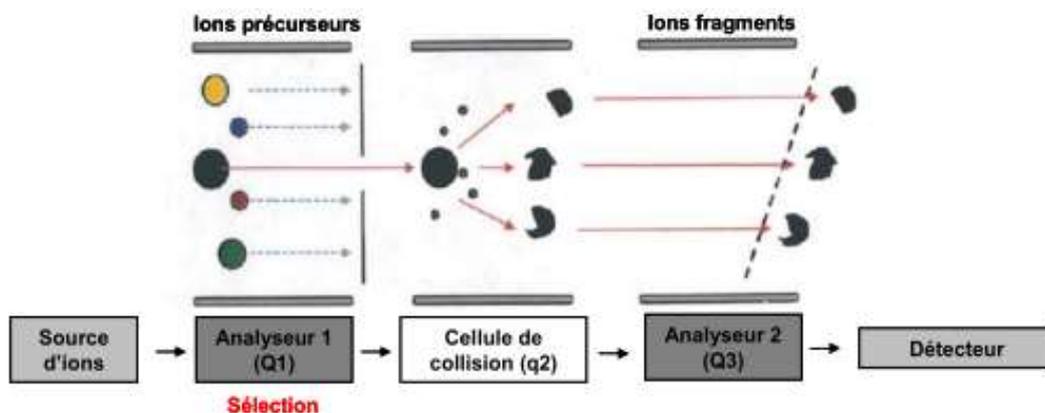


Figure 8 - Représentation schématique du mode d'analyse *Product ion scan* au sein d'un système QqQ.

- le mode de balayage *single reaction monitoring* (SRM) et *multiple reaction monitoring* (MRM) inclut deux étapes de sélection de l'ion moléculaire chargé d'intérêt, dans le Q1 et le Q3 séparés par la phase de CID (Figure 9). Ce mode d'analyse est le mode permettant de détecter une transition (couple ion parent / ion fils) spécifique d'un composé d'intérêt. C'est le mode d'analyse principal de quantification en MS grâce à sa grande spécificité. SRM correspond à l'analyse d'une transition. A partir de deux transitions analysées simultanément on parle de MRM.

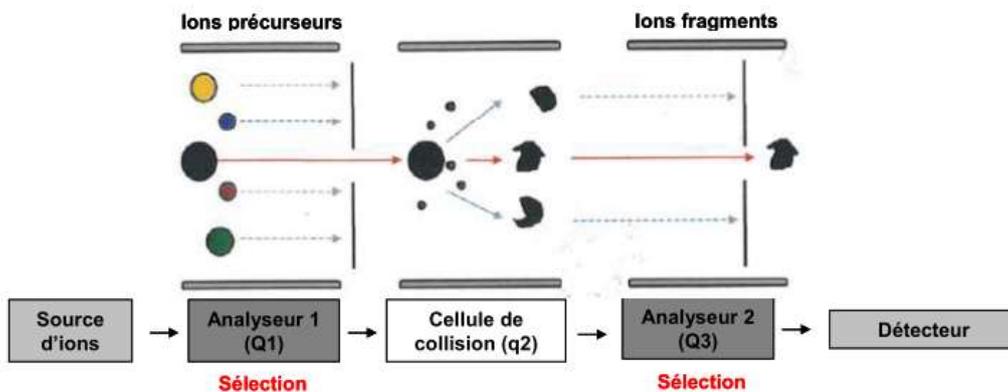


Figure 9 - Représentation schématique du mode d'analyse *single (multiple) reaction monitoring* au sein d'un système QqQ.

## Suivi thérapeutique pharmacologique

A l'issue de l'AMM d'un médicament, l'élargissement des indications thérapeutiques, l'utilisation dans des populations particulières, sur la base de données cliniques, pharmacogénétiques, démographiques peuvent justifier de nouvelles études pour améliorer *in fine* la prise en charge des patients. Le STP s'intègre dans cette logique d'amélioration continue, il est souvent consécutif à la mise en évidence d'une variabilité inter-individuelle.

La relation concentration-efficacité des mAbs anti-inflammatoires a été bien décrite. Les équipes ont montré que la concentration résiduelle en Infliximab dans le traitement des arthrites rhumatoïdes (60) ou de l'Adalimumab dans la prise en charge des rectocolites hémorragiques (61) était associée à une meilleure efficacité clinique. Des observations similaires sont faites dans le traitement du cancer de l'estomac avec le Trastuzumab : une diminution du taux de survie est corrélée à de faibles concentrations en cet anticancéreux (62). Le STP peut contribuer à améliorer ou prédire la réponse au traitement, l'apparition d'une immunogénicité avec des dosages précoces (63). A l'inverse, une susceptibilité des individus plus importante à développer des EI ou un échec au traitement, en regard de la concentration, est aussi un facteur de variabilité pouvant justifier un STP et proposer *a posteriori* une adaptation posologique associée à une rémission clinique ou biologique (64). Autre exemple, le niveau d'exposition au Nivolumab dans le traitement du cancer pulmonaire non à petites cellules n'était pas corrélé à une meilleure survie, voire à l'apparition d'EI, un échappement au traitement et une augmentation de la mortalité (65). Au-delà des données PK/PD déterminées lors des essais cliniques, la variabilité inter-individuelle ou « sous-populationnelle » permet de mettre en exergue l'intérêt du STP dans la prise en charge thérapeutique par anticorps monoclonaux. L'utilisation de la forme totale de mAbs après protéolyse enzymatique est un point essentiel à l'utilisation de la spectrométrie de masse qui s'affranchit des formes liées à l'antigène, aux auto-anticorps ou d'éventuelles interactions avec des composés endogènes. L'utilisation des techniques HPLC-MS/MS semble plus fréquente lors d'essais pré-cliniques ou cliniques (66–68) mais très peu en pratique hospitalière. Quelques équipes françaises proposent néanmoins des méthodes de dosages multiplexes de mAbs en application de STP pour l'Adalimumab (69,70) ou le Bévacizumab (71). Le STP des mAbs est généralement encadré par les

pharmacologues, les biologistes médicaux, à l'initiative d'une équipe médicale et en collaboration avec les médecins des services de soins sur la base de données bibliographiques. Le STP des mAbs est aussi régulièrement associé aux aspects médico-économiques de la prise en charge du patient.

## Validation d'une méthode de dosage : Définition

L'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale a profondément modifié les conditions d'exercice de celle-ci. Elle a rendu notamment obligatoire l'accréditation des LBM, par la norme en vigueur applicable au LBM, NF EN ISO 15189 "Exigences particulières concernant la qualité et la compétence" s'inscrivant dans un système de management de la qualité complet. L'accréditation d'un EBM doit passer par l'expression d'une portée d'accréditation, conforme aux portées-types (SF INF 50 – Révision 06 en Annexe 1) auprès de l'organisme d'accréditation COFRAC (Comité français d'accréditation) accompagné de la liste détaillée des examens à accréditer. Il existe deux catégories de portées :

- la portée flexible standard (A) s'appliquant à la validation des EBM adoptés à partir de méthodes reconnues. C'est l'exemple de l'utilisation de méthodes, équipements et réactifs « fournisseurs ».
- et la portée flexible étendue (B), où le laboratoire est autorisé à réaliser des examens selon des méthodes qu'il a développées, ce qui s'impose dans le cas de notre travail. Ce type de portée est fréquemment utilisé dans les laboratoires de pharmacologie et toxicologie qui ont une certaine flexibilité dans la réalisation de leurs examens : ajout d'un antibiotique dans une méthode existante de dosage des bêta-lactamines par exemple. Ce sont des méthodes de dosage pour lesquelles il n'existe pas d'équivalent commercial validé, ce qui est donc le cas du dosage de l'Emicizumab par UPLC-MS/MS.

Les critères de performance des méthodes de dosages doivent être compatibles avec les références applicables au domaine d'expertise du laboratoire : publications scientifiques, recommandations de sociétés savantes par exemple. L'European Medicines Agency a proposé en 2011 un guide pour la validation d'examen biologique applicable aux examens de pharmacologie et toxicologie (72) et conforme aux exigences du COFRAC exprimées à travers le document SH GTA 04 « Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale ». Les données de validation suivantes sont synthétisées dans le formulaire SH FORM 43. La linéarité (soit la réponse de l'instrument en regard de la concentration) doit être évaluée pour une gamme de concentrations données en accord avec les objectifs de dosage. Le dosage doit avoir

une répétabilité et une fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) satisfaisantes. Critères de performances jugés :

- par la justesse, c'est-à-dire la capacité à obtenir la concentration exacte qui est évaluée par le biais (en %)
- et la précision de mesure, c'est-à-dire la capacité à rendre un résultat identique à chaque analyse exprimée par le coefficient de variation (CV en %).

Tous les critères de performances jugés utiles à la maîtrise de la technique de dosage devront être justifiés et rapportés pour l'accréditation de l'EBM.

En définitive cette étude propose, d'évaluer la faisabilité et la mise en application d'une méthode de dosage de l'Emicizumab passant par plusieurs étapes successives : l'identification *in silico* d'un ou plusieurs peptides d'intérêt(s), l'identification et la validation expérimentale de ceux-ci par spectrométrie de masse, l'évaluation d'une simplification de l'échantillon sanguin, la mise au point d'une méthode de dosage, la validation de celle-ci conformément aux exigences relatives au système de management de la qualité dans le laboratoire de pharmacologie du CHU de Lille. Elle propose également une mise en application avec quelques échantillons plasmatiques de patients hémophiles du service de consultation des maladies hémorragiques du CHU de Lille.

## Matériels et méthodes

### Réactifs

L'Emicizumab (HEMLIBRA® 30mg/mL) produit par Roche GmbH (Grenzach-Wyhlen, Allemagne) a été fourni par la pharmacie centrale du CHU de Lille, reconstitué dans l'eau milliQ (ELGALab Water Purelab Flex 1, High Wycombe, Royaume-Uni). Les immunoglobulines polyvalentes CLAIRYG® 50 mg/mL produit par LFB-Biomédicament (Courtaboeuf, France) ont également été fournies par la pharmacie. Le Dithiotréitol (DTT, 1 M) et l'Iodoacétamide (IAA, ≥99%) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) ont été dilués dans l'eau milliQ à la concentration de 100 mM. La trypsine Gold (de grade MS) provient de Promega Corporation (Madison, WI, USA), reconstituée selon les recommandations du fournisseur avec de l'acide acétique 50mM préparé à partir d'acide acétique 99,9% provenant de VWR Chemicals (Radnor, Pennsylvanie, États-Unis). Les kits de purification des immunoglobulines G, de protéine A (ref 45202 et ref 44667), ainsi que le tampon d'élution « IgG Elution buffer » (ref 1851520), proviennent de ThermoScientific Pierce (Rockford, IL, USA). Les filtres d'ultracentrifugation, 100 KDa (Amicon® Ultra – 0,5mL) ont été achetés auprès de Merck Millipore Ltd (Tullagreen, Carrigtwohill, Co Cork, Irlande). La solution d'azide de sodium est préparée à la concentration de 0,02% dans l'eau milliQ à partir d'une poudre (NaN<sub>3</sub>, ≥99,8%) obtenue auprès de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Le tampon PBS pH 7,2 est réalisé extemporanément à partir de 1,91 g d'hydrogénophosphate disodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ≥99%), 8,5 g de sodium hydrochloride (NaCl, ≥99%) obtenus auprès de VWR International (Leuven, Belgique) et de 0,38 g de dihydrogénophosphate potassique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ≥99%) Panreac quimia SLU (Castellar del Vallès, Espagne) QSP 1 L de tampon ajusté à pH 7,2. Le tampon ammonium (TBA) 100 mM, pH 8,0 est réalisé à partir de poudre de bicarbonate d'ammonium (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, ≥99,5%) obtenue auprès de Fluka Analytical Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) dans l'eau milliQ. L'acide formique (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ≥98%), la poudre Trizma® base (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, ≥99%) proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). L'étalon interne, dit SIL-ECZ (*stable isotope labelled*-ECZ, ≥95%), marqué par un isotope [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N<sub>4</sub>] de l'arginine terminale est synthétisé par le laboratoire BACHEM AG (Bubendorf, Suisse) est dilué dans du DMSO (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, ≥99,9%) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). L'acétonitrile grade UPLC/MS provient de Biosolve Chimie SARL (Dieuze, France).

Le plasma humain est obtenu à partir d'échantillons humains anonymes obtenus auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS, Lille, France) et stocké à -20°C.

## **Méthode LC-MS/MS**

### **Identification *in silico* de peptides spécifiques de l'ECZ**

La première partie de l'analyse *in silico* a nécessité l'utilisation de l'outil bio-informatique ExPASy, [https://web.expasy.org/peptide\\_mass](https://web.expasy.org/peptide_mass) afin d'établir la liste hypothétique des peptides obtenus après digestion de l'Emicizumab par la trypsine. La liste a été produite après insertion de la séquence d'AA des chaînes lourdes et légères de l'Emicizumab, obtenue sur le site <https://go.drugbank.com/drugs/DB13923>, et l'application de certains paramètres : deux clivages manqués (au maximum) par la trypsine, masse maximale d'un peptide plafonnée à 3000 Da et exclusion des résidus cystéine (Cys) présentant un adduit carbamidométhyl-Cys (Cys-CAM) suite au traitement par l'iodoacétamide. La sélection du peptide d'intérêt répond également à certains critères permettant d'assurer une bonne répétabilité, une bonne stabilité dans l'analyse MS (73): taille de peptide supérieure ou égale à 7 AA, absence de résidu Cystéine. Secondairement, la recherche d'alignement de séquence entre les peptides obtenus et les séquences répertoriées dans la base de données UniProtKB\_HUMAN a été réalisée à l'aide de l'outil bio-informatique BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Mise à jour du 20 Décembre 2019). Ceci ayant permis d'évaluer la spécificité théorique de ces peptides. Le choix du peptide a tenu compte des scores de l'outil BLAST. Enfin, l'identification des transitions spécifiques des peptides d'intérêt a été effectuée grâce à l'outil basé sur le principe de fragmentation des peptides induit par CID (74), le *Fragment Ion Calculator* (75). Cet outil permet également de calculer les masses mono-isotopiques en fonction de nombre de charge(s) que porte un peptide à partir d'une séquence peptidique donnée.

### **Préparation des solutions pures : Emicizumab, Clayrig®, SIL-ECZ**

La solution mère d'Emicizumab est obtenue en reconstituant le médicament dans 1 mL d'eau milliQ à la concentration finale de 30 mg/mL, puis diluée successivement aux concentrations de 300, 30 et 3 µg/mL dans l'eau milliQ, puis stockée à +4°C. La solution d'IgIV polyvalentes (Clayrig®) est reconstituée avec de l'eau milliQ à la concentration initiale de 50 mg/mL et stockée à -20°C. La solution

d'étalon interne (SIL-ECZ) est obtenue en solubilisant la poudre de peptide synthétique dans le DMSO à la concentration initiale de 1 mg/mL et stockée à -20°C.

### **Préparation des standards de calibration et des contrôles de qualité**

La gamme de concentration pour la calibration et les contrôles internes de qualité (CQ) ont été définis conformément aux concentrations thérapeutiques efficaces de l'Emicizumab observées (études HAVEN). Des dilutions successives d'un plasma « matrice » surchargé à 240 µg/mL (à partir de la solution mère d'Emicizumab à 30 mg/mL) sont effectuées, afin de définir la gamme de calibration suivante : 12, 30, 60, 120 µg/mL, la limite de linéarité basse (LLOQ) à 3 µg/mL et la limite haute (ULOQ) à 240 µg/mL. Conformément aux recommandations de l'EMA (72), le CQ niveau bas est supérieur à trois fois la LLOQ. De la même manière, à partir d'une solution surchargée à 240 µg/mL, deux niveaux de CQ sont réalisés par dilutions successives : niveau bas (CQB) à 20 µg/mL et niveau haut (CQH) à 80 µg/mL.

### **Préparation des échantillons : purification sur protéine A et digestion protéique**

La capacité de fixation de la résine de protéine A a été évaluée par dosage des isotypes des IgG sur Optilite®, The binding Site Group Ltd (Birmingham, Royaume-Uni). Plusieurs étapes continues permettent de purifier l'échantillon : une prise d'essai de 50 µL d'échantillon (patient, CQ ou standards) est déposée sur la plaque 96—puits contenant une résine de protéine A préalablement conditionnée avec 200 µL de PBS pH 7,2 à trois reprises. Après deux incubations de 30 minutes sous agitation orbitale lente, séparé par l'ajout de 50 µL de PBS dans chaque puit, la plaque est centrifugée 1 minute à 1000g. Trois lavages successifs de 200 µL de PBS sont réalisés. L'éluat de l'échantillon est réalisée à deux reprises par 100 µL de tampon d'éluat IgG Elution buffer (ref 1851520) en laissant incubé, 2 minutes sous agitation orbitale lente, le tampon décrochant alors les Ig de la résine. L'éluat est collecté sur 10 µL de tampon TRIS 1M [concentration finale 50mM]. 200 µL de chaque échantillon sont repris dans un Eppendorf contenant 3 µL de SIL-ECZ à 25 µg/mL et 20 µL de DTT 100 mM (concentration finale proche de 10mM) et chauffés 20 minutes à 55°C sur un banc de chauffe adapté. Après ajout de 25 µL d'IAA (concentration finale 10mM) et incubation 30 minutes à température ambiante à l'abri

de la lumière, 7  $\mu\text{L}$  de trypsine gold 0,1X (ratio 1/60, mol/mol d'Ig) sont ajoutés puis les échantillons restent en incubation à 37°C (12 à 14h). En fin de digestion, les échantillons sont congelés pour stopper la réaction enzymatique avant analyse.

### Conditions pour l'analyse LC-MS/MS

#### Configuration du système de chromatographie liquide (LC)

Le système LC Acquity I-Class PLUS, Waters (Millford, Massachusetts, USA) est un système de pompe binaire (*binary sample manager, BSM*) associé à un passeur d'échantillons (*sample manager*) et à un module de colonnes chromatographiques (*column manager*). Avant injection des échantillons, le système LC est conditionné. Une purge, un rinçage des voies et pompes A et B sur système est effectué par un mélange 50/50 ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ , 0,1% FA). La phase séparative est permise par une colonne de chromatographie Acquity® BEH Peptide, Waters (C18, 300A, 1,7 $\mu\text{m}$ , 2,1x150mm), précédé d'une pré-colonne aux mêmes caractéristiques physico-chimiques. La température de la colonne est maintenue à 50°C pendant toute la phase analytique. Une phase d'équilibrage de la colonne avant analyse des échantillons est réalisée par le passage d'un blanc ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  90/10%). L'élution de la phase mobile polaire est à débit constant de 0,2 mL/min selon le gradient de répartition A/B, entre le solvant A,  $\text{H}_2\text{O}$  0,1% FA et le solvant B ACN 0,1% FA), suivant : 0-1 min : 90/10 ; 1-10 min : 90/10-70/30 ; 10-15min : 70/30-20/80 ; 15-20min : 20/80 ; 20-25min : 20/80-90/10 ; 25-27min : 90/10 (Figure 10).

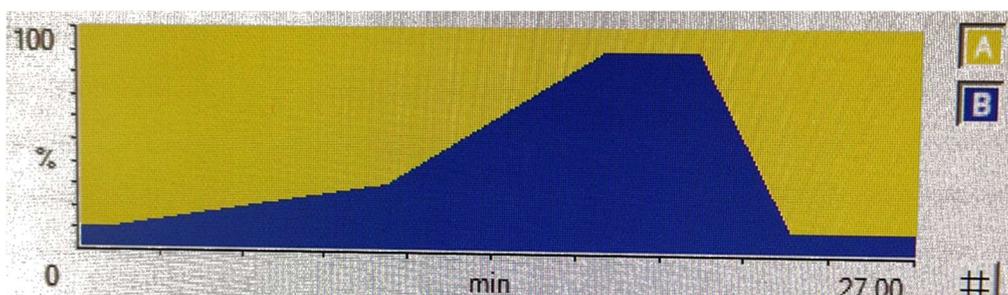


Figure 10 - Evolution du gradient de solvant polaire ( $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ ) dans le système chromatographique en phase inverse assurant l'élution des peptides avant détection au spectromètre de masse.

La séquence est terminée par un blanc pour rinçage de la colonne dans les mêmes conditions que l'équilibrage.

## Configuration du système de spectrométrie de masse

La détection par spectrométrie de masse est faite par le système XEVO™ TQ-XS Tandem quadripôle, Waters (Milford, Massachusetts, USA), équipé d'une source de type ESI (*electrospray ionization*) opérant en mode positif (ES+). Les paramètres de la source sont les suivants : voltage du cône 1000V, température dans l'enceinte 650°C. Différents modes de balayage de l'appareil concourent au développement du dosage : *fullscan* avec recherche des rapports m/z d'intérêts grâce à l'outil « Mass display » intégré au logiciel Masslynx version 4.2 ; le mode de balayage descendant (*product ion scan/ daughter scan*). Différents paramètres de MS ont été utilisés : tension de cône variant entre 20 et 50V et les énergies de collision (q2) variant de 10 à 60eV pour l'optimisation. Le mode de balayage en tandem MRM est utilisé *in fine* pour la quantification des peptides. Les aires de pics sont intégrées grâce au logiciel TargetLynx.

## Identification expérimentale des peptides

Les peptides d'ECZ issus de la protéolyse ont été sélectionnés en confrontant les données *in silico* aux différents modes d'analyse MS. La spécificité des peptides a été évaluée en comparant les spectres de masse obtenus avec un pool d'Ig polyvalentes humaines (Clayrig®).

## **Validation de méthode**

### Linéarité et limite de quantification

Les six standards de calibration ont été définis entre 3 et 240 µg/mL pour l'Emicizumab. La limite de quantification est définie comme la concentration basse de la gamme de linéarité soit 3 µg/mL (LLOQ). Les concentrations sont recalculées à partir de la régression linéaire après application d'un facteur 1/X de pondération du ratio entre l'aire (intégration chromatographique) de l'Emicizumab et aire de l'étalon interne. La linéarité est évaluée par le coefficient de régression ( $r^2$ ) des courbes de calibration (n=6), le coefficient de variation ainsi que l'écart entre les concentrations calculées et les valeurs théoriques (justesse), ces paramètres ne devant pas dépasser 15% (20% pour la LLOQ).

### Répétabilité et fidélité intermédiaire de la méthode analytique

La répétabilité (variabilité intra-journalière) et fidélité intermédiaire (variabilité inter-journalière) sont évaluées sur un nombre de réplicats suffisants (n=6) à partir des CIQ définis (CQB à 20 µg/mL et CQH à 80 µg/mL), selon deux critères de jugement principaux : la précision, calculée via le coefficient de variation (CV exprimé en %) et la justesse (biais), évaluée, à nouveau, par l'écart entre la concentration obtenue et la valeur théorique de CQ (exprimé en %). La fidélité intermédiaire est évaluée en faisant varier au moins une condition : un opérateur ou un jour différent par exemple. Les critères d'acceptabilité des performances analytiques, précision et justesse, sont fixés à 20%.

### Sensibilité et limite de détection

La sensibilité est testée par le passage de dix échantillons de plasma blanc sans Emicizumab contenant l'étalon interne (SIL-ECZ). La limite de détection est calculée comme étant trois fois l'écart type des valeurs de concentration du peptide d'intérêt par passage des plasma blancs (72,76).

### Contamination inter-échantillons

La contamination est évaluée en passant successivement trois échantillons surchargés en ECZ à concentration haute (240 µg/mL) suivi de trois échantillons de concentration correspondant la LLOQ (3 µg/mL).

### **Activité plasmatique de l'Emicizumab**

Le dosage d'activité de l'Emicizumab est réalisé au sein du laboratoire d'hémostase sur des appareils sur STA-R-MAX, Diagnostica Stago (Asnières-sur-Seine, France) sur le principe d'un dosage chromométrique d'une activité FVIII en utilisant un plasma déficient en FVIII et en mesurant le temps de coagulation d'un patient dont l'activité en Emicizumab est inconnue. Les standards et CQ sont obtenus auprès de la société r<sup>2</sup> hemostasis diagnostic (Ghaziabad, Delhi, Inde). La calibration est réalisée à partir de dilutions successives du calibrant reconstitué avec de l'eau milliQ, à la concentration de 99 µg/mL. Les niveaux de contrôle de qualité bas et haut sont respectivement aux concentrations de 26,6 [21,6-31,5] µg/mL et 73,4 [63,7 – 83,1] µg/mL.

### **Echantillons patients et éthique**

Les échantillons patients testés au laboratoire de pharmacologie ont été collectés et stockés à -80°C par le service d'hémostase clinique dans le cadre du projet EMICARE conformément aux prédispositions du dit projet et dans le strict respect des conditions établies par le Comité de Protection des Personnes (CPP). Les prélèvements ont été effectués sur tubes citratés dès l'induction du traitement (cinétique d'inclusion), à un mois d'inclusion dans le projet correspondant à la fin de la dose de charge du traitement par Emicizumab et lors de la visite de fin d'étude ou lors de la survenue d'un évènement hémorragique.



# Résultats

## Méthode LC-MS/MS

### Identification *in silico* de peptides spécifiques

Les séquences d'AA des deux chaînes lourdes (HC1 et HC2) de l'ECZ ainsi que la chaîne légère (LC) utilisées pour la première étape de l'analyse *in silico* sont détaillées en Annexe 2. Conformément aux conditions expérimentales décrites et les paramètres de restriction de choix des peptides d'intérêt pour l'analyse MS, la liste des peptides retenus suite à l'utilisation d'ExPASy est présentée dans le Tableau 2. Les scores de BLAST de ces peptides permettent de préciser l'intérêt pour les quatre peptides suivants : <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup>, <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup>, <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup> et <sup>348</sup>EPQVYTLPPSQK<sup>359</sup>. Les trois premiers peptides ainsi que d'autres peptides candidats sont situés dans la région variable de la chaîne lourde 2 de l'Emicizumab ciblé, le dernier dans la partie constante de la chaîne lourde 1 (Figure 11).

L'utilisation de l'outil BLAST a permis de comparer les séquences d'AA des différentes régions constantes (RC) et variable (RV) de l'ECZ à des séquences dite « consensuelle » décrites par Genentech, Roche Group (Bâle, Suisse) dans la conception du Bêvacizumab (77), grâce au même critère que précédemment (Subject Identities %). On note une proportion plus importante avec l'isotype IgG4 dans les régions constantes de HC1 (98%) et HC2 (98%) de l'ECZ et moindre avec l'isotype IgG3 (80 et 79%) ainsi que des différences plus importantes dans la séquence d'AA de la RV des chaînes légères (85 et 74%) d'AA communs avec la chaîne légère Kappa sous-groupe I.

Masse (Da)	Position	Séquence	Score S <sup>a</sup>	E-value <sup>b</sup>	Subject Identities % <sup>c</sup>
<b>HC1/ HC2</b>					
1873,9218	396-412	TTPPVLDSDGSFFLYSK	126	3,40 <sup>E</sup> -11	100%
1808,0064	305-320	VVSVLTVLHQDWLNGK	121	1,60 <sup>E</sup> -10	100%
1189,5120	296-304	EEQYNSTYR	73	6,60 <sup>E</sup> -04	100%
835,4342	252-258	DTLMISR	55	2,20 <sup>E</sup> -01	100%
830,4618	330-337	GLPSSIEK	56	2,00 <sup>E</sup> -01	100%
<b>HC1</b>					
1881,0188	1-19	QVQLVESGGGLVQPGGSLR	125	7,00 <sup>E</sup> -11	94,70%
1386,7263	348-359	<b>EPQVYTLPPSQK</b>	<b>85</b>	<b>1,90<sup>E</sup>-05</b>	<b>100%</b>
1352,6991	77-87	NTRYLQMNSLR	87	8,10 <sup>E</sup> -06	100%
<b>HC2</b>					
1876,8997	344-359	EPQVYTLPPSQEEMTK	85	1,90 <sup>E</sup> -05	100%
1776,7646	24-38	<b>ASGYTFDNNMDWVR</b>	<b>87</b>	<b>1,70<sup>E</sup>-05</b>	<b>73%</b>
1772,8384	39-54	QAPGQGLEWMGDINR	97	9,00 <sup>E</sup> -07	92,90%
1501,6553	55-67	<b>SGGSIYNEEFQDR</b>	<b>55</b>	<b>7,80<sup>E</sup>-01</b>	<b>78%</b>
1473,6890	75-87	STDYAMELSSLR	97	3,70 <sup>E</sup> -07	100%
1315,7216	1-12	QVQLVQSGSELK	85	2,00 <sup>E</sup> -05	100%
805,4488	68-74	<b>VIMTVDK</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>
686,4195	13-19	<b>KPGASVK</b>	<b>47</b>	<b>3,70<sup>E</sup>+00</b>	<b>100%</b>
<b>LC</b>					
1946.0269	109-126	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	133	3,70 <sup>E</sup> -12	100%
1878.8862	1-18	DIQMTQSPSSLSASVGDR	130	1,10 <sup>E</sup> -11	100%
1502.7584	170-183	DSTYLSSTLTLSK	97	4,40 <sup>E</sup> -07	100%
759.3631	55-61	<b>ESGVPDR</b>	<b>51</b>	<b>9,30<sup>E</sup>-01</b>	<b>100%</b>

<sup>a</sup> Bit score (score S) traduisant la similarité des séquences d'AA comparées ; <sup>b</sup> E-value basse ou proche de zéro traduit une correspondance significative entre les séquences ; <sup>c</sup> Correspond au nombre d'acide aminé commun entre la séquence « sujet » et la séquence de référence définie par l'algorithme ; AA différents de séquence dites « consensuelles » (77)

Tableau 2 – Spécificité des peptides évaluée par la correspondance avec des séquences d'AA répertoriées dans la base de données UniProtKB\_Human, après protéolyse et analyse *in silico* - Zéro clivage manqués, taille < 2kDa, nombre d'AA ≥ 7 et ≤ 15.

CHAINE LOURDE 2 DOMAINE VARIABLE					
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
QVQLVQSGSE	LKKPGASVKV	SCKASGYTFT	DNNMDWVRQA	PGQGLEWMGD	INTRSGGSIY
61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-119
NEEFQDRVIM	TVDKSTDTAY	MELSSLRSED	TATYHCARRK	SYGYLDEWG	EGTLVTVSS//
CHAINE LOURDE 1 DOMAINE CONSTANT					
124-130	131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
//ASTKGPS	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
181-190	191-200	201-210	211-220	221-230	231-240
QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	TQTYTCNVDH	KPSNTKVDKR	VESKYGPPCP	PCPAPEFLGG
241-250	251-260	261-270	271-280	281-290	291-300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	QEDPEVQFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
301-310	311-320	321-330	331-340	341-350	351-360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKG	LPSSIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSQKE
361-370	371-380	381-390	391-400	401-410	411-420
MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSGGSFFLY	SKLTVDKSRW
421-430	431-440	441-448			
QEGNVFSCSV	MHEALHNRYT	QKSLSLSP			

Figure 11 - Localisation des petides définis *in silico* dans la séquence d'AA de la CH2 de l'Emicizumab.

## Identification expérimentale

L'identification expérimentale, c'est-à-dire par MS, débute par la réalisation d'un *fullscan* : recherche de tous les ions unimoléculaires de masse  $m/z$  comprise entre 50 et 2000 Da de solutions d'ECZ dans un tampon ammonium (TBA) pH 8 aux concentrations 3 et 0,3 mg/mL, après digestion à la trypsine (TRP). A chaque pic correspond une multitude d'ions chargés élués puis détectés par MS (Figure 12). L'intensité est plus importante dans l'échantillon de concentration supérieure.

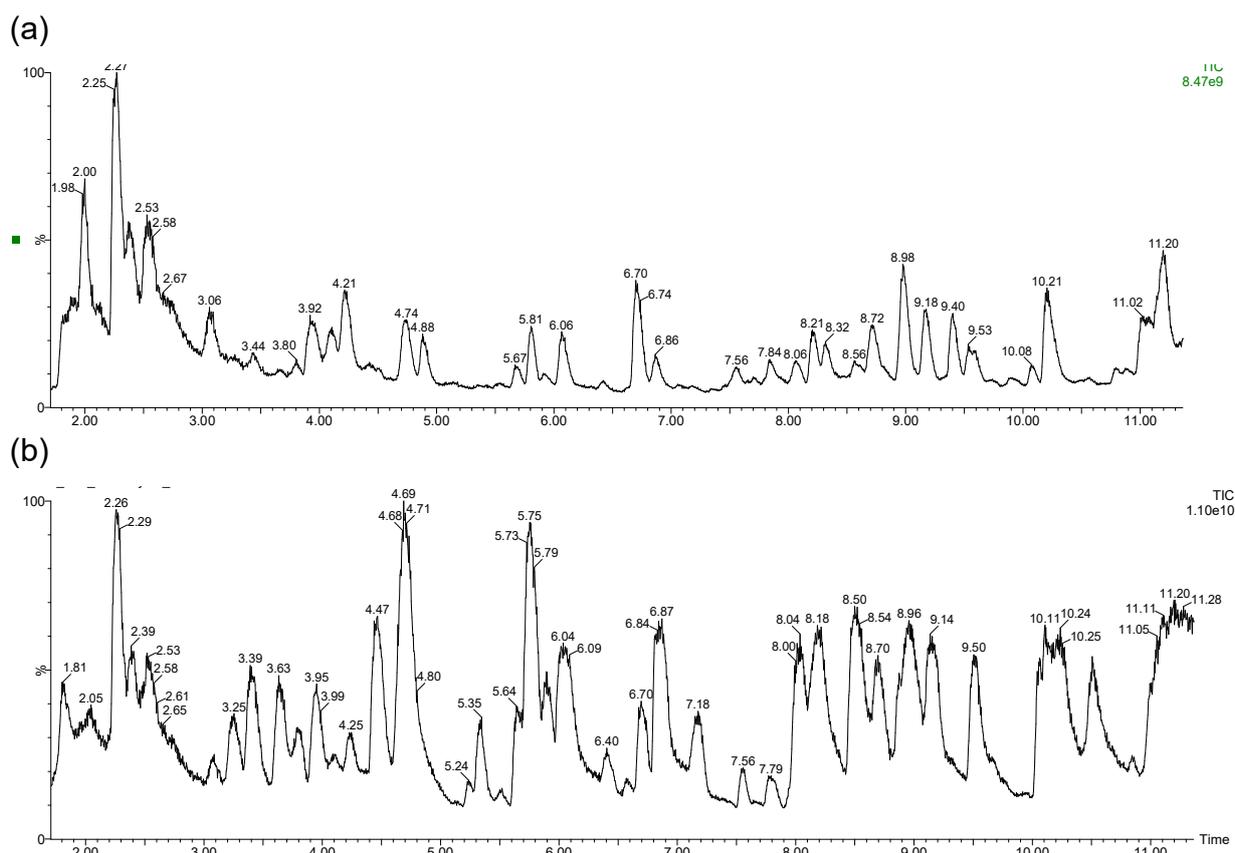


Figure 12- *Fullscan* de solution trypsinée d'ECZ dans un TBA à différentes concentrations : (a) 0,3 mg/mL et (b) 3 mg/mL.

Sur la base du principe que les peptides, étant des molécules de tailles importantes, portent deux voire trois charges, la recherche (*mass display*) des rapports  $m/z$  des peptides d'intérêts définis précédemment *in silico* en tient compte. En utilisant les masses mono-isotopiques, nous pouvons mettre en évidence les peptides :

- $^{55}\text{SGGSIYNEEFQDR}^{67}$  masse mono-isotopique avec une charge  $[\text{M}-\text{H}^+]$  de 1501,655 Da, avec deux charges  $[\text{M}/2-\text{H}^+]$  de 751,331 Da et avec trois charges  $[\text{M}/3-\text{H}^+]$  de 501,223 Da;

- $^{68}\text{VIMTVDK}^{74}$  [M-H<sup>+</sup>] de 805,448 Da, [M/2-H<sup>+</sup>] de 403,228 Da, [M/3-H<sup>+</sup>] de 269,154 Da ;
- $^{24}\text{ASGYTFTDNNMDWVR}^{38}$  [M-H<sup>+</sup>] de 1776,764 Da, [M/2-H<sup>+</sup>] de 888,885 Da, [M/3-H<sup>+</sup>] de 592,926 Da ;
- $^{348}\text{EPQVYTLPPSQK}^{359}$  [M-H<sup>+</sup>] de 1386,726 Da, [M/2-H<sup>+</sup>] de 693,867 Da, [M/3-H<sup>+</sup>] de 462,913 Da et [M/4-H<sup>+</sup>] de 397,437 Da.

La Figure 13 illustre l'exemple du peptide  $^{55}\text{SGGSIYNEEFQDR}^{67}$  dont les trois rapports de masses sont retrouvés à 5,65 minutes d'élution, défini comme le temps de rétention (tr) de ce peptide dans les conditions chromatographiques définies précédemment. Pour les trois autres peptides identifiés, plusieurs rapports de masse m/z ont été observés à des temps de rétention identiques : tr de 4,70 minutes pour  $^{68}\text{VIMTVDK}^{74}$  avec les masses [M-H<sup>+</sup>] et [M/2-H<sup>+</sup>] mais absence de l'ion portant trois charges [M/3-H<sup>+</sup>] ; tr de 8,99 minutes pour  $^{24}\text{ASGYTFTDNNMDWVR}^{38}$  avec l'ion portant une, deux et trois charges. Concernant  $^{348}\text{EPQVYTLPPSQK}^{359}$ , l'identification des différentes formes ionisées n'aboutit pas à la mise en évidence d'un temps de rétention identique, à ce stage du développement. La forme monochargée [M-H<sup>+</sup>] de l'ion unimoléculaire d'intérêt est plus faible que la forme bichargée [M/2-H<sup>+</sup>] majoritaire (Annexe 3).

L'impact de la tension de cône a été évalué sur une solution pure d'ECZ à 30 µg/mL dans du TBA (conditions de digestion protéique identiques). Les tensions de cône testées étaient de 20, 35 et 50V. Le voltage du capillaire est fixe à 1 kV. Ceci est illustré sur la Figure 14. Le signal est plus intense à 35V de tension de cône.

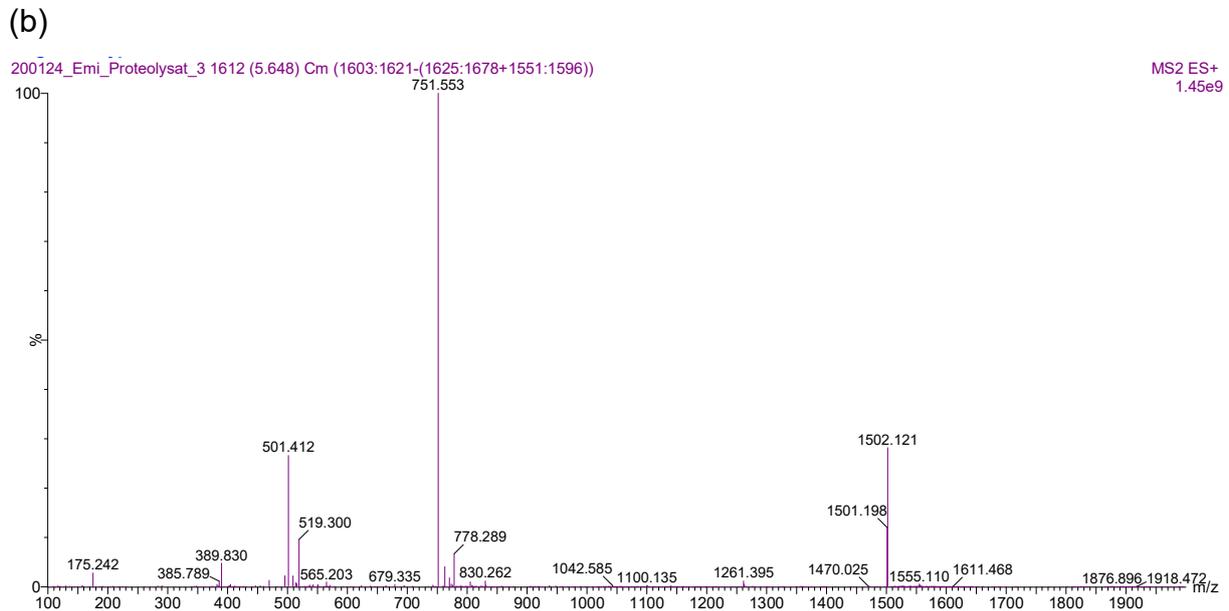
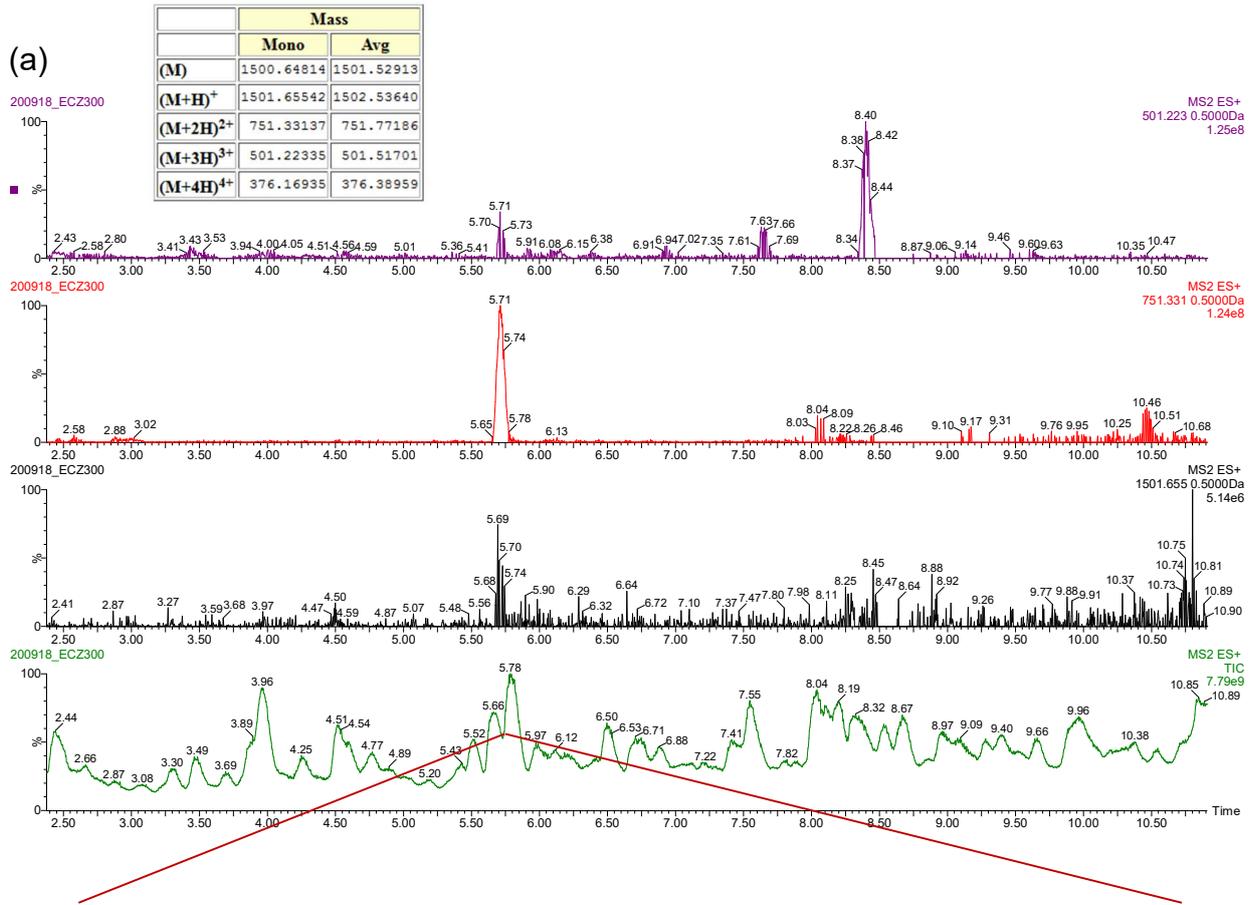


Figure 13 - Illustration de l'identification du peptide  $^{55}\text{SGGSYNEEFQDR}^{67}$  en mode *fullscan*. (a) Mise en évidence (*mass display*) des ions  $[M-H]^+$ ,  $[M/2-H]^+$  et  $[M/3-H]^+$ . (b) Spectre de masse à 5,65 minutes.

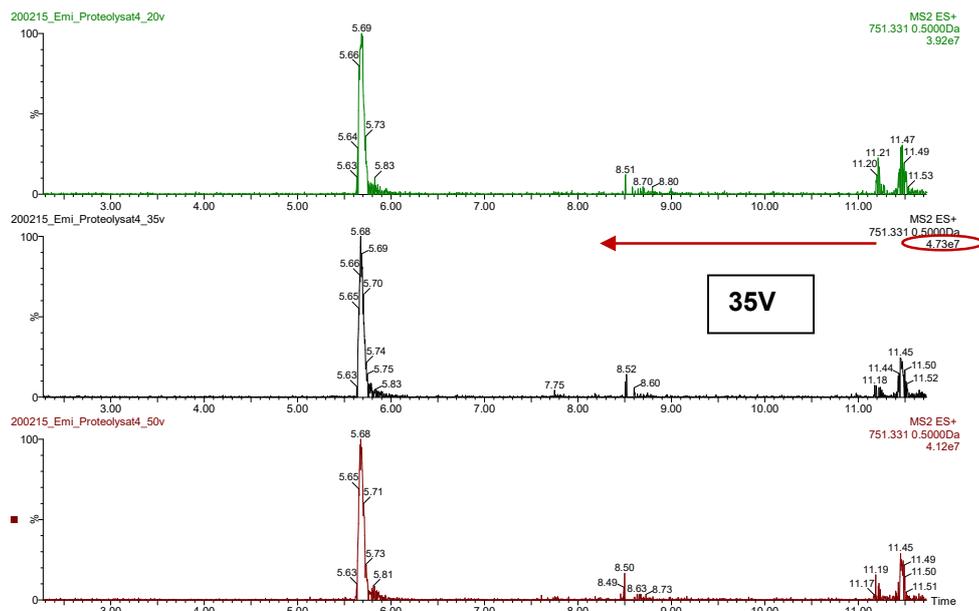
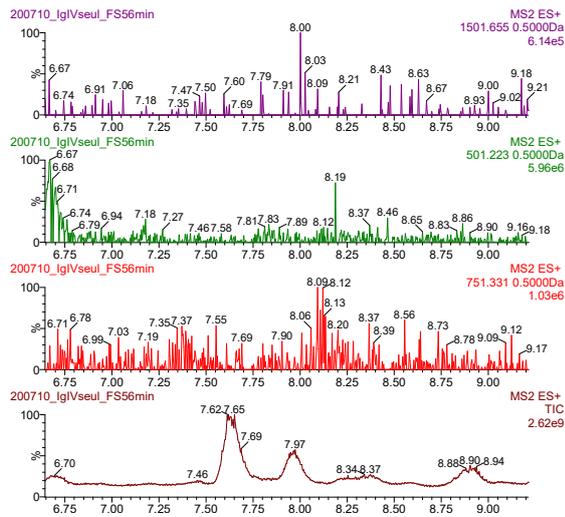


Figure 14 – Evaluation de l’impact de la tension de cône sur l’intensité du signal émis par la masse 751,331 Da du peptide  $^{55}\text{SGGSIYNEEFQDR}^{67}$  (*mass display*).

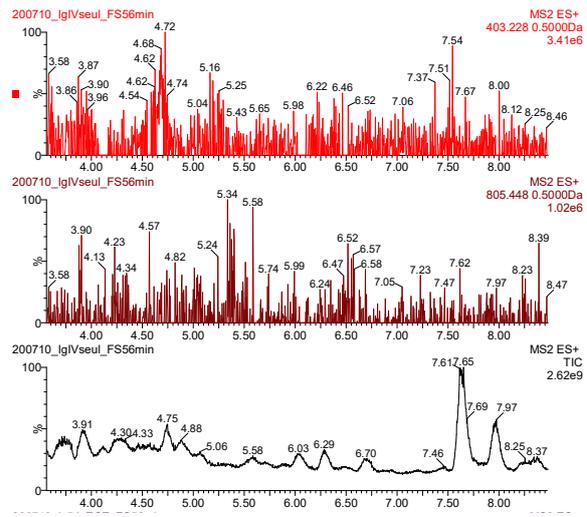
Le logiciel *Skyline Software* (MacCoss Lab Software, Washington, USA) propose les peptides  $^{55}\text{SGGSIYNEEFQDR}^{67}$  et  $^{348}\text{EPQVYTLPPSQK}^{359}$ , en excluant toutefois les peptides contenant des résidus Méthionine (M).

Afin de vérifier que les rapports m/z identifiés étaient spécifiques des peptides issus de la protéolyse de l’Emicizumab, nous avons procédé à l’analyse d’une solution d’IgG polyvalentes humaines contenues dans le médicament Clayrig® (dont la distribution en isotypes d’IgG est sensiblement identique à celle du plasma humain : IgG1 majoritaire / IgG4 faible proportion), seul ou en mélange avec de l’Emicizumab. La Figure 15 montre la présence et l’absence des différents rapports m/z des peptides d’intérêts choisis après analyse *in silico*.

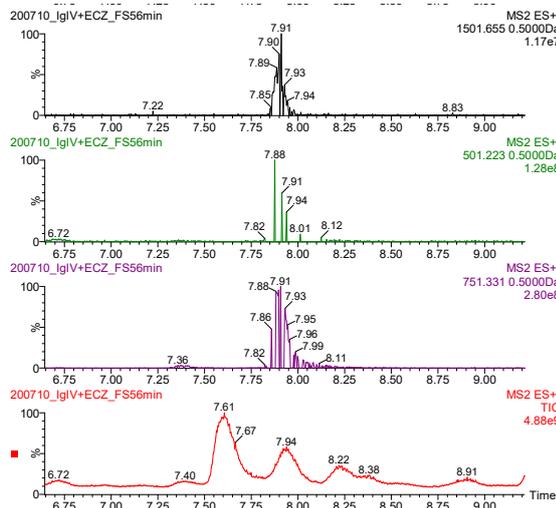
(a) Clayrig seul, <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup>



(b) Clayrig seul, <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup>



(c) Clayrig + ECZ, <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup>



(d) Clayrig + ECZ, <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup>

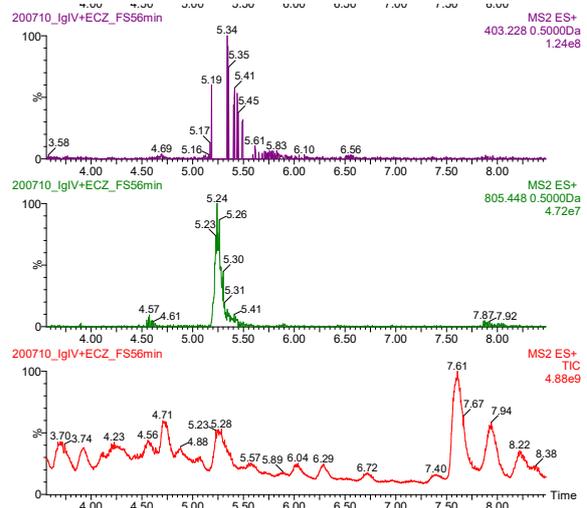


Figure 15 – Illustration de la spécificité des peptides vis-à-vis d'un pool d'IgG polyvalentes Clayrig® en solution pure dans du TBA en appliquant l'outil de recherche de masse (*mass display*).

Le peptide <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup> est également spécifique de l'ECZ. En effet, au même temps de rétention, dans les conditions chromatographiques de l'expérimentation, les spectres de masses mettent en évidence les rapports m/z qui lui sont propres dans l'échantillon contenant de l'ECZ et non dans l'échantillon contenant les IgG polyvalentes seules (Figure 16).

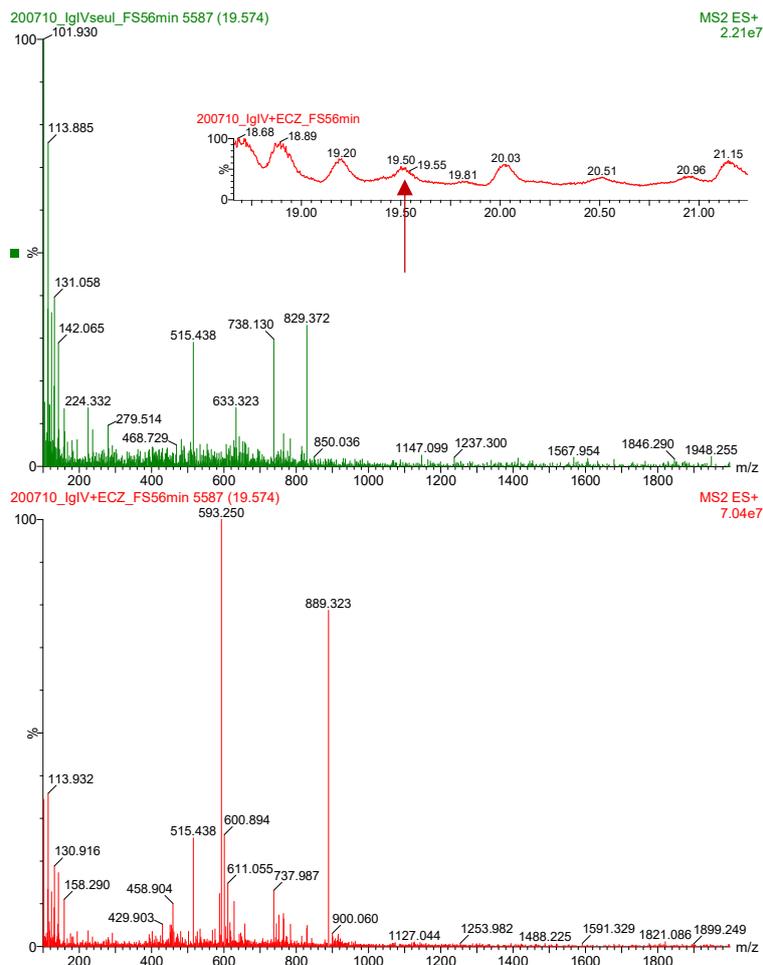


Figure 16 – Extraction des spectres de masse après analyse *fullscan* d'une solution d'IgG polyvalente, du peptide  $^{24}\text{ASGYTFTDNNMDWVR}^{38}$  en absence (en vert) et en présence (en rouge) d'Emicizumab.

A ce stade (c'est-à-dire après validation du choix des peptides spécifiques de l'ECZ après trypsination), nous avons commandé auprès du laboratoire BACHEM, un peptide synthétique portant un isotope (non radioactif) de séquence identique au peptide  $^{55}\text{SGGSIYNEEFQDR}^{67}$ . Le SIL-peptide (*stable labelled isotope-peptide*)  $\text{SGGSIYNEEFQDR}^*$  (SIL-ECZ) présente une masse additionnelle de +10 Da, son tr étant identique au peptide initial. Dans l'analyse en mode *fullscan*, l'ion majoritaire, défini expérimentalement, est l'ion portant deux charges avec un rapport m/z de 756,835 Da. Le fournisseur précise une masse moléculaire relative de 1511,42 Da à la livraison (non chargée). Notre outil détecte une masse moyenne [M-H<sup>+</sup>] de 1512,513 Da. Les résultats sont cohérents.

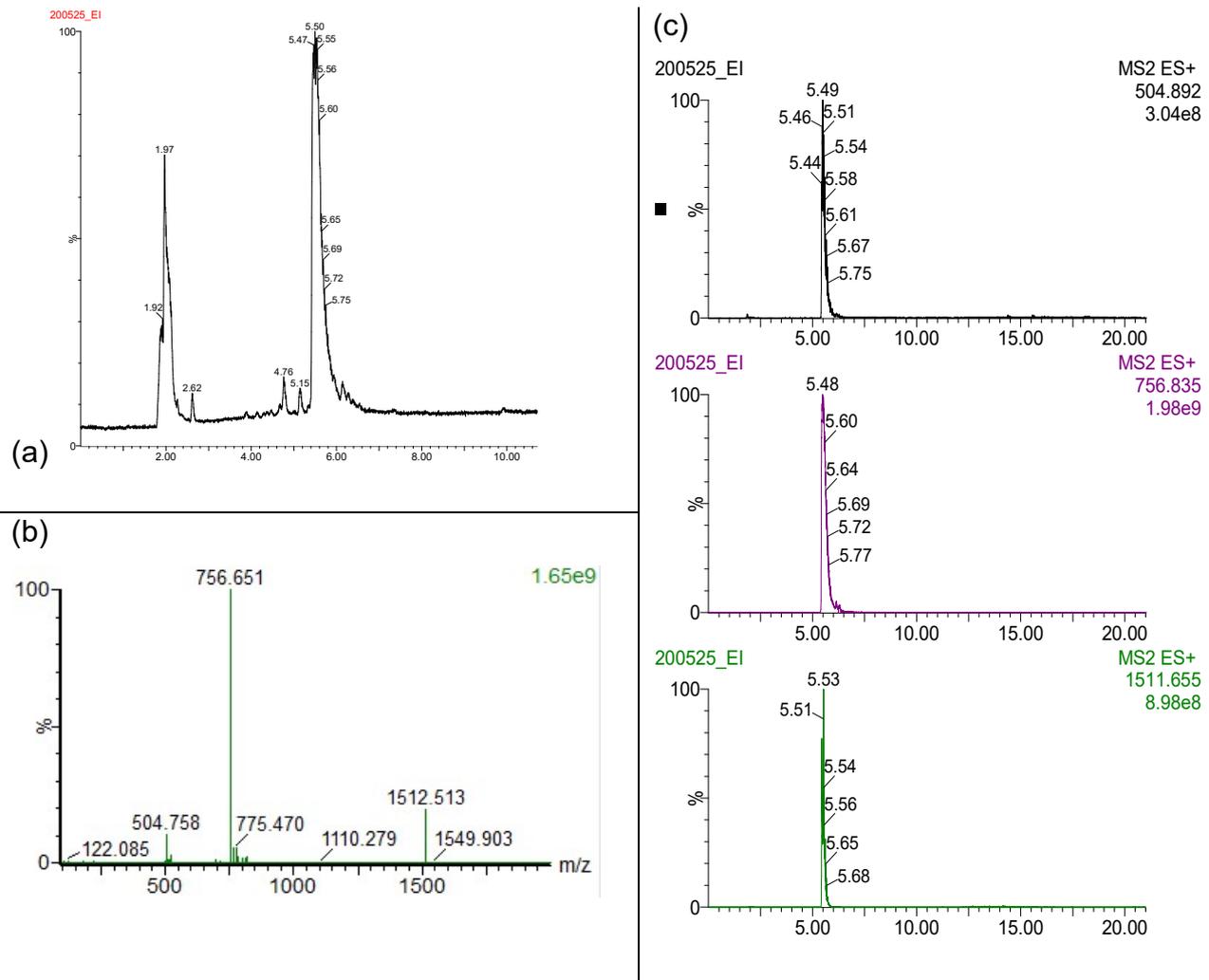


Figure 17 – Illustration de l'identification du SIL-peptide par mode de balayage *fullscan* sur le Xevo® TQ-XS. (a) Chromatogramme de la solution pure de SIL-ECZ. (b) Spectre des masses à 5,50 minutes. (c) Identification du peptide pas ces différentes formes d'ionisation (une, deux ou trois charges à l'ESI).

Après avoir défini les ions majoritaires spécifiques de l'Emicizumab pour les peptides d'intérêt et le SIL-ECZ, une analyse en mode *daughter scan* est réalisée. Elle consiste à définir les fragments issus de la collision, dans le quadripôle q2, des peptides précédemment identifiés, en s'appuyant sur le principe suivant. La dissociation induite par collision des peptides génère des fragments b et y selon la nomenclature de Biemann illustrée ci-dessous (Figure 18), dont les masses ont été prédites par l'outil *Fragment Ion Calculator* comme défini précédemment, puis identifiées/validées expérimentalement.

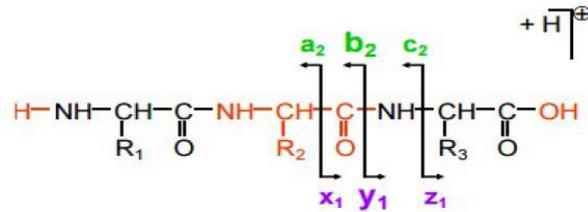


Figure 18 - Illustration de la fragmentation des peptides selon la nomenclature de Biemann (74).

La recherche de ces fragments est réalisée sur des solutions pures d'ECZ ou d'étalon interne dans des conditions de protéolyse identiques. Le paramétrage en mode *daughter scan* du MS permet de sélectionner au niveau du Q1 une masse définie, fragmentée au niveau du q2 à une énergie de collision précise puis de détecter, sans sélection au niveau du Q3 les masses de fragments générés. Comme illustré par la Figure 19, le niveau d'énergie de collision induit des spectres de masse différents. Le spectre de masse obtenu montre :

- à 16 eV une absence de fragmentation,
- à 24 eV plusieurs fragments générés à partir de la masse de l'ion 751,331 Da [M/2-H<sup>+</sup>] du peptide <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup> ;
- enfin une fragmentation importante à 32 eV avec une majorité de fragments inférieures à 410 Da.

Ces résultats étaient tout à fait comparables pour l'étalon interne SIL-ECZ à partir de sa masse mono-isotopique [M/2-H<sup>+</sup>] majoritaire à 756,331 Da. En comparaison, le peptide <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup> met en évidence déjà plusieurs fragments à une CE de 10 eV et presque un unique fragment de masse 593,196 Da, majoritaire à 16 eV (Figure 19) généré à partir de la masse 403,228 Da dans le Q1. De la même manière, et dans les mêmes conditions, la fragmentation du peptide <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup> est par contre peu efficace à 24 eV et met en évidence de nombreux fragments d'intensité comparable avec une CE de 32 eV (Annexe 4)

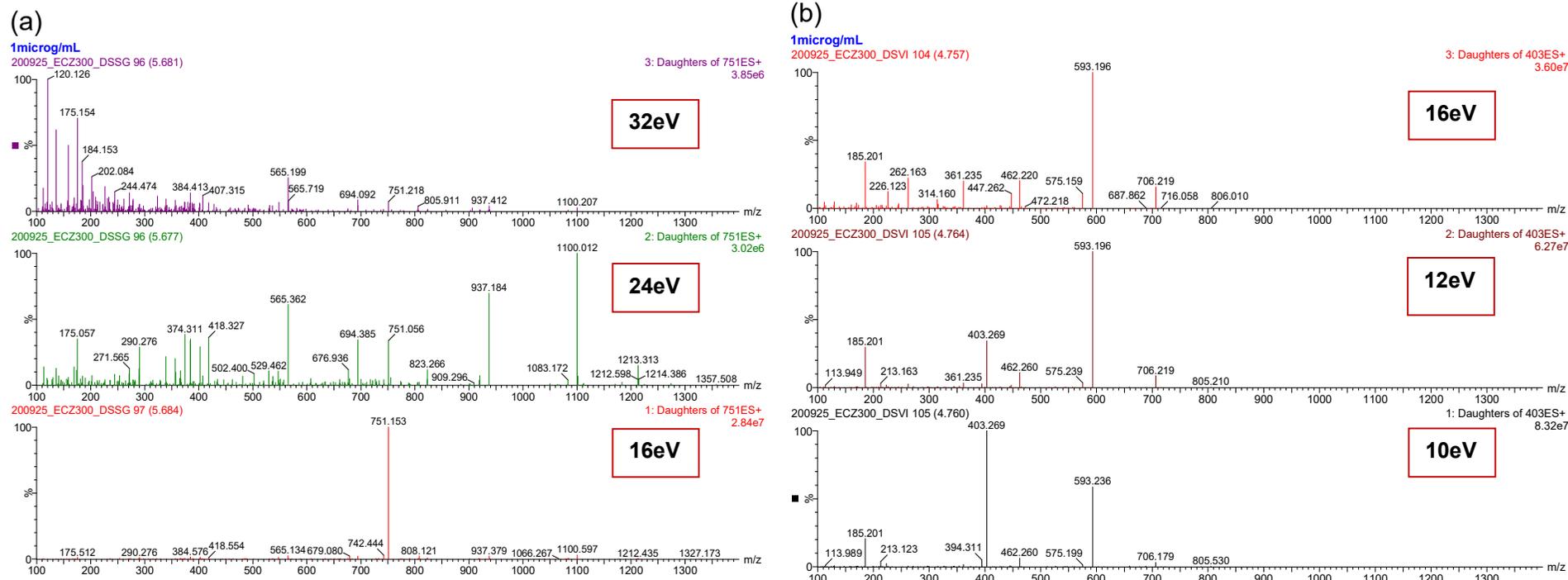


Figure 19 - Illustration des spectres de masses obtenus après fragmentation (*daughter Scan*) du peptide  $^{55}\text{SGGSIYNEEFQDR}^{67}$  (a) et du peptide  $^{68}\text{VIMTVDK}^{74}$  (b) à différentes CE au niveau du q2. A partir d'une solution pure d'ECZ à 300  $\mu\text{g/mL}$ .

L'impact de la tension du capillaire (exprimée en kV), au niveau de la source d'ionisation, a également été évalué, via l'intensité du signal produit par l'ensemble des fragments générés, en mode *daughter scan*, avec une CE fixe de 24 eV, mais à une tension de capillaire variable : 1, 2,5, 3,5 et 5 kV, après sélection par le Q1 de la masse 756,331 Da [M/2-H+]. L'ensemble des fragments b et y générés à cette CE, produit une intensité supérieure avec une tension de capillaire de 1 kV. L'évaluation de l'intensité produite par le fragment de masse 1110,464 Da donne un résultat comparable, soit un signal plus intense à 1 kV.

A ce stade, les transitions utilisées pour l'analyse quantitative en mode MRM des peptides d'intérêts sont définies par un couple ion « parent » / ion « fils » en confrontant les masses mono-isotopiques des données prédites *in silico* et les fragments identifiés par l'expérimentation comme spécifiques (Tableau 3). La mise en évidence, à partir des peptides doublement chargés, de fragments de petites masses émettant un signal intense, s'est avérée être moins spécifique, avec des transitions SRM (par exemple 888 ,885 > 185,119 Da) retrouvées dans le pool d'IgG polyvalentes humaines (Annexe 5).

Peptides	Transition <sup>a</sup>	Cône (V)	CE (eV)	Ratio <sup>b</sup>
<sup>55</sup> SGGSIYNEEFQDR <sup>67</sup>	<b>751,33 &gt; 565,27 Da</b>	35	24	2,36
	751,33 > 937,40 Da		24	nd
	<b>751,33 &gt; 1100,46 Da</b>		24	Réf
<sup>68</sup> VIMTVDK <sup>74</sup>	403,23 > 361,21 Da	35	16	nd
	403,23 > 462,25 Da		16	nd
	<b>403,23 &gt; 593,30 Da</b>		12	0,08
<sup>24</sup> ASGYTFTDNNMDWVR <sup>38</sup>	888,88 > 175,12 Da	35	40	nd
	888,88 > 460,27 Da		32	nd
	<b>888,88 &gt; 1150,49 Da</b>		24	4,89
SGGSIYNEEFQDR* (SIL-ECZ)	756,33 > 185,12 Da	35	32	nd
	<b>756,33 &gt; 575,27 Da</b>		24	2,87
	<b>756,33 &gt; 1110,46 Da</b>		24	Réf

<sup>a</sup>La transition est constituée de l'ion « parent » sous la forme doublement chargé majoritaire et un l'ion « fils » monochargé ; <sup>b</sup>Ratio des surfaces de pics chromatographiques entre une transition et une transition de référence ; Réf = transition de référence, nd non déterminé

Tableau 3 – Récapitulatif des paramètres pouvant être utilisés, en mode MRM, pour l'analyse quantitative de l'ECZ en utilisant un étalon interne de type SIL-ECZ

Le paramétrage de l'analyse MRM pour l'analyse quantitative reprend les transitions SRM les plus intenses pour chacun des trois peptides spécifiques de l'ECZ, à savoir :

- 751,33 > 1100,46 Da pour <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup> ;
- 403,23 > 593,30 Da pour <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup> ;
- 888,88 > 1150,49 Da pour <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup>.

Pour l'étalon interne, deux des trois transitions SRM ont été retenues : 756,33 > 1110,46 Da et 756,33 > 185,12 Da.

Enfin une seconde transition, dite « de qualification » et permettant d'assurer une spécificité quasi complète de l'identification, a été ajoutée pour le peptide <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup> (751,33 > 565,27 Da).

Le ratio défini comme l'aire du pic chromatographique d'une transition donnée rapporté à une transition de référence, a été calculé sur plusieurs d'échantillons à différentes concentrations, préparés dans des conditions de purification et de digestion protéique différentes au cours du développement. La variabilité sur le ratio est meilleure quand les transitions SRM appartiennent au même peptide. A titre d'exemple, le CV du ratio de la transition 756,33 > 575,27 Da l'étalon interne est de 3% vs le CV du ratio de la transition du peptide <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup> de 28%.

#### **Préparation des échantillons : purification sur protéine A et digestion protéique**

Afin d'évaluer la capacité de fixation de la résine de protéine A, dans les conditions de préparation des échantillons au laboratoire, un dosage des IgG totales et par isotypes d'IgG a été réalisé : avant incubation, après collection et après élution des IgG fixées. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 4 et Tableau 5 suivants. Les résultats mettent en évidence une perte importante de la fraction d'IgG totales (en présence ou absence d'ECZ), lors du processus de purification, perte en moyenne de 55,4%. Le rendement après soustraction de la quantité d'IgG totales perdues avant élution est de 70% en moyenne sur l'ensemble des échantillons. Les résultats montrent également l'absence de fixation par la résine de l'isotype IgG3 et une augmentation de la concentration en IgG4 dans les échantillons de concentration élevée en ECZ. Comme pour les IgG totales, le rendement final (perte avant élution soustraite) est en moyenne de 69,8%.

	Blanc	ECZ 30 µg/mL	ECZ 300 µg/mL
Perte initiale (IgG non fixées)			
Post incubation (perte) <b>g/L</b>	3,657	3,639	3,639
Qt initiale <b>mg</b>	0,660	0,654	0,661
Qt de perte <b>mg</b>	0,366	0,364	0,364
Qt résiduelle résine <b>mg</b>	0,294	0,290	0,297
<b>% perte</b>	<b>55,44</b>	<b>55,63</b>	<b>55,10</b>
Rendement (perte déduite)			
IgG (éluat) <b>g/L</b>	0,506	0,496	0,464
Qt finale (400µL) <b>mg</b>	0,213	0,208	0,195
<b>rendement %</b>	<b>72,35</b>	<b>71,76</b>	<b>65,70</b>

Tableau 4 - Evaluation des pertes et du rendement en IgG totales et de ces différents isotypes lors du processus de purification

	Moy (g/L)	SD (g/L)	CV	Moy (g/L)	SD (g/L)	CV	Moy (g/L)	SD (g/L)	CV
	Blanc			ECZ 30µg/mL			ECZ 300 µg/mL		
IgG	0,506	0,018	3,505	0,496	0,024	4,791	0,464	0,020	4,315
IgG1	0,238	0,010	4,012	0,232	0,012	4,990	0,219	0,007	3,052
IgG2	0,201	0,004	1,855	0,192	0,009	4,540	0,176	0,005	2,642
<b>IgG3</b>	<b>&lt; 0,006</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>	<b>&lt; 0,006</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>	<b>&lt; 0,006</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>
<b>IgG4</b>	<b>0,015</b>	0,000	2,060	<b>0,017</b>	0,001	5,623	<b>0,031</b>	0,001	1,995

Tableau 5 – Concentration (g/L) des différents isotypes d'IgG à l'issue de la purification sur protéine A. n = 8

Pour améliorer la sensibilité de l'analyse, une modification du processus de purification a permis de diminuer *a posteriori* le pourcentage de perte au moment de l'incubation de l'échantillon avec la résine : 38,5 et 34,4% pour IgG totales et l'isotype IgG4 respectivement.

Le temps de digestion de 8h vs 12h de la TRP a un impact sur l'intensité du signal du MS. Une comparaison sur deux transitions SRM 751,33 > 565,27 Da et 403,23 > 262,14 Da pour les peptides <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup> et <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup> respectivement, a montré une réponse supérieure après 12h de digestion sur deux échantillons contenant de l'ECZ à la concentration de 300 µg/mL. Par ailleurs, lors de l'optimisation de la protéolyse, plusieurs conditions faisant varier la prise d'essai en regard d'une quantité de trypsine identique (7 µL à 100 µg/mL) ont été testées. On note une variabilité plus importante de la justesse des concentrations recalculées

après régression linéaire. Notamment dans les concentrations basses, lorsque le ratio de TRP est faible (Tableau 6).

TRP (mol/mol d'Ig)	Concentration en ECZ ( $\mu\text{g/mL}$ ), n=3					$r^2$ (régression)
	3	12	30	60	120	
ratio 1/60	-0,67%	-4,08%	0,93%	7,12%	-3,37%	0,997
ratio 1/120	16,33%	-18,33%	-1,10%	2,72%	0,33%	0,996

Tableau 6 – Biais sur les concentrations recalculées par rapport à la valeur théorique de trois gammes d'Emicizumab – Impact du ratio TRP (mol/mol d'ECZ).

### **Validation de méthode**

La validation de méthode a été réalisée dans les conditions de purification et digestion d'échantillons décrites dans la partie « matériels et méthodes ». Un exemple des chromatogrammes obtenus après passage d'un échantillon de plasma surchargé en Emicizumab (point de calibration à 60  $\mu\text{g/mL}$ ) est présenté en Annexe 6. Les données de validation sont synthétisées dans le Tableau 7. Les résultats de la linéarité excluent la limite haute de linéarité (240  $\mu\text{g/mL}$ ) : justesse de -18% et CV de 23,9%. Lors de cette validation, le plus petit signal quantifié (rapport signal/bruit, S/N) en intégrant l'ensemble des peptides spécifiques de l'ECZ est en moyenne de 0,13  $\mu\text{g/mL}$ . La LLOQ (3  $\mu\text{g/mL}$ ) et le premier niveau de CQ (20  $\mu\text{g/mL}$ ) sont respectivement supérieurs à 5 et 10 fois cette valeur en accord avec les critères d'acceptabilité des sociétés savantes (72,76). La limite de détection est donc définie à 1  $\mu\text{g/mL}$ . La contamination inter-échantillon est conforme, évaluée à 0,06% avec une justesse de la concentration haute utilisée (limite de linéarité à 240  $\mu\text{g/mL}$ ) de -24,8% (n=3) et 3,1% sur le point à 3  $\mu\text{g/mL}$  (LLOQ).

<b>Performances analytiques</b>		
Linéarité		
Coefficient de détermination (moyenne)	0,998	
Précision (%) [12 à 120 µg/mL]	[4,4 – 14,9]	
Justesse (%) [12 à 120 µg/mL]	[-3,3 – 6,1]	
	Répétabilité <sup>a</sup>	Fidélité intermédiaire <sup>a</sup>
Justesse (%)		
LLOQ (3 µg/mL)	16,7	16,1
CQB (20 µg/mL)	-6,2	10,8
CQH (80 µg/mL)	-12,5	-1,6
Précision (%)		
LLOQ (3 µg/mL)	5,3	4,9
CQB (20 µg/mL)	9,5	18,6
CQH (80 µg/mL)	12,5	11,7
Contamination inter-échantillons		
	0,06%	

<sup>a</sup> Représentent respectivement la variabilité intra et inter-journalière

Tableau 7 – Principaux résultats de la validation de méthode analytique.

### **Echantillons patients**

Des mesures de concentrations en ECZ dans des échantillons de plasma citratés de patients ont été réalisées en parallèle de la validation de méthode. Ces échantillons ont été préparés dans les mêmes conditions que la gamme de calibration vis-à-vis de la prise d'essai et de la quantité de trypsine utilisée pour la protéolyse. L'évolution des concentrations mesurées chez deux de ces patients est illustrée sur la Figure 20. Les données relatives à ces concentrations en Emicizumab sont reportées dans le Tableau 8. La Figure 21 illustre la comparaison des mesures de concentrations entre la technique UPLC-MS/MS et la technique chromatographique de mesure d'activité de l'ECZ par le laboratoire d'hémostase (STA R Max).

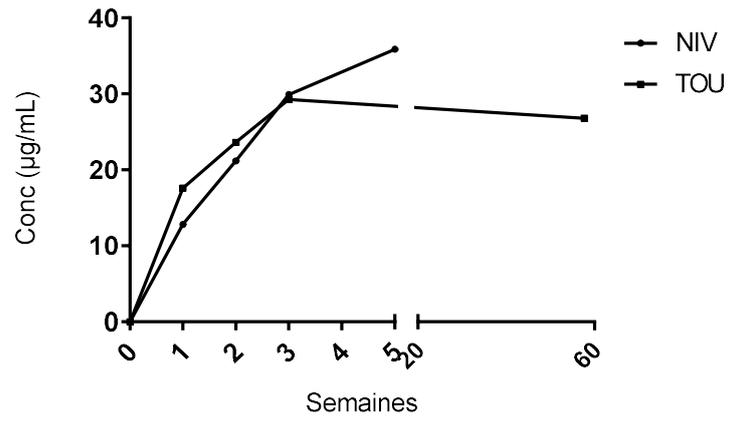


Figure 20 – Cinétique des concentrations en Emicizumab mesurées par la technique UPLC-MS/MS - *multiple reaction monitoring* (MRM), chez deux patients inclus dans le projet EMICARE.

Patient	Age	Poids	Posologie <sup>a</sup>	Prélèvement <sup>b</sup> (semaines)	Conc. ECZ (µg/mL)	Act ECZ <sup>c</sup> (µg/mL)	Inhibiteur (O/N ; UB)	Suivi	Calibration r <sup>2</sup> ; justesse
HAR	60	3 mg/kg*	19,8	NA	15,24	O	Hémorragie IC	0,983 ; <20%	
		3 mg/kg	22	10,50	17,3	NA			
		3 mg/kg	26	14,14	20,46	O ; 17 UB			
		3 mg/kg	31	19,54	31,44	NA			
NIV	50	DC	0	nd	nd	N	Aucun évènement particulier	0,987 ; <15%	
		DC	1	12,81	13,95	O			
		DC	2	21,19	25,18	O			
		DC	3	29,87	34,30	O			
		3 mg/kg	5	35,85	45,59	O			
		3 mg/kg	82	NA	NA	N			
TOU	100	DC	0	nd	nd	O	Aucun évènement particulier	0,987 ; <15%	
		DC	1	17,59	17,48	O			
		DC	2	23,60	27,48	NA			
		DC	3	29,24	34,62	NA			
		3 mg/kg	57,7	26,79	34,96	O ; 2UB			

<sup>a</sup> Dose d'entretien après dose de charge (DC) identique (3mg/kg/semaine durant 4 semaines) ; dose d'entretien : \* toute les deux semaines ; <sup>b</sup> Jours après l'initiation du traitement par HEMLIBRA®. ; nd = indétectable ; IC : intracrânienne ; NA non réalisé.

Tableau 8 – Données relatives aux dosages plasmatiques des échantillons patient issus de la sérothèque du projet EMICARE

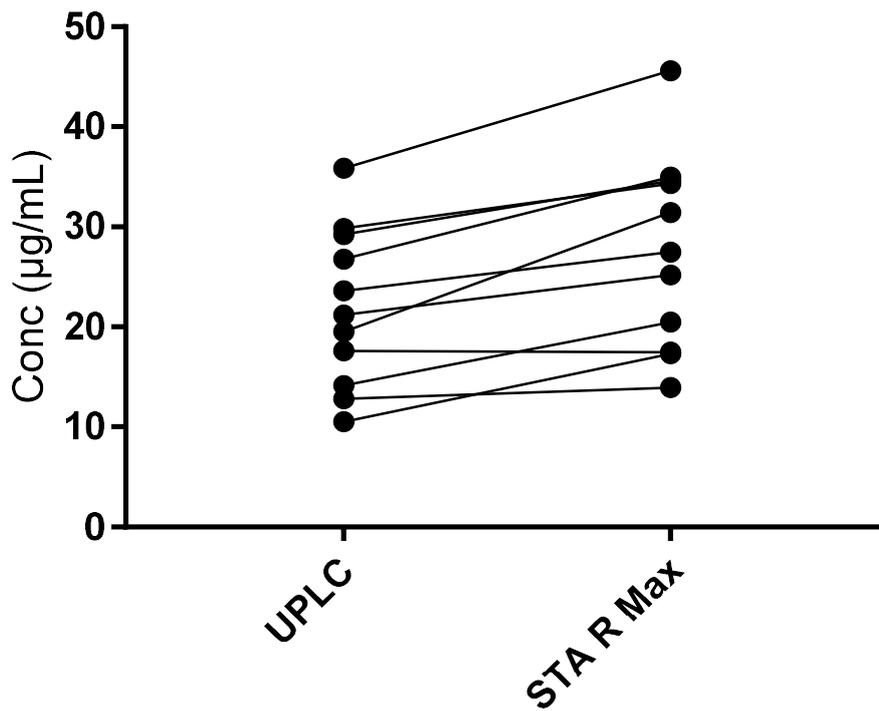


Figure 21 – Comparaison des mesures de concentrations de l'Emicizumab entre les techniques par spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) et par mesure chromatographique (activité ECZ, STA R Max) – Echantillons issus de la plasma/sérothèque EMICARE.

## Discussion

L'UPLC-MS/MS est déjà employée pour le dosage des médicaments de nature protéique comme les mAbs et peut se substituer aux techniques d'immunodosages de type ELISA ou de manière plus étendue aux techniques utilisant les liaisons à un ligand (LBA *ligand binding assay*). En 2008, Dubois *et al* décrivait le dosage d'un mAb de nature chimérique à l'aide d'une technique par MS (78). En 2012, les équipes de différents départements du laboratoire Pfzier décrivait l'évaluation PK d'un mAb candidat dans le traitement des rectocolites hémorragiques, une évaluation basée déjà sur le dosage par LC-MS/MS (79). La plupart des études publiées, mettant en avant l'utilisation de la MS dans le dosage des mAbs, sont des études pré-cliniques ou cliniques réalisées par les laboratoires pharmaceutiques (66,80) L'approche globale de l'identification du peptide spécifique du mAb à doser est une étape importante pour le développement, mais reste rarement rapportée dans les études précédemment citées. Toutefois, plusieurs revues ont été réalisées mettant en avant les problématiques du dosage des mAbs. L'article de van den Broek *I et al* fait ainsi une synthèse détaillée des facteurs critiques pour l'analyse quantitative des mAbs thérapeutiques mais aussi de (potentiels) biomarqueurs diagnostiques et pronostiques (73).

Certains de ces éléments critiques sont présentés dans notre travail de développement du dosage de l'Emicizumab et parfois discutés. Concernant les outils bio-informatiques, ont été utilisés dans ce travail : BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) et UniProtKB\_Human (base de données des séquences protéiques) permettant de mettre en évidence les alignements de séquence et sur la base d'algorithmes, de prédire les probabilités d'interférences avec des protéines endogènes. D'autres outils peuvent être utilisés, par exemple PeptideAtlas <http://www.peptideatlas.org>. Conformément aux recommandations de van den Broek *I et al*, le choix des peptides s'est donc porté sur les peptides de 7 à 15 AA ne présentant pas de clivage manqué (absence de résidus lysine ou arginine dans la séquence hormis en position C-terminale) et de taille (< 2kDa) compatible avec le MS. Les score S et E-value issus de l'alignement par BLAST sont les seconds critères « d'inclusion » d'un peptide dans le processus d'identification expérimentale. Avec ces critères de sélection, la liste des peptides candidats pour l'ECZ se trouve restreinte à quelques propositions (Tableau 2). A cet égard, nous avons choisi de

garder quatre peptides candidats : <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup>, <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup>, <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup> et <sup>348</sup>EPQVYTLPPSQK<sup>359</sup>. D'autres peptides auraient également pu être candidats à l'identification expérimentale : <sup>13</sup>KPGASVK<sup>19</sup> et <sup>55</sup>ESGVPDR<sup>61</sup>. En dehors de <sup>348</sup>EPQVYTLPPSQK<sup>359</sup>, ces séquences peptidiques se retrouvent toutes dans le domaine variable des chaînes lourdes ou légères, ceci étant un argument supplémentaire pour assurer la spécificité de ces peptides vis-à-vis des autres Ig endogènes. A noter que nous avons gardé deux séquences contenant un résidu méthionine (M) malgré le risque d'oxydation *in vivo* (par les espèces réactives de l'oxygène). En 1993, Gilles *et al* décrivait dans la revue *Blood* que les inhibiteurs anti-FVIII à haute affinité développés chez les patients HA étaient majoritairement des isotypes IgG1 et IgG4 (81), ces derniers d'autant plus en cas de titre élevé d'inhibiteur (2). Beaucoup plus récemment, Sanges *et al* ont décrit le cas d'un patient de 75 ans cumulant une hémophilie A acquise et une maladie dite liée aux IgG4 (MAG4), associée à une production importante de l'isotype IgG4 (82). Sachant que l'ECZ est produit à partir d'un isotype IgG4, ceci laisse supposer une homologie des séquences peptidique des chaînes lourdes et légères peut-être plus importante. Ces observations étayant l'importance de l'identification spécifiques des peptides pour éviter les interférences avec d'éventuels anticorps endogènes (de nature auto-immuns ou liés à la pathogénicité d'une maladie comme MAG4).

Après avoir défini les peptides d'intérêts, l'étape suivante du développement du dosage de l'ECZ consiste à vérifier par l'expérimentation que les peptides choisis sont réellement spécifiques de cet anticorps. Pour cette identification expérimentale, en comparaison, de l'outil Skyline Software (MacCoss Lab,USA) permettant d'évaluer automatiquement les paramètres MS optimisés, nous avons adopté une approche manuelle de l'optimisation des paramètres MS au fil du développement. Willeman T *et al* a recours à cet outil pour le dosage de plusieurs mAbs (70). Dans le cas du développement éventuel d'une technique multiplexe (plusieurs mAbs lors d'une même analyse), la comparaison et l'utilisation de cet outil serait intéressante.

Après analyse en mode *fullscan*, les différents rapports de masses [M-H+], [M/2-H+], [M/3-H+] voire [M/4-H+] sont recherchés sur l'intégralité du chromatogramme, c'est-à-dire durant tout le temps d'élution (27 minutes). L'hypothèse d'élution du peptide

d'intérêt, à un temps de rétention donné, est formulée sur l'élution simultanée de plusieurs des rapports de masse (illustration sur la Figure 13), en connaissance des masses mono-isotopiques de ces rapports grâce à l'outil *Fragment Ion Calculator* (75,83). Concernant les peptides <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup>, <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup> et <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup> l'identification est satisfaisante, mais plus incertaine vis-à-vis de <sup>348</sup>EPQVYTLPPSQK<sup>359</sup> (Annexe 3). L'hypothèse pouvant expliquer cette incertitude serait que ce dernier peptide serait co-élué avec un peptide d'intensité plus importante de masse [M-H<sup>+</sup>] de 1878,886 Da, et [M/2-H<sup>+</sup>] de 939,946 Da. Ces masses correspondent sans doute au peptide <sup>1</sup>DIQMTQSPSSLSASVGDR<sup>18</sup>, avec un score BLAST supposant une mauvaise spécificité. Ce peptide <sup>348</sup>EPQVYTLPPSQK<sup>359</sup> a donc été écarté du reste du processus. Pour appuyer ce résultat, Arsène C.G. *et al* montre en effet que malgré les bases théoriques du choix de peptides, la réponse en MS est variable, notamment vis-à-vis de l'effet de réduction de sa ionisation (84). Concernant la fragmentation des peptides et le choix des transitions SRM pour l'analyse quantitative il ne semble pas se dégager de consensus. L'objectif étant une nouvelle fois de s'affranchir au maximum du risque d'interférence ou d'améliorer la sensibilité analytique, en choisissant des transitions avec une réponse forte. A cet égard, comme il a été mis en avant par Duan *et al*, certains peptides peuvent être instables au cours de la digestion par la trypsine et créer une imprécision et une perte de sensibilité de mesure (85). Pour réduire ce biais, la méthode de quantification de l'ECZ utilise plusieurs transitions de plusieurs peptides. Une transition dite de « référence » (751,33 > 1100,46 Da de <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup> et deux autres transitions (403,23 > 593,30 Da de <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup> et 888,88 > 1150,49 Da de <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup>) venant « normaliser » la réponse de la première grâce au ratio décrit dans le Tableau 3. Si l'utilisation de plusieurs transitions de plusieurs peptides est déjà décrite par Furlong M.T. *et al*, l'utilisation du ratio pourrait être un paramètre supplémentaire dans l'appréhension de ces phénomènes d'instabilité des peptides et de variabilité de la réponse au MS. Par ailleurs, ce travail suggère de limiter l'utilisation des transitions SRM impliquant des fragments (ion « fils ») de petite taille (888,88 > 175,12 Da par exemple), comme illustré dans l'Annexe 5, potentiellement plus à risque d'interférence, malgré le fait qu'elles présentent une meilleure réponse MS pouvant améliorer la sensibilité. En effet, 175,12 Da étant la masse d'un résidu Arginine (R) seul, il peut être issu de la fragmentation de nombreux peptides.

Il existe différentes stratégies de simplification de l'échantillon que van den Broek *et al* ont passé en revue (73) et qui permettent d'atteindre un niveau de sensibilité variable. Les principales sont :

- la déplétion en albumine (protéine plasmatique majoritaire avec une concentration de 35 à 45 g/L) consistant à capter celle-ci à l'aide d'anticorps spécifiques. C'est l'exemple décrit par Hagman C *et al* (86) pour la quantification d'un mAb non précisé (Novartis).
- les techniques d'enrichissement, qui consistent à capter uniquement la protéine d'intérêt grâce à la reconnaissance d'un épitope spécifique (fragment Fc ou Fab) par un anticorps spécifique (on parle d'immunocapture), ou grâce à la protéine A ou la protéine G (on parle alors d'enrichissement par immunoaffinité). Ces deux techniques, sont d'après la revue de van den Broek, celles permettant d'obtenir les meilleures sensibilités.

A noter toutefois que cette revue ne reprend pas seulement des dosages de mAbs mais de nombreux biomarqueurs biologiques. La technique d'enrichissement sur protéine A/G est une technique déjà employée pour le dosage de mAbs. Legeron *et al* l'ont mise en place pour le dosage du Bévacizumab (71), Willeman *et al* pour leur dosage multiplexe de 7 mAbs (70) et la méthodologie pour le dosage d'un anticorps anti-PCSK9 (utilisé dans les hypercholestérolémies) décrite par Zhang *et al* en est un autre exemple (87). L'utilisation de la protéine A (ne retenant pas l'isotype IgG3) permet de s'affranchir d'une partie des immunoglobulines même si leur proportion est relativement faible par rapport aux IgG totales, 2,3% en moyenne dans nos essais. D'autant que parmi les mAbs humanisés ou humains produits à ce jour (18) aucun n'est produit à partir de l'isotype IgG3, ne restreignant ainsi pas son usage à venir pour d'autres mAbs.

Par ailleurs, les résultats de rendement de purification ont été obtenus sur des échantillons dans des conditions (dilution au demi dans du PBS) supposées garantir une capacité de fixation maximale par la protéine A. Toutefois, on observe une perte importante des IgG totales et donc un défaut de fixation des Ig à la résine. Peu de données bibliographiques sont néanmoins publiées à ce sujet pour étayer les éventuelles causes. L'optimisation du tampon de liaison pourrait être une piste pour améliorer le rendement de fixation des Ig totales.

Des études récentes de dosage de mAbs dans le cadre de STP potentialisent la purification en concentrant les échantillons :

- par ultracentrifugation, c'est l'exemple de Legeron *et al* utilisant des filtres retenant les Ig
- par évaporation du tampon d'élution (ACN/H<sub>2</sub>O), dans l'article de Jourdil *et al* ou Willeman *et al* (69,70).

Au cours du développement, nous avons comparé les résultats obtenus avec concentration d'échantillons sur filtre et en absence de concentration d'échantillon pur (saturant la résine de protéine A). Les intensités détectées par le spectromètre de masse ainsi que les aires de pics chromatographiques des transitions d'intérêts étaient suffisantes en absence de concentration pour éviter cette étape intermédiaire, probablement grâce à la très bonne sensibilité de l'appareillage utilisé.

La protéolyse à la trypsine est également un facteur critique pour l'analyse des mAbs. On s'aperçoit qu'en fonction du temps de digestion (8h vs 12h) la réponse en MS est variable. La différence reste relativement faible mais ceci illustre néanmoins qu'il y a bien une cinétique « de formation » (qui plus est variable) en fonction des peptides, comme le souligne l'équipe de van den Broek (73). Legeron *et al* met en évidence une cinétique d'apparition de peptides spécifiques du Bévacicumab, mais aussi une dégradation au fil du temps pour certains (71). Nous avons donc testé différents ratios de trypsine dans le protéolysat, en commençant par les recommandations du fournisseur (1 mole de TRP pour 20 moles de protéine, d'immunoglobuline en l'occurrence). Les résultats présentés par Legeron *et al* nous ont également incité à évaluer l'impact d'un ratio plus faible. Les résultats obtenus suggèrent une meilleure efficacité de la TRP au ratio 1/60 (mol/mol d'Ig) notamment dans les concentrations basses (Tableau 6). Les travaux de Legeron *et al* montre également une efficacité supérieure à un ratio plus élevé (1/40 vs 1/60) sur certains peptides candidats du Bévacicumab (71).

Concernant l'étalonnage interne, deux principales stratégies dans le dosage des mAbs utilisent un marquage isotopique (*stable isotope*). Il est caractérisé par la substitution d'un ou plusieurs atomes par un de leur isotope, généralement : <sup>1</sup>H par <sup>2</sup>H, <sup>12</sup>C par <sup>13</sup>C ou <sup>14</sup>N par <sup>15</sup>N. Lorsque cet isotope est incorporé à un peptide (SIL-peptide) ou un mAb « SIL-mAb », il se différencie en MS par sa masse additionnelle.

Nous avons opté pour la stratégie du SIL-peptide moins couteux mais présentant toutefois l'inconvénient (rapport au SIL-mAb) de ne pouvoir être intégré au début du process de préparation de l'échantillon. Néanmoins la sélection d'une séquence spécifique de l'ECZ analogue, avec un même temps de rétention chromatographique et des transitions SRM quasi identiques (seul l'isotope change), permet d'assurer une quantification absolue suffisante. De plus, la préparation en parallèle de la gamme d'étalonnage et des CIQ dans chaque série de dosages permet de s'affranchir des biais potentiels créés par l'absence du SIL-peptide lors de l'étape de purification.

La méthode de dosage plasmatique de l'ECZ a été validée conformément aux recommandations de l'organisme accréditeur COFRAC (88) et de l'EMA (72).

La spécificité de l'analyse a été jugée satisfaisante dans le cas de ce dosage par UPLC-MS/MS puisqu'elle est intrinsèque à la méthodologie employée. L'identification *in silico* et expérimentale de l'Emicizumab permettent de garantir la spécificité de l'analyte à doser vis-à-vis des autres protéines présentes dans l'échantillon après digestion par la TRP.

Les conditions chromatographiques séparatives déterminent de surcroît, pour les peptides recherchés, des temps de rétention ( $t_r$ ) connus et reproductibles. La linéarité, mesurée par la régression (pondérée d'un facteur  $1/X$ ) des courbes de calibration ( $n=6$ ) entre 3 et 120  $\mu\text{g/mL}$ , le point bas de calibration étant défini comme la LLOQ (72), est conforme aux recommandations avec un coefficient de détermination ( $r^2$ ) supérieur à 0,99. La justesse et la précision des standards de calibration en quatre points sont conformes, comprises respectivement entre -3,3 et 16,1% (justesse) et entre 4,4 et 14,9% (CV). La limite haute de linéarité à 240  $\mu\text{g/mL}$  n'a cependant pas été validée, avec des critères de performances non conformes ( $\text{CV} > 20\%$ ). Ceci s'explique par une saturation du détecteur dans ces conditions de préparation d'échantillons, avec un signal atteignant un plateau, n'étant plus proportionnel à la concentration en ECZ. La répétabilité et la fidélité intermédiaire de deux niveaux de contrôle qualité (20 et 80  $\mu\text{g/mL}$ ), ainsi que de la limite de linéarité basse définie comme la limite basse de quantification (LLOQ) et haute ont été évaluées sur les mêmes critères de performances et sont également conformes :

justesse et CV inférieurs à 20%. Selon les premières données publiées, les concentrations en ECZ à l'état d'équilibre seraient de l'ordre de 30 à 80 µg/mL (5,6,11), après administration aux posologies usuelles, ce qui nous permet de valider notre limite de linéarité haute à 120 µg/mL (point haut de la gamme de calibration). Dans la technique multiplexe de Willeman *et al*, les limites de quantification sont fixées à 1 µg/mL pour les mAbs testés sauf pour le Rituximab à 5 µg/mL (70). Néanmoins, dans l'essai de phase 3 décrit par Oldenburg *et al*, l'administration d'ECZ chez 102 patients HA de la première dose de charge de 3 mg/kg, les concentrations plasmatiques résiduelles (juste avant une nouvelle administration), sont comprises entre 10 et 25 µg/ml (5). La LLOQ de notre méthode de dosage (3 µg/mL) semble donc adaptée, même pour quantification après une première injection sous-cutanée d'ECZ. De plus, notre limite de détection, déterminée à 1 µg/mL, est la valeur seuil définie permettant de certifier l'absence ou la présence d'ECZ jusqu'à la LLOQ.

La contamination inter-échantillons, évaluée à 0,06 %, est conforme aux exigences fixées. A noter qu'au fil du développement la mise en évidence d'une contamination de la résine de purification a été mise en évidence par une déviation plus importante des concentrations mesurées par rapport aux concentrations cibles, et des CV plus fluctuant, notamment dans les concentrations basses (données de validation). Une évaluation de cette contamination « résine de purification » doit être envisagée par la réalisation d'un blanc sérum systématique.

Les données de stabilité de l'ECZ (durées et températures de conservation des échantillons) n'ont pas été évaluées dans ce travail. L'étude de stabilité devra cependant être réalisée pour la demande d'accréditation de l'analyse. D'un point de vue pratique, dans le cadre d'un dosage qui pourrait être réalisé en routine de façon hebdomadaire ou mensuelle, les données de stabilité à +4°C durant 72h, -20°C durant un mois et -80°C au-delà d'un mois seraient intéressantes.

Compte tenu de ce qui a été rapporté précédemment sur la variabilité de la protéolyse à la trypsine et de la stabilité des peptides (71,73), nous avons évalué la reproductibilité du ratio des transitions au cours du développement. Elle a été estimée, sur 20 mesures de concentration d'ECZ dans des conditions de digestion et de purification variables. Le CV du ratio varie 3 à 4% dans le cas des ratios de transitions d'un même peptide (aire de [SRM 756,33 > 1110,46 Da] / [SRM 756,33 >

575,27 Da] par exemple) et de 20 à 28% si les transitions sont issues de peptides différents. Bien que non décrit dans la littérature, ce ratio s'apparente au suivi de reproductibilité des aires de l'étalon interne (SIL-mAb soumis à la digestion) décrit par Willeman *et al* (70). Cela permettrait alors d'évaluer la reproductibilité de la digestion protéique.

Quelques plasmas citratés de patients HA traités par ECZ (collectés dans le cadre du projet EMICARE) ont été analysés lors de notre travail. Les résultats tiennent compte du facteur de dilution (9/10) de l'échantillon au moment du prélèvement (lié au volume de citrate de sodium présent dans les tubes). A noter qu'aucune comparaison entre la matrice plasma citraté et la matrice sérum n'a été réalisée à ce jour. Des essais confrontant plasma et sérum, réalisés par Jourdil *et al* sur l'Infliximab et l'Adalimumab, ont montré des résultats comparables pour plusieurs niveaux de CQ (69). Il serait alors pertinent de confirmer ces résultats pour l'ECZ grâce à la plasma/sérothèque d'EMICARE.

Les concentrations obtenues pour les trois patients (n=13 dosages) sont de l'ordre des concentrations obtenues dans les essais cliniques (5,6,47,89), tenant compte du fait que les méthodes sont différentes. Chaque patient présente une cinétique des concentrations qui lui est propre. Le premier, « TOU », a atteint l'état d'équilibre, et cliniquement n'a présenté aucun évènement indésirable durant la période. Sa concentration moyenne à l'équilibre, mesurée par la technique UPLC-MS/MS mise en place, est de 28,0 µg/mL est cependant en deçà de la concentration moyenne de 46,7 µg/mL décrite par Le Quellec *et al* (11), à posologie identique. Pour le patient « NIV », en situation clinique stable également, la période correspond à l'induction du traitement (dose de charge de 3 mg/kg/semaine). Après la première injection, la concentration est à 12 µg/mL argumentant les propos précédents sur la LLOQ (théoriquement suffisante à 3 µg/mL). A l'issue de la période d'induction de quatre semaines, il ne semble pas avoir tout à fait atteint l'état d'équilibre avec une concentration à 35,8 µg/mL. Ces résultats confortent néanmoins l'idée de variabilité inter-individuelle mise en évidence par Le Quellec *et al*, faisant la revue des études pharmacocinétiques en fonction du schéma posologique (Figure 1) (11). Cette variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique de l'ECZ est un argument

important pour proposer un suivi thérapeutique et pharmacologique de cet anticorps. Enfin, pour le patient « HAR », suite à son hémorragie intracrânienne survenue sous traitement par ECZ, sans argument pour une étiologie traumatique, les concentrations mesurées, à l'état d'équilibre, plus de 4 semaines après reprise du traitement par ECZ (date de reprise inconnue) sont inférieures à nouveau aux concentrations observées dans les essais cliniques (11), que ce soit par dosage UPLC-MS/MS ou par dosage chromatographique.

L'ensemble de ces résultats a été confronté au dosage d'activité Emicizumab réalisé dans le laboratoire d'hémostase. On observe que les concentrations mesurées par la technique UPLC-MS/MS ont une tendance à être inférieures aux mesures d'activité de l'Emicizumab par technique chromatographique (Figure 21). Le nombre de données est cependant insuffisant pour mener une analyse statistique de comparaison des deux techniques de dosage (n=11). L'activité Emicizumab, utilisée par Nougier *et al* pour une cohorte de vingt patients sous ECZ, montre à nouveau la variabilité à l'état d'équilibre des concentrations (10 semaines post-induction) comprise entre 27,0 et 80,6 µg/ml (15). De la même manière, la mesure de concentration d'ECZ par ELISA, technique utilisée lors des essais cliniques, serait potentiellement différente des résultats par MS et pourrait justifier l'utilisation d'une méthode spécifique de quantification absolue de l'ECZ par MS. Une étude récente de modélisation des données PK/PD de l'ECZ a suggéré que le bénéfice sur la réduction du taux annuel de saignement (*ABR annualized bleeding rate*) atteint un plateau au-delà d'une concentration de 30 µg/mL (90). Cette donnée serait intéressante à confronter aux données obtenues dans le cadre du projet EMICARE, visant à définir une valeur seuil d'ECZ prédictive de la survenue d'au moins un saignement cliniquement significatif dans les 6 mois après l'induction du traitement, en établissant une courbe ROC. Cette méthodologie statistique a notamment été employée par Willeman *et al*, pour évaluer le pourcentage de rémission de patients atteints de la maladie de Crohn en fonction de la concentration résiduelle en Adalimumab (70). Après avoir mis en évidence la variabilité individuelle pharmacocinétique et pharmacodynamique associée à l'utilisation des biothérapies de nature protéique comme les anticorps monoclonaux, quelques équipes mettent en avant le bénéfice d'un STP individualisé. Comme il est d'usage pour les mAbs anti-inflammatoires (anti-TNFα) (91). On peut souhaiter qu'une analyse multifactorielle plus large des patients HA sous

Emicizumab, intégrant les données démographiques, les évolutions de la maladie, de leurs prises en charge, l'observance du traitement ou encore l'apparition éventuelle d'ADA puisse appuyer l'intérêt d'un STP de l'Emicizumab.

## Conclusion

Le travail mené a permis la mise au point et la validation d'une méthode d'analyse quantitative par UPLC-MS/MS, à la fois spécifique, répétable et fidèle, de l'Emicizumab, en appliquant les principes de l'analyse protéomique.

L'utilisation des outils *in silico* et l'identification expérimentale, par spectrométrie de masse, appliqué au dosage des anticorps monoclonaux, est une méthodologie innovante encore peu réalisée dans les laboratoires de pharmacologie en France. Certaines étapes du développement analytique et de la mise en conformité vis-à-vis des exigences de qualité appliquées aux LBM, sont discutables tant le processus analytique, dans son ensemble, est complexe. *A fortiori*, l'optimisation d'une méthode analytique doit toujours être mise en parallèle de sa pertinence dans le contexte médicale. La technique doit être utile, satisfaire à son usage en tenant compte des facteurs limitants qui doivent être connus du biologiste médical.

Le dosage de l'Emicizumab pourrait ainsi s'intégrer dans une stratégie globale de prise en charge clinico-biologique des patients atteints d'hémophilie A. Au-delà de ce développement, la spécificité de la spectrométrie de masse est un atout majeur, et une telle méthodologie pourra être appliquée aux dosages d'autres anticorps monoclonaux thérapeutiques au CHU de Lille.



## Bibliographie

1. Chambost H, Gaboulaud V, Coatmélec B, Rafowicz A, Schneider P, Calvez T. What factors influence the age at diagnosis of hemophilia? Results of the French hemophilia cohort. *The Journal of Pediatrics*. 2002;141(4):548-52.
2. Carcao M, Goudemand J. INHIBITORS IN HEMOPHILIA: A PRIMER. :24.
3. Schep SJ, Schutgens REG, Fischer K, Boes ML. Review of immune tolerance induction in hemophilia A. *Blood Reviews*. 2018;32(4):326-38.
4. Haute Autorité de Santé. Commission de la transparence - Avis Emicizumab. Direction de l'Évaluation Médicale, Économique et de Santé Publique; 2018.
5. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, Schmitt C, Callaghan MU, Young G, et al. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med*. 2017;377(9):809-18.
6. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med*. 2018;379(9):811-22.
7. European Medicine agency. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP) - Hemlibra (Emicizumab). 2019.
8. Haute Autorité de Santé. Commission de la transparence - Avis Emicizumab. Direction de l'Évaluation Médicale, Économique et de Santé Publique; 2019.
9. Reyes A, Révil C, Niggli M, Chebon S, Schlagmüller S, Flacke J-P, et al. Efficacy of emicizumab prophylaxis versus factor VIII prophylaxis for treatment of hemophilia A without inhibitors: network meta-analysis and sub-group analyses of the intra-patient comparison of the HAVEN 3 trial. *Current Medical Research and Opinion*. 2019;35(12):2079-87.
10. Scott LJ, Kim ES. Emicizumab-kxwh: First Global Approval. *Drugs*. févr 2018;78(2):269-74.
11. Le Quellec S. Clinical Evidence and Safety Profile of Emicizumab for the Management of Children with Hemophilia A. *DDDT*. 2020;Volume 14:469-81.
12. Adamkewicz JI, Chen DC, Paz-Priel I. Effects and Interferences of Emicizumab, a Humanised Bispecific Antibody Mimicking Activated Factor VIII Cofactor Function, on Coagulation Assays. *Thromb Haemost*. 2019;119(07):1084-93.

13. Müller J, Pekrul I, Pötzsch B, Berning B, Oldenburg J, Spannagl M. Laboratory Monitoring in Emicizumab-Treated Persons with Hemophilia A. *Thromb Haemost.* 2019;119(09):1384-93.
14. Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia.* 2020;26(3):536-42.
15. Nougier C, Jeanpierre E, Ternisien C, Proulle V, Hezard N, Pouplard C, et al. Emicizumab treatment: Impact on coagulation tests and biological monitoring of haemostasis according to clinical situations (BIMHO group proposals). *Eur J Haematol.* 2020;ejh.13490.
16. Ribatti D. Edelman's view on the discovery of antibodies. *Immunology Letters.* 2015;164(2):72-5.
17. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *mAbs.* 2019;11(2):219-38.
18. Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US [Internet]. The Antibody Society. 2020. Disponible sur: <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>
19. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs.* 2015;7(1):9-14.
20. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-J, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1.
21. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-7.
22. Socié G, Milpied N, Yakoub-Agha I, Bay J-O, Fürst S, Bilger K, et al. Long-term follow-up of a phase 3 clinical trial of inolimomab for the treatment of primary steroid refractory aGVHD. *Blood Advances.* 2019;3(2):184-6.
23. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1984;81(21):6851-5.
24. Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nature Medicine.* 2003;9(1):129-34.

25. EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 1994;330(14):956-61.
26. Maloney DG, Grillo-López AJ, Bodkin DJ, White CA, Liles TM, Royston I, et al. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 1997;15(10):3266-74.
27. Hwang WYK, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods.* 2005;36(1):3-10.
28. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 1986;321(6069):522-5.
29. Gorman SD, Clark MR. Humanisation of Monoclonal Antibodies for Therapy. *Seminars in Immunology.* 1990;2(6):457-66.
30. Mountain A, Adair JR. Engineering Antibodies for Therapy. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 1992;10(1):1-142.
31. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 1990;348(6301):552-4.
32. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet.* 1994;7(1):13-21.
33. A den B, L van de P, R R, M S, P VR, O S, et al. A single dose, placebo controlled study of the fully human anti-tumor necrosis factor-alpha antibody adalimumab (D2E7) in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* [Internet]. 2002 [cité 1 sept 2020];29(11). Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/12415583/>
34. Preeta T. Recent results and ongoing trials with panitumumab (ABX-EGF), a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer.* 2005;5(1):21-3.
35. Wu C-H, Liu I-J, Lu R-M, Wu H-C. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *J Biomed Sci.* 2016;23(1):8.
36. Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, Parren PWHI. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(8):585-608.

37. Rudkin FM, Raziunaite I, Workman H, Essono S, Belmonte R, MacCallum DM, et al. Single human B cell-derived monoclonal anti-Candida antibodies enhance phagocytosis and protect against disseminated candidiasis. *Nat Commun.* 2018;9(1):5288.
38. Cox KS, Tang A, Chen Z, Horton MS, Yan H, Wang X-M, et al. Rapid isolation of dengue-neutralizing antibodies from single cell-sorted human antigen-specific memory B-cell cultures. *mAbs.* 2016;8(1):129-40.
39. Mulangu S, Dodd LE, Davey RT, Tshiani Mbaya O, Proschan M, Mukadi D, et al. A Randomized, Controlled Trial of Ebola Virus Disease Therapeutics. *N Engl J Med.* 2019;381(24):2293-303.
40. Haute Autorité de Santé. Dépistage et diagnostic dans le cadre du COVID-19 [Internet]. Haute Autorité de Santé. 2020. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3178536/fr/depistage-et-diagnostic-dans-le-cadre-du-covid-19](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3178536/fr/depistage-et-diagnostic-dans-le-cadre-du-covid-19)
41. Regeneron Pharmaceuticals. A Master Protocol Assessing the Safety, Tolerability, and Efficacy of Anti-Spike (S) SARS-CoV-2 Monoclonal Antibodies for the Treatment of Hospitalized Patients With COVID-19 [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2020 [cité 14 oct 2020]. Report No.: NCT04426695. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04426695>
42. Eli Lilly and Company pharmaceuticals. A Study of LY3819253 (LY-CoV555) and LY3832479 (LY-CoV016) in Participants With Mild to Moderate COVID-19 Illness - Full Text View - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) [Internet]. 2020. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04427501>
43. Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, Ishii S, Soeda T, Muto A, et al. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *Thromb Haemost.* 2017;117(07):1348-57.
44. Tabrizi MA, Tseng C-ML, Roskos LK. Elimination mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies. 2006;11(1):8.
45. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Jr GWS, Holmgren E, Benjamin R, et al. Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of Recombinant Human Anti-Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2016 [cité 26 oct 2020]; Disponible sur: <https://ascopubs-org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/doi/pdf/10.1200/JCO.2001.19.3.843>

46. Rispens T, Leeuwen A van, Vennegoor A, Killestein J, Aalberse RC, Wolbink GJ, et al. Measurement of serum levels of natalizumab, an immunoglobulin G4 therapeutic monoclonal antibody. *Analytical Biochemistry*. 2011;411(2):271-6.
47. Shima M, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Sato T, Fukutake K, et al. Long-term safety and efficacy of emicizumab in a phase 1/2 study in patients with hemophilia A with or without inhibitors. *Blood Advances*. 2017;1(22):1891-9.
48. Gaudinski MR, Coates EE, Novik L, Widge A, Houser KV, Burch E, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and immunogenicity of the therapeutic monoclonal antibody mAb114 targeting Ebola virus glycoprotein (VRC 608): an open-label phase 1 study. *The Lancet*. 2019;393(10174):889-98.
49. Schwickart M, Vainshtein I, Lee R, Schneider A, Liang M. Interference in immunoassays to support therapeutic antibody development in preclinical and clinical studies. *Bioanalysis*. 2014;6(14):1939-51.
50. Song S, Yang L, Trepicchio WL, Wyant T. Understanding the Supersensitive Anti-Drug Antibody Assay: Unexpected High Anti-Drug Antibody Incidence and Its Clinical Relevance. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:1-8.
51. European Medicines Agency. Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins [Internet]. 2015. Disponible sur: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-immunogenicity-assessment-biotechnology-derived-therapeutic-proteins-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-immunogenicity-assessment-biotechnology-derived-therapeutic-proteins-revision-1_en.pdf)
52. US Department of Health and Human Services, US FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products —Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection Guidance for Industry [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.fda.gov/media/119788/download>
53. James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quart Rev Biophys*. 1997;30(4):279-331.
54. Kavallaris M, Marshall GM. Proteomics and disease: opportunities and challenges. *Medical Journal of Australia*. 2005;182(11):575-9.
55. Xiao Z, Prieto D, Conrads TP, Veenstra TD, Issaq HJ. Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2005;230(1):95-106.

56. Abbatiello SE, Schilling B, Mani DR, Zimmerman LJ, Hall SC, MacLean B, et al. Large-Scale Interlaboratory Study to Develop, Analytically Validate and Apply Highly Multiplexed, Quantitative Peptide Assays to Measure Cancer-Relevant Proteins in Plasma. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(9):2357-74.
57. Anderson NL, Anderson NG, Haines LR, Hardie DB, Olafson RW, Pearson TW. Mass Spectrometric Quantitation of Peptides and Proteins Using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J Proteome Res*. 2004;3(2):235-44.
58. SIB - Digestion Proteine [Internet]. [cité 30 oct 2020]. Disponible sur: [http://education.expasy.org/bioinformatique/Digestion\\_proteine.html](http://education.expasy.org/bioinformatique/Digestion_proteine.html)
59. MS-Digest Instructions [Internet]. [cité 9 nov 2020]. Disponible sur: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/html/instruct/digestman.htm>
60. Takeuchi T, Miyasaka N, Inoue K, Abe T, Koike T. Impact of trough serum level on radiographic and clinical response to infliximab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: results from the RISING study. *Modern Rheumatology*. 2009;19(5):478-87.
61. Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, Colombel J, D'Haens G, Wolf DC, et al. Adalimumab Induces and Maintains Clinical Remission in Patients With Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2012;142(2):257-265.e3.
62. Jun Yang, Hong Zhao, Christine Garnett, Atiquir rahman, Jogarao V.Gobburu, William Pierce, Genevieve Schechter, Jeffery Summers, Patricia Keegan, Brian Booth, Yaning Wang. The Combination of Exposure-Response and Case-Control Analyses in Regulatory Decision Making. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2013;53(2):7.
63. Verstockt B, Moors G, Bian S, Van Stappen T, Van Assche G, Vermeire S, et al. Influence of early adalimumab serum levels on immunogenicity and long-term outcome of anti-TNF naive Crohn's disease patients: the usefulness of rapid testing. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;48(7):731-9.
64. Nemoz B, Ternant D, Bailly S, Gautier-Veyret E, Jourdil J, Bonaz B, et al. New steps in infliximab therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel diseases. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(4):722-8.
65. Feng Y, Wang X, Bajaj G, Agrawal S, Bello A, Lestini B, et al. Nivolumab Exposure–Response Analyses of Efficacy and Safety in Previously Treated

- Squamous or Nonsquamous Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(18):5394-405.
66. Li H, Ortiz R, Tran L, Hall M, Spahr C, Walker K, et al. General LC-MS/MS Method Approach to Quantify Therapeutic Monoclonal Antibodies Using a Common Whole Antibody Internal Standard with Application to Preclinical Studies. *Anal Chem.* 2012;84(3):1267-73.
  67. Xu K, Liu L, Maia M, Li J, Lowe J, Song A, et al. A multiplexed hybrid LC–MS/MS pharmacokinetic assay to measure two co-administered monoclonal antibodies in a clinical study. *Bioanalysis.* 2014;6(13):1781-94.
  68. Zhang Z, Hu W, Li L, Ding H, Li H. Therapeutic monoclonal antibodies and clinical laboratory tests: When, why, and what is expected? *J Clin Lab Anal.* 2018;32(3):e22307.
  69. Jourdil J-F, Némoz B, Gautier-Veyret E, Romero C, Stanke-Labesque F. Simultaneous Quantification of Adalimumab and Infliximab in Human Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Therapeutic Drug Monitoring. 2018;40(4):417-24.
  70. Willeman T, Jourdil J-F, Gautier-Veyret E, Bonaz B, Stanke-Labesque F. A multiplex liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of seven therapeutic monoclonal antibodies: Application for adalimumab therapeutic drug monitoring in patients with Crohn’s disease. *Analytica Chimica Acta.* 2019;1067:63-70.
  71. Legeron R, Xuereb F, Chaignepain S, Gadeau A-P, Claverol S, Dupuy J-W, et al. A new reliable, transposable and cost-effective assay for absolute quantification of total plasmatic bevacizumab by LC–MS/MS in human plasma comparing two internal standard calibration approaches. *Journal of Chromatography B.* 2017;1070:43-53.
  72. European Medicines Agency (Committee for Medicinal Product for Human Use). Guideline on bioanalytical method validation [Internet]. 2011. Disponible sur: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)
  73. van den Broek I, Niessen WMA, van Dongen WD. Bioanalytical LC–MS/MS of protein-based biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography B.* 2013;929:161-79.

74. Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1988;16(1-12):99-111.
75. PROTEOMICS TOOLKIT [Internet]. [cité 31 oct 2020]. Disponible sur: <http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FraglonServlet.html>
76. Wille SMR, Peters FT, Di Fazio V, Samyn N. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. *Accreditation and Quality Assurance.* juin 2011;16(6):279-92.
77. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody for the Therapy of Solid Tumors and Other Disorders. *Cancer Research.* 1997;57(20):4593-9.
78. Dubois M, Fenaille F, Clement G, Lechmann M, Tabet J-C, Ezan E, et al. Immunopurification and Mass Spectrometric Quantification of the Active Form of a Chimeric Therapeutic Antibody in Human Serum. *Anal Chem.* 2008;80(5):1737-45.
79. Fernández Ocaña M, James IT, Kabir M, Grace C, Yuan G, Martin SW, et al. Clinical Pharmacokinetic Assessment of an Anti-MAdCAM Monoclonal Antibody Therapeutic by LC-MS/MS. *Anal Chem.* 2012;84(14):5959-67.
80. Jiang H, Zeng J, Titsch C, Voronin K, Akinsanya B, Luo L, et al. Fully Validated LC-MS/MS Assay for the Simultaneous Quantitation of Coadministered Therapeutic Antibodies in Cynomolgus Monkey Serum. *Anal Chem.* 2013;85(20):9859-67.
81. Gilles JGG, Arnout J, Saint-Remy J-MR. Anti-Factor VI11 Antibodies of Hemophilic Patients Are Frequently Directed Towards Nonfunctional Determinants and Do Not Exhibit Isotypic Restriction. *Blood.* 1993;82(8):2452-61.
82. Sanges S, Jeanpierre E, Lopez B, Russick J, Delignat S, Dubois R, et al. Association hémophilie acquise et maladie associée aux IgG4 : présentation d'un cas et étude physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne.* 2019;40:A161.
83. Wegner A, Weindl D, Jäger C, Sapcariu SC, Dong X, Stephanopoulos G, et al. Fragment Formula Calculator (FFC): Determination of Chemical Formulas for Fragment Ions in Mass Spectrometric Data. *Anal Chem.* 2014;86(4):2221-8.

84. Arsene CG, Henrion A, Diekmann N, Manolopoulou J, Bidlingmaier M. Quantification of growth hormone in serum by isotope dilution mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2010;401(2):228-35.
85. Duan X, Abuqayyas L, Dai L, Balthasar JP, Qu J. High-Throughput Method Development for Sensitive, Accurate, and Reproducible Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibodies in Tissues Using Orthogonal Array Optimization and Nano Liquid Chromatography/Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2012;84(10):4373-82.
86. Hagman C, Ricke D, Ewert S, Bek S, Falchetto R, Bitsch F. Absolute Quantification of Monoclonal Antibodies in Biofluids by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2008;80(4):1290-6.
87. Zhang Q, Spellman DS, Song Y, Choi B, Hatcher NG, Tomazela D, et al. Generic automated method for liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry based monoclonal antibody quantitation for preclinical pharmacokinetic studies. *Anal Chem*. 2014;86(17):8776-84.
88. COFRAC. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. - Révision 01. 2015.
89. Young G, Liesner R, Chang T, Sidonio R, Oldenburg J, Jiménez-Yuste V, et al. A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood*. 2019;134(24):2127-38.
90. Jonsson F, Schmitt C, Petry C, Mercier F, Frey N, Retout S. Exposure-response modeling of Emicizumab for the prophylaxis of bleeding in hemophilia A patients with and without inhibitors against Factor VIII. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019;3(Suppl 1):315.
91. Imamura CK. Therapeutic drug monitoring of monoclonal antibodies: Applicability based on their pharmacokinetic properties. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2019;34(1):14-8.



## Annexes

Annexe 1 – Documents relatifs à la demande d'accréditation d'un examen de biologie médicale : (a) Extrait du document Portées-types d'accréditation SH INF 50 - Révision 06. (b) SH FORM 06 Liste détaillée des examens/analyses demandées à l'accréditation

(a)

Code	Nature de l'échantillon biologique	Nature de l'examen/analyse	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarques (Limitations, paramètres critiques, ...)
BM PT03	Échantillons biologiques d'origine humaine	Recherche, identification ("screening") et/ou détermination de la concentration de xénobiotiques/médicaments  Type de substances : stupéfiants, drogues-toxiques, anabolisants, produits phytosanitaires, autres substances naturelles ou de synthèse, médicaments (analgésiques, antibiotiques, antifongiques, antiparasitaires, antiviraux, anxiolytiques, benzodiazépines, antidépresseurs, anti-épileptiques, neuroleptiques, anesthésiques, immunosuppresseurs, anticancéreux, antihistaminiques, anti-arythmiques, digitaliques, antimétabolites, bronchodilatateurs)	Déprotéinisation, extraction, avec ou sans hydrolyse, avec ou sans dérivation, avec ou sans purification  Chromatographie liquide (LC) avec détection par spectrophotométrie et/ou spectrofluorimétrie et/ou Chromatographie liquide (LC) avec détection par spectrométrie de masse (SM) (*)	Méthodes reconnues (A) Méthodes reconnues, adaptées ou développées (B) (**)	#

Annexe 2 – Séquence d'AA des chaînes lourdes et légère de l'Emicizumab disponible sur <https://www.drugbank.ca/drugs/DB13923>. Domaine variable et constant séparés par //

**CHAINE LOURDE 1**

1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
QVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYDIQWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGQSTYY
61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-120
RREVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARRT	GREYGGGWYF	DYWGQGTLVV
121-130	131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
VSS//ASTKGPS	VFPLAPCSRS	TSESTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
181-190	191-200	201-210	211-220	221-230	231-240
QSSGLYSLSS	VVTVPSSSLG	TQTYTCNVDH	KPSNTKVDKR	VESKYGPPCP	PCPAPEFLGG
241-250	251-260	261-270	271-280	281-290	291-300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCTVVDVS	QEDPEVQFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
301-310	311-320	321-330	331-340	341-350	351-360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKG	LPSSIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSQKE
361-370	371-380	381-390	391-400	401-410	411-420
MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
421-430	431-440	441-448			
QEGNVFSCSV	MHEALHNRYT	QKSLSLSP			

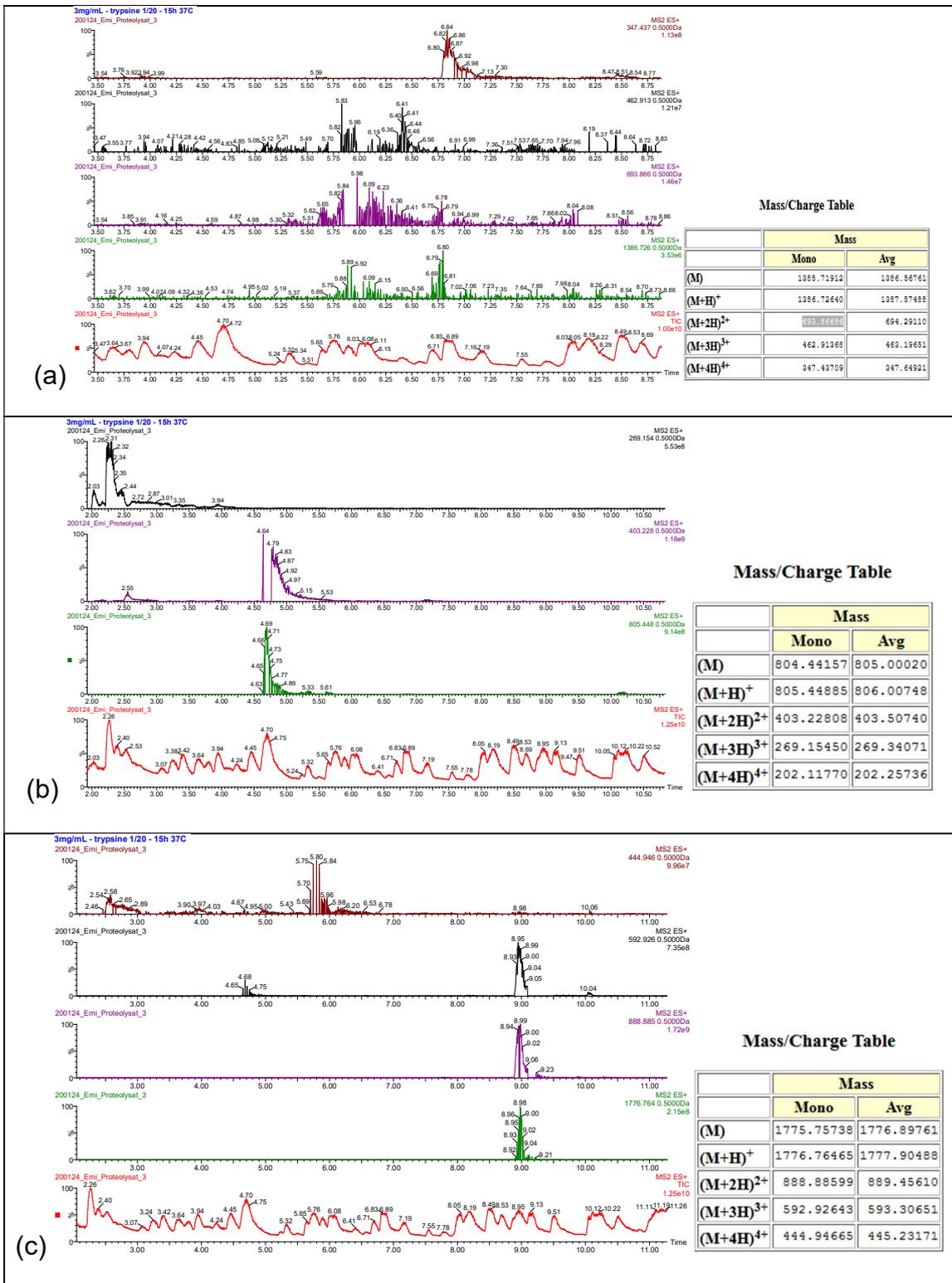
**CHAINE LOURDE 2**

1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
QVQLVQSGSE	LKPGASVKV	SCKASGYTFT	DNNMDWVRQA	PGQGLEWMGD	INTRSGGSIY
61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-120
NEEFQDRVIM	TVDKSTDTAY	MELSSLRSED	TATYHCARRK	SYGYLDEWG	EGTLVTVSS//A
121-130	131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
STKGPSVFPL	APCSRSTSES	TAALGCLVKD	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG
181-190	191-200	201-210	211-220	221-230	231-240
LYSLSSVTV	PSSSLGTQTY	TCNVDHKPSN	TKVDKRVESK	YGPPCPPCPA	PEFLGGPSVF
241-250	251-260	261-270	271-280	281-290	291-300
LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVVSQEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR
301-310	311-320	321-330	331-340	341-350	351-360
VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPSS	IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSQEEMTKN
361-370	371-380	381-390	391-400	401-410	411-420
QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQEGN
421-430	431-440	441-444			
VFSCVMHEA	LHNHYTQESL	SLSP			

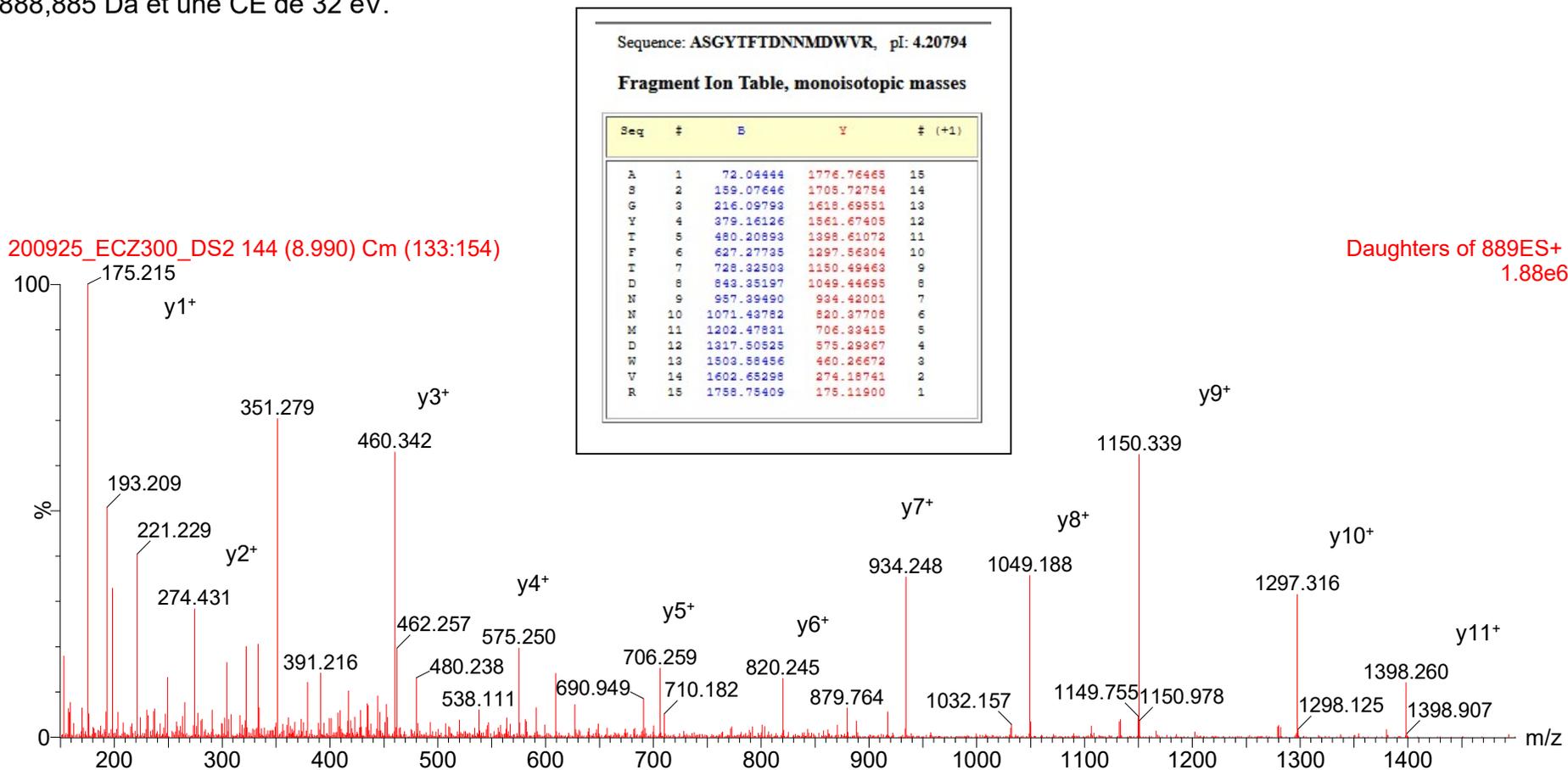
**CHAINE LEGERE**

1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVV	ITCKASRNIE	RQLAWYQQKP	GQAPPELLIYQ	ASRKESGVPD
61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-120
RFSGSRYGTD	FTLTISSLQP	EDIATYYCQQ	YSDPPLTFGG	GTKVEIK//RTV	AAPSVFIFPP
121-130	131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSLSTLT
181-190	191-200	201-210	211-214		
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

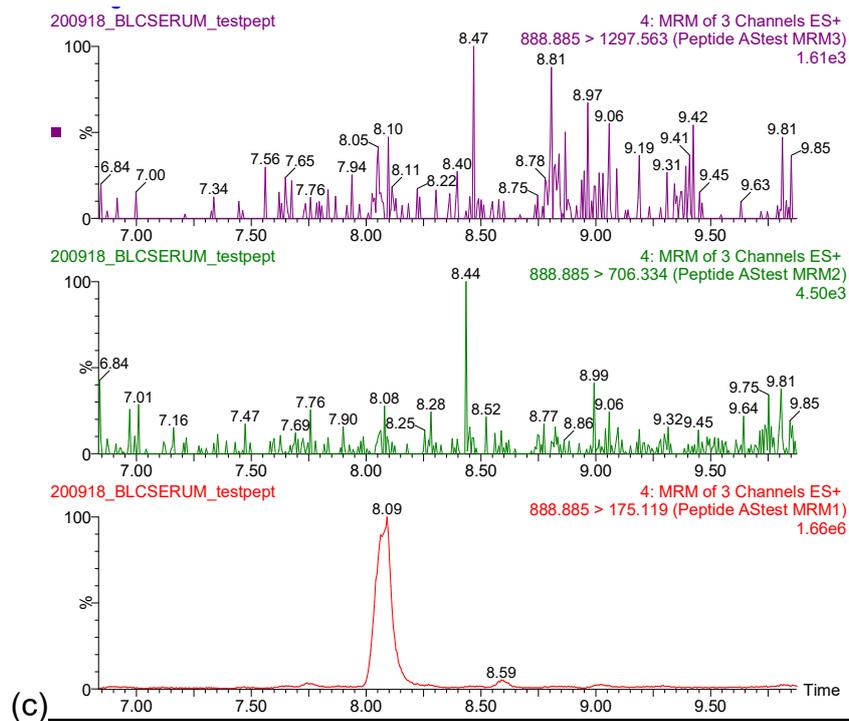
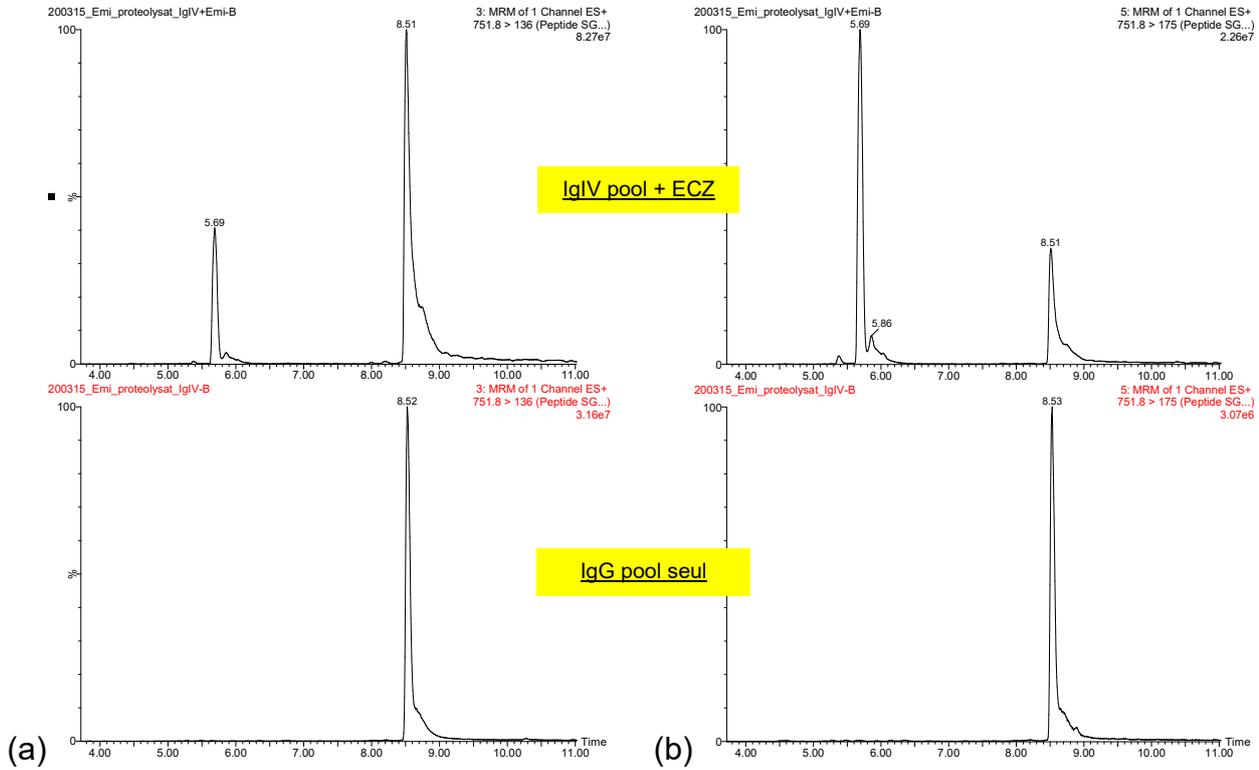
Annexe 3 – Illustration de l'identification des peptides d'intérêts grâce au mode de balayage *fullscan* d'une solution pure à 300µg/mL après digestion protéique. (a) <sup>348</sup>EPQVYTLPPSQK<sup>359</sup>. (b) <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup>. (c) <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup>.



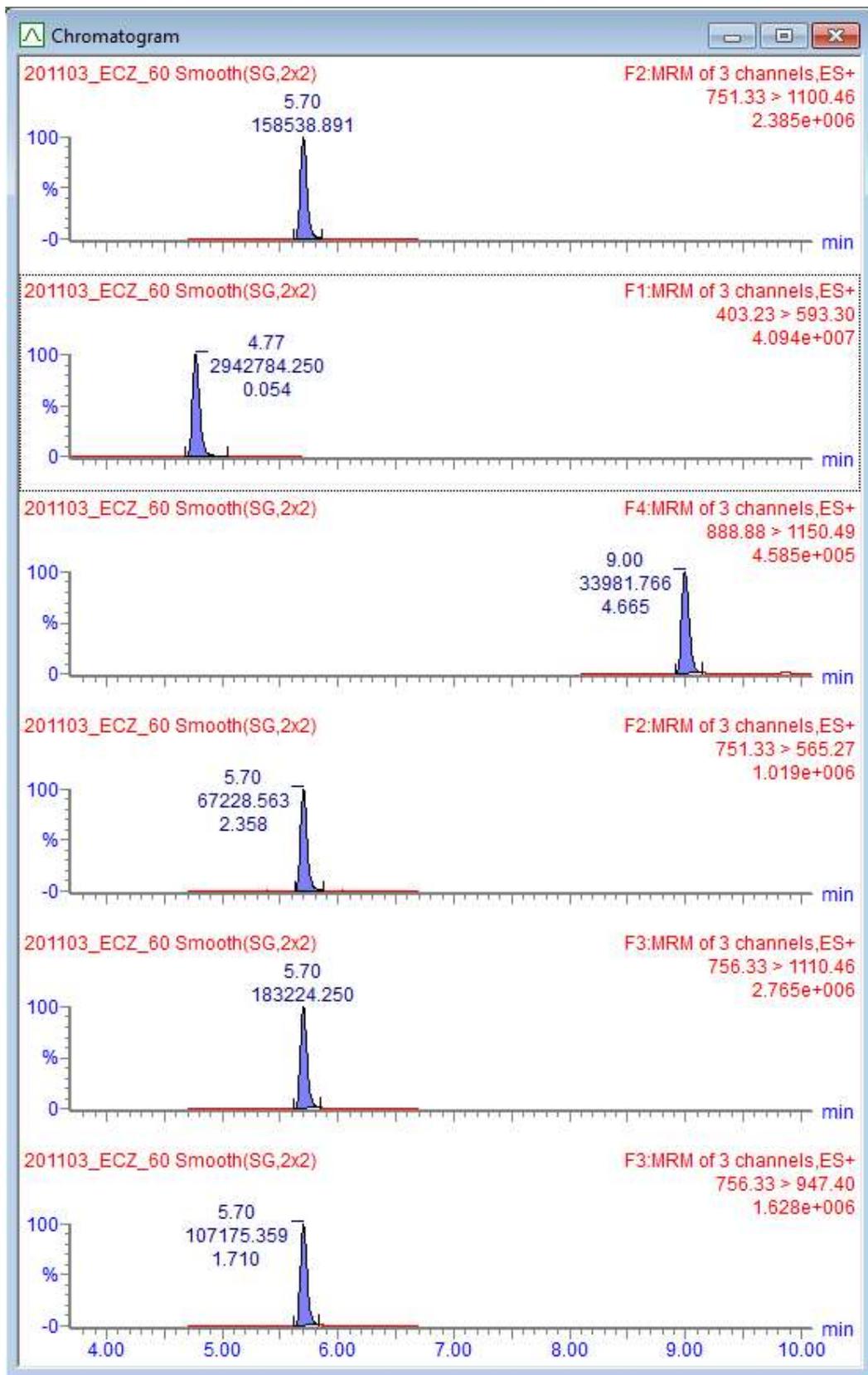
Annexe 4 - Spectre de masse illustrant les fragments y et b générés par *Daughter Scan* du peptide  $^{24}\text{ASGYTFTDNNMDWVR}^{38}$  après digestion à la TRP overnight d'une solution d'ECZ à 300  $\mu\text{g/mL}$ . Sélection de l'ion unimoléculaire  $[\text{M}/2\text{-H}^+]$  de rapport m/z de 888,885 Da et une CE de 32 eV.



Annexe 5 – Illustration du manque de spécificité des transitions SRM, utilisant des ions « fils » de petite masse vis-à-vis du pool IgG polyvalente humaine Clayrig® ou du sérum blanc (a) SRM 751,8 > 136 Da du peptide  $^{55}\text{SGGSIYNEEFQDR}^{67}$  et (b) SRM 751,8 > 175 Da du peptide  $^{55}\text{SGGSIYNEEFQDR}^{67}$  en présence et en absence d'ECZ. (c) SRM 888,885 > 175,119 Da du peptide  $^{24}\text{ASGYTFTDNNMDWVR}^{38}$  dans du sérum blanc sans ECZ.



Annexe 6 – Chromatogrammes obtenus après purification et digestion d'un plasma blanc surchargé en Emicizumab à la concentration de 60 µg/mL. Mise en évidence des différentes transitions SRM définies dans la méthode MRM décrite.



FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)  
Année Universitaire 2020/2021

---

**Nom : LIMA**

**Prénom : Benjamin**

**Titre du mémoire / thèse :** Développement et validation d'une méthode de dosage par UPLC-MS/MS de l'Emicizumab – Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique

**Mots-clés :** Hémophilie A, Protéomique, Analyse *in silico*, MRM, STP, Emicizumab, Dosage UPLC-MS/MS

---

**Résumé :**

**Objectifs :** Ce travail a pour objectif le développement et la validation d'une méthode de dosage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) d'un anticorps monoclonal thérapeutique : l'Emicizumab, HEMLIBRA® indiqué chez les patients atteints d'hémophilie A. Cela permettra de proposer aux cliniciens un suivi thérapeutique pharmacologique (STP) individualisé.

**Matériels et méthodes :** L'identification *in silico* de peptides spécifiques de l'Emicizumab a été réalisée à l'aide d'outils bio-informatiques. L'identification expérimentale a été effectuée sur un système Acquity (Waters) couplé à un XEVO™ TQ-XS, après purification des échantillons plasmatiques. La quantification absolue est faite au moyen d'un étalonnage interne de type SIL-peptide. La validation de la méthode analytique de dosage est réalisée en évaluant les critères de performance conformément aux exigences la norme NF ISO 15189.

**Résultats :** A l'issue du développement, les peptides spécifiques de l'Emicizumab retenus : <sup>55</sup>SGGSIYNEEFQDR<sup>67</sup>, <sup>68</sup>VIMTVDK<sup>74</sup> et <sup>24</sup>ASGYTFTDNNMDWVR<sup>38</sup>, permettent d'assurer une quantification absolue du médicament sur une gamme de concentrations comprises entre 3 et 120 µg/mL avec des critères de performance de répétabilité et fidélité intermédiaire conformes. La méthode a été appliquée avec succès au dosage d'échantillons patients tests.

**Conclusion :** Le dosage de l'Emicizumab par méthode UPLC-MS/MS a été validé et appliqué à des échantillons patients. Cette méthodologie peut être utilisée pour le suivi de cohorte de patients hémophiles traités par Emicizumab, et éventuellement étendue, à l'avenir, aux dosages d'autres anticorps monoclonaux thérapeutiques au CHU de Lille.

---

**Membres du jury :**

**Président :** Pr Delphine Allorge

**Assesseur(s) :** Pr Myriam Labalette et Dr Antoine Rauch

**Directeur de thèse :** Dr Benjamin Hennart