



HAL
open science

Suivi thérapeutique pharmacologique des anticorps monoclonaux thérapeutiques : de l'analytique à l'évaluation de la variabilité pharmacocinétique du rituximab et du tocilizumab

Aurélie Truffot

► **To cite this version:**

Aurélie Truffot. Suivi thérapeutique pharmacologique des anticorps monoclonaux thérapeutiques : de l'analytique à l'évaluation de la variabilité pharmacocinétique du rituximab et du tocilizumab. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03245955

HAL Id: dumas-03245955

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03245955>

Submitted on 2 Jun 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2020

**SUIVI THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE DES ANTICORPS
MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES : DE L'ANALYTIQUE À L'ÉVALUATION
DE LA VARIABILITÉ PHARMACOCINÉTIQUE DU RITUXIMAB ET DU
TOCILIZUMAB**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTAT

Aurélie TRUFFOT

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 04/09/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. le Professeur Pascal MOSSUZ

Membres :

Mme la Docteure Elodie GAUTIER-VEYRET (directrice de thèse)

Mme la Professeure Françoise STANKE-LABESQUE

M. le Professeur Athan BAILLET

M. le Docteur Paolo MALVEZZI

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :

Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2019 - 2020

ENSEIGNANTS – CHERCHEURS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheEMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheEMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUC	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheEMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WIM	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU -PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042
PRCE	FITE	ANDREE	-
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emerite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	WOUESSIDJEW	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institute for Advanced Biosciences
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
 MAST : Maitre de Conférences Associé à Temps Partiel
 MCF : Maitre de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maitre de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

« J'aime mieux avoir des remords que des regrets »

Oscar Wilde

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

A monsieur le Professeur Pascal Mossuz, de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci pour l'intérêt que vous portez à ce sujet.

A madame la Docteure Elodie Gautier-Veyret, de m'avoir brillamment encadrée sur cette thèse, ce fût un réel plaisir de travailler avec toi. Un grand merci pour ton encadrement tout au long de mon cursus d'interne et plus particulièrement lors de mes passages au laboratoire de pharmacologie. Merci pour tous tes conseils, ta bonne humeur, ton perfectionnisme, ta réactivité et ta bienveillance. Continue à garder cette volonté de transmettre ton savoir et d'encadrer !

A madame la Professeure Françoise Stanke, de me faire l'honneur de juger ce travail et de m'avoir fait confiance pour la réalisation de ce projet. Merci pour votre rigueur et votre encadrement sans faille tout au long de mes stages dans votre service et de m'avoir aidé à trouver une équipe de recherche pour la réalisation de mon stage de master 2 à l'étranger. Ce fût pour moi un réel plaisir d'apprendre et de travailler à vos côtés !

A monsieur le Professeur Athan Baillet, de me faire l'honneur de juger ce travail. Merci de votre intérêt et de votre participation à ce travail notamment pour les données cliniques issues de la cohorte ROC et de l'apport de votre appréciation clinique.

A monsieur le Docteur Paolo Malvezzi, de me faire l'honneur de juger ce travail et d'apporter une expertise clinique critique sur son application. Merci pour l'intérêt que vous portez à la pharmacologie et au suivi thérapeutique de manière générale, amenant à des projets clinico-biologiques très intéressants.

A ma famille,

A **mes parents**, pour votre dévouement, vos sacrifices et votre soutien tout au long de ces années d'études. Maman, un grand merci pour tous les Tupperware du dimanche ! Merci d'avoir cru en moi !

A **mes frères** : Seb, merci pour ces années de coloc Dijonnaises plus ou moins compliquées, mais tu as su comprendre que le silence était d'or pendant ces périodes révisions ! Un coloc à l'écoute et toujours attentionné, promis maintenant je vais prendre le temps de venir te voir de l'autre côté de l'Atlantique ! Thib, merci pour tes encouragements et ta reconnaissance pendant ces années d'études. Maintenant, à toi de finir les tiennes de la plus belle des manières !

Papi, mamie, merci pour votre soutien et petites attentions. Heureuse de pouvoir partager ce moment avec vous. Une pensée à mes grands-parents partis trop tôt, à qui je pense fort aujourd'hui.

Denis, tata Monique, merci pour tous ces étés passés à vos côtés, de m'avoir fait partager vos vacances d'hivers ! Tonton, je me souviens encore de notre coup de fil le soir du concours PACES, je ne pensais pas en arriver là !

A tous mes oncles et tantes (Tata Béné & Nonon Régis, Aude & Etienne, Félix & Nathalie), les cousins & cousines (Julien & Kath, Caro & Philippe, Cec & Nico, Max, Margaux, Mathilde, Aline, Jeremy, Justine, Jules, Salomé) merci pour votre bonne humeur et tous ces moments en famille, permettant de recharger les batteries à chaque fois !

A mes rencontres de l'internat,

✓ **La team petit Dauphin :**

Gwendal, merci à toi de m'avoir fait découvrir ce petit groupe de « mastres », toujours motivés pour des « sorties sociales » mais aussi prêts à enflammer le dancefloor en toutes circonstances ! Les soirées blind-test au tord-boyaux resteront inoubliables !

Pierrick, un vrai dico « nature & découverte », que tu sais transmettre avec patience et générosité. Merci pour tes touches perso culinaires toujours bien dosées !

Claire, je me souviens encore de ma première sortie ski de rando avec toi, nos grandes voies sous la pluie ... toujours un plaisir de partir en vadrouille avec toi !

Thom, pour les WE ski pharma inoubliables et ta bonne humeur, Alex, pour nos discussions filles en sorties ski de rando, Pierre & Laure, Juliette.

Thib, toujours là pour sortir la dernière blague ! PS : je n'ai toujours pas de vol en parapente à mon compteur ! ahah

Alex & Agathe, pour la bonne humeur que vous transmettez au quotidien !

Je n'oublie pas Estebanito et Nono qui comblent nos soirées !

Merci à tous pour votre soutien et ces supers moments passés ensemble. Vous m'avez fait découvrir vos passions sportives qui sont devenues les miennes aujourd'hui ! Et oui, jamais j'aurai pensé que remonter les pentes à ski serait mieux qu'en télésiège !

✓ **A mes coloc,**

Gwendal, je dois le dire, un coloc en or ! Je ne savais pas trop dans quelle aventure je me lançais en te prenant comme coloc, mais aucun regret ! Merci pour les réparations de vélo ; les soirées colocs autour de bons plats ; les initiations au ski de rando, grimpe ; les discussions potins et les moments parfois gênant mais qui resteront inoubliables ! Repasser quelques chemises en échange fût un plaisir ! ahah

Audrey, merci pour ces moments cuisine, ronchonnage, nos montées de Bastille et les points culture G !

Lison, merci pour ta bonne humeur et ces moments d'anglais à la coloc !

Guillaume, un « recrutement le bon coin » qui en valait la peine ;) . Les soirées thèses sont finies pour moi, les réunions parisiennes touchent à leur fin, il est temps de reprendre les soirées coloc ! Merci pour ton investissement à la coloc, cela m'a bien aidé sur cette dernière année chargée ! Merci également à John, finalement comme un membre de la coloc qui prend ses aises ! ;)

Mélina, merci pour ces moments de motivation sport entre deux paragraphes de thèse ! Nous l'avons fait !

Apolline, j'espère que ces derniers mois de coloc nous permettrons de nous voir un peu plus !

✓ **A l'inter-coloc,**

Trouver une maison à 7 fût compliqué, mais finalement les moments inter-coloc étaient encore plus sympas !

Rodger, ma Sarah, voisine de chambre, une amitié est née ! Un grand merci pour tout ce que tu as pu m'apporter depuis que l'on se connaît ! Toujours à l'écoute et présente dans les bons comme dans les mauvais moments pour recharger les batteries, merci pour tout ! Flo, même si je sais que c'est compliqué pour toi, merci d'accepter que l'on puisse se voir !! ;).

Lucile, merci pour l'orga de tous ces événements d'internes et ton implication. Madou, Flo & Justine, pour votre bonne humeur et encouragement pendant ces années !

✓ **Tous les internes rencontrés durant ces années d'internat,**

Juju, où tout est parfait, Nico, Elsa, Claire, Sophie, Pierre-Pascal, Camille, Laurine, Michel (Beubeu, Antoine et Maxence), Marie, Anne & Flo, Béné pour tes blagues et péripéties, Hubert, Quentin & Estelle, Aurélie M., Anne Po & Pierre-Louis,

La team GIGN, pour l'orga du 1^{er} et meilleur gala des internes de Grenoble ! A quand le prochain repas à mi-chemin ?

La team Génépi, pour l'orga de la plus belle AG !

La team AIPBG pour votre soutien durant mes 2 mandats !

Un grand merci à tout le personnel, Luc pour tes cocktails, DJ Denis, Louise, Eric, Marie-Angèle et tous les autres ! Vous contribuez grandement à ces bons moments !

✓ **A mes co-internes, des plus vieux aux plus jeunes,**

Léa, Chacha, Anaëlle pour ce semestre de pharmaco topissime sous le thème COVID/thèse/pâtisseries, Tristan, Fanny, Quentin, Axelle, Simon, VTH, Arnaud G. le roi de l'orga, Claire, Benjamin, Rhéza, Caro, Judith, Céline, Flo & Sophie les 2 canailles, VJP, Théo, Caroline, Aurélie, Clémentine, Gladys et tous les nouveaux !
Merci pour ces belles années d'internat remplies de fous rires, de voyages, de randonnées, de WE ski, de resto, de footing à la Bastille, et de thèse !

✓ **Aux les internes de la team PH,**

Arnaud T. le dictateur, Quentin, Maëlle, Laura, Déborah, Aurélie, Bastien, Antoine P., Juju. : merci pour votre soutien pendant cette période thèse, les soirées oeno et les WE ski de folie !

- ✓ **A Benoît,** merci pour ton soutien et ces bons moments durant cette période thèse. J'en ai fini avec ce mot et les réunions parisiennes touchent à leur fin ! De nouveaux créneaux libres à remplir ! Pour la thèse, à toi de jouer maintenant ;)

A mes amis Erasmus Belges,

Ana, Sylvia, Constança, Francisco, Alex, Ellen, Nazar, Nienke, Saï pour les WE visites et tous les moments passés à Ambi et autour d'Oude Markt !

A mes amis du lycée,

Pas toujours simple de se voir, mais ces rares moments sont toujours aussi sympathiques et font remonter de bons souvenirs, que ce soit les sorties QG ou les fêtes de la bière !

Déborah, merci pour ces moments de folie passés ensemble, pour les nouvelles que tu as pris pendant tout mon cursus malgré la distance et pour la relecture <3 !
Adeline G. pour tes visites Grenobloises inattendues, Pol & Pauline, Clara, Adeline M., Thibault !

Aurore, pour nos vacances « carte bleue, brosse à dents et on verra bien ! » qui m'ont permises de faire une bonne pause post PACES et toi de trouver l'amour. Qui l'eût cru !

A mes amis de la fac,

✓ La MIFA,

Lou & Hugo, Marie, Camille & Pierre, Béa & Clément, Tiffany, Grég & Virginie, Andréa, Mathias & Can, Boubou, Thomas & Laura, Turpi & Aneta, Alexis, Alexandra, Léa & Loïc. Une famille née d'une association, presque 10 ans que l'on se connaît et les retrouvailles sont toujours les mêmes ! Merci d'avoir rendues ces années de fac aussi chouettes, d'avoir été là pendant les révisions, et de m'avoir soutenu dans mes défis d'asso ! Même avec la distance, la famille ne change pas et les Noël, WE ski, vacances sont toujours aussi formidables ! <3. Notre amitié ne fait que grandir et les moments passés ensemble encore plus intenses !

Merci à Mercuzot, Clotilde, et toute la bande pour m'avoir recruté et donné envie de continuer ! Sans vous, cette famille n'existerait pas !

✓ La promo pharma,

Callie & Justin : pour ces moments révisions passés à tes côtés, nos pauses footing. Encore merci pour m'avoir hébergé à Paris ! Pauline & Médéric, Pauline, Rémi, Laurine, les bans bourguignons en AG vont me manquer ! Clothilde, pour tes pauses Oréo qui ont rythmées nos années de fac !

Marion, ma bibi : des heures passées à tes côtés sur les bancs de la fac, toujours au 1er rang, mais aussi des soirées endiablées, avec un cocktail toujours plus original et nos retrouvailles Chaumontaises !

Merci pour vos encouragements pendant ces années d'internat !

A mes collègues et amis de la FNSIP-BM,

Secrétaire du "bureau du love", j'ai passé une année extraordinaire à vos côtés ! Travailler dans cette ambiance fût un réel plaisir pour moi. Merci pour tout ce que vous avez pu m'apporter ! Romain, Moïse des présidents au top, Chacha & Ju

mes 2 Bordelaises, Béré, Guillaume, Clémence, Lulu, Marion, Quentin, Louis et mes 2 Lillois du cœur Alex et JD !

Merci à mon bureau actuel : Lulu, Alicia, Clémence, Audrey, Nina, Mathieu, Antoine, Laïly, Anaïs, Hugo, Gaëlle et mes 2 VP Max et Guillaume pour cette longue année de mandat à vos côtés et votre aide pendant cette période thèse !

Merci à tous les anciens, toujours présents aux AG : JS, Geoffroy, Morgane pour tes conseils durant mon mandat, Olivier, Hugo, Marie pour les congrès YS et nos discussions pharmaco !

“Tie la famille, tie la famille...”

À toutes les personnes que j'ai rencontrées pendant mon internat et qui ont contribué à ma formation, et particulièrement :

A toute l'équipe du laboratoire de pharmacologie !

Merci à tous les technicien(e)s pour votre aide, vos réponses à mes questions et la bonne ambiance que vous mettez au labo ! Merci plus particulièrement à Karine pour tes très bons conseils, à Cécile et Mélanie pour les sorties internat ! Merci à Jean-François pour tes explications techniques de la spectro de masse et HPLC.

Merci à toute l'équipe de biologistes ! Xavier, merci pour tous les moments que tu as pu me consacrer pour me former et me transmettre ta passion. Effectivement, je ne connaissais pas grand-chose à mon premier semestre ! Nous n'aurons pas eu le temps de nous former à R et il n'y a pas de pharmacogénétique dans ma thèse, mais cet objectif n'est pas perdu ! Tu n'es pas seulement biologiste mais aussi grand cuisinier et fan de montagne, un plaisir de partager ces moments entre deux histoires du « père Castor » ! ;)

Julia, pour ta bonne humeur, ton dynamisme, tes petits gâteaux cachés dans un tiroir, que ce soit les samedis COVID à discuter organisation de projets que les post-formations à Espace Montagne ! Toujours là pour booster les troupes !

Mireille et Hélène pour vos explications screening, recherche de stupéfiants !

Grâce à vous tous, mon intérêt pour la pharmacologie n'a fait que grandir !

Merci à Ann Gils pour son accueil dans le laboratoire de Leuven et de m'avoir fait confiance. Ce stage m'a beaucoup appris et m'a vraiment fait progresser en anglais. Bedankt ! Merci également à Erwin, Giles, Nathalie et Maya pour leur intégration.

Un grand merci aux biologistes du CH de Chambéry pour votre accueil et tout ce que vous m'avez appris durant mon dernier semestre d'internat.

Merci à Isabelle Valery de la société Grifols pour son aide et les kits fournis ; à Aurélien Millet pour ses conseils sur les peptides du rituximab.

En espérant avoir oublié personne, merci à tous d'être là pour ce moment important !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	6
TABLE DES MATIERES	14
LISTE DES TABLEAUX	16
LISTE DES FIGURES	17
ABRÉVIATIONS.....	18
INTRODUCTION.....	20
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	23
1. Les anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique	23
1.1. Généralités des anticorps monoclonaux.....	23
1.1.1. Structure et fonction d'une immunoglobuline	23
1.1.2. L'utilisation des anticorps en thérapeutique	24
1.1.3. Les différents types d'anticorps monoclonaux.....	25
1.1.4. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques en 2020	27
1.2. La pharmacodynamie des anticorps monoclonaux thérapeutiques ..	28
1.3. La pharmacocinétique des anticorps monoclonaux thérapeutiques .	30
1.3.1. Propriétés pharmacocinétiques générales	30
1.3.1.1. Absorption	30
1.3.1.2. Distribution	31
1.3.1.3. Métabolisme et élimination.....	31

1.3.2. Variabilité pharmacocinétique des anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	33
2. Le suivi thérapeutique pharmacologique	34
2.1. Définition.....	34
2.2. Les prérequis au suivi thérapeutique pharmacologique.....	36
2.3. Les limites et le coût du suivi thérapeutique pharmacologique	37
2.4. Le suivi thérapeutique pharmacologique des anticorps monoclonaux thérapeutiques	39
3. Les méthodes de dosage des anticorps monoclonaux thérapeutiques	41
3.1. L'ELISA.....	41
3.2. La CL-SM/SM	44
3.2.1. Sélection du peptide d'intérêt.....	45
3.2.2. Purification de l'échantillon.....	45
3.2.3. Digestion de l'échantillon.....	46
TRAVAUX PERSONNELS EXPERIMENTAUX	48
1. Publication n°1.....	49
2. Publication n°2.....	89
DISCUSSION.....	120
CONCLUSION	124
ANNEXES	126
BIBLIOGRAPHIE.....	127
SERMENT.....	134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Structures des anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique et approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) entre 1997 et 2007. D'après Lu et al., Journal of biomedical science, 2020 (2) et Paintaud et al., Therapie, 2009 (4).....	26
Tableau II : Prérequis au Suivi Thérapeutique Pharmacologique.....	37

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure générale d'une immunoglobuline. Issu de Mould et al., Antibodies Biodrugs, 2010 (5).....	24
Figure 2 : Nombre d'anticorps monoclonaux thérapeutiques approuvés aux Etats Unis (US) ou dans l'Union Européenne (EU) de 1986 à 2019. Issu de Kaplon et al., mAbs, 2019 (1).....	28
Figure 3 : Processus de recyclage et migration transcellulaire des mAbs via le récepteur FcRn au sein de la cellule endothéliale. Issu de Ternant et al., Expert Opinion of Biological Therapy, 2005 (35).	32
Figure 4 : Concentrations sériques de rituximab chez 58 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde après deux injections de 1 g à J1 et J15. Issu de Thurlings R.M. et al., Annals of the Rheumatic Diseases, 2009 (36).	33
Figure 5 : Différentes étapes du Suivi Thérapeutique Pharmacologique. Issu de Dora Pascual-Salcedo et al., Clinical Pharmacology, 2017 (8).	35
Figure 6 : Relation dose-concentration-réponse pour les anti-TNF α . Issu de D. Ternant et al., Clinical Pharmacokinetic, 2015 (22).	40
Figure 7 : Principe général des méthodes ELISA utilisées pour quantifier les mAbs et détecter les ADA. A) ELISA indirect avec la cible utilisée comme coating ; B) ELISA sandwich utilisant deux anticorps anti-médicament.	42
Figure 8 : Différentes étapes de la technique ELISA sandwich.	43
Figure 9 : Principales étapes d'une méthode de quantification des anticorps monoclonaux thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.	47

ABRÉVIATIONS

ADA, anticorps anti-médicament

CD20, cluster de différenciation

CL-SM/SM, chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

CV, coefficient de variation

ECU, éculizumab

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

EMA, agence européenne du médicament

Fab, fragment de liaison à l'antigène

Fc, fragment constant

GEM, glomérulonéphrite extra-membraneuse

H, heavy

HPN, hémoglobinurie paroxystique nocturne

HRP, horse radish peroxydase

IL-6, interleukine 6

Ig, immunoglobuline

L, light

mAb, anticorps monoclonal thérapeutique

MICI, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MRM, multiple reaction monitoring

PR, polyarthrite rhumatoïde

ROC, rotation or change

RTX, rituximab

STP, suivi thérapeutique pharmacologique

TCZ, tocilizumab

TNF α , tumor necrosis factor α

INTRODUCTION

Le développement des anticorps monoclonaux thérapeutiques (mAbs) depuis les années 90 a constitué une avancée médicale majeure qui a révolutionné la prise en charge de nombreuses pathologies chroniques (1–4). En dépit de ces progrès thérapeutiques, la réponse clinique à de nombreux mAbs est variable, que ce soit à l'échelle interindividuelle, comme intra-individuelle (5). Dans la mesure où de nombreux mAbs présentent une variabilité pharmacocinétique importante (5), avec un lien concentration-effet clairement établi, le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des mAbs est apparu comme un outil d'individualisation intéressant à évaluer. Si les propriétés pharmacocinétiques des mAbs dirigés contre le TNF α (*tumor necrosis factor α*) sont assez bien décrites et l'intérêt de leur STP démontré chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (6–9), de tels travaux restent à mener pour de nombreux autres mAbs. Ceci est particulièrement vrai pour le rituximab (RTX – anti-CD20) (10) et le tocilizumab (TCZ – anti-récepteur à l'IL-6) (11), deux mAbs aux indications variées sur lesquels ce travail de thèse s'est focalisé.

Le STP d'un médicament nécessite un certain nombre de prérequis, dont la disponibilité d'une méthode de dosage sensible et spécifique (12). Pour ce faire, des méthodes d'immunoanalyse (telles que l'*Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay*, ELISA), reposant sur le principe de reconnaissance par l'anticorps de sa cible antigénique ont dans un premier temps été développées et restent actuellement encore très utilisés pour la quantification des mAbs. Néanmoins, les limites de ces approches analytiques notamment en terme de spécificité (13–16) ont conduit de nombreux laboratoires à développer des méthodes alternatives de

dosage des mAbs, basées notamment sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) (17). Une méthode multiplex permettant la quantification simultanée de 7 Mabs (RTX, TCZ et également adalimumab, infliximab, cetuximab, secukinumab et trastuzumab) (18–20) par CL-SM/SM avait, dans ce sens, été développée et validée au sein du Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogénétique et Toxicologie du CHU Grenoble Alpes (20). La limite de quantification des mAbs dans cette méthode était de $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, excepté pour le RTX pour lequel elle était de $5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dans la mesure où les concentrations sériques de RTX peuvent chez certains patients être inférieures à cette limite de quantification (21), il apparaissait que notre méthode de dosage de RTX par CL-SM/SM présentait une sensibilité insuffisante pour la réalisation du STP de ce dernier.

Aussi, le premier objectif de mon travail de thèse a été d'améliorer cette méthode de dosage des mAbs en CL-SM/SM, de manière à améliorer notamment la quantification du RTX. Nous avons profité de ce premier travail d'ordre analytique pour, d'une part, ajouter un mAb supplémentaire, à savoir l'éculizumab (ECU – anti-C5) à notre méthode de dosage et comparer, d'autre part, les concentrations de RTX déterminées par CL-SM/SM à celles obtenues avec deux kits ELISA commerciaux.

Un autre des prérequis à la réalisation du STP d'un médicament est l'évaluation de sa variabilité pharmacocinétique qui doit être importante. Si des auteurs ont déjà mis en évidence la variabilité pharmacocinétique du RTX et du TCZ dans certaines populations (22,23), des études supplémentaires sont encore nécessaires pour préciser cette variabilité et identifier ses déterminants. Une fois la méthode de dosage des mAbs améliorée et validée, nous avons, dans ce sens,

pu la mettre à profit d'une étude bioclinique dont l'objectif principal était d'évaluer la variabilité des concentrations sériques de RTX et de TCZ chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) (24).

La première partie de ce manuscrit apporte quelques éléments bibliographiques relatifs à la pharmacologie des mAbs, leur STP et aux méthodes de dosage de ces biomédicaments. La seconde partie expose les différents travaux expérimentaux réalisés sous la forme de deux articles scientifiques originaux, suivi d'une discussion générale.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Les anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique

1.1. Généralités des anticorps monoclonaux

1.1.1. Structure et fonction d'une immunoglobuline

Les anticorps, également appelés immunoglobulines sont des glycoprotéines solubles d'environ 150 kDa sécrétées de manière physiologique par les plasmocytes lors de la réponse immunitaire adaptative humorale (25). Elles sont composées de :

- ✓ Deux chaînes peptidiques lourdes (H, *heavy*), reliées entre elles par des ponts disulfures, composées d'un domaine variable (V_H) et de 3 à 4 domaines constants (C_H).
- ✓ Deux chaînes peptidiques légères (L, *light*), liées aux chaînes lourdes par des ponts disulfures, composées d'un domaine variable (V_L) et d'un domaine constant (C_L) (Figure 1).

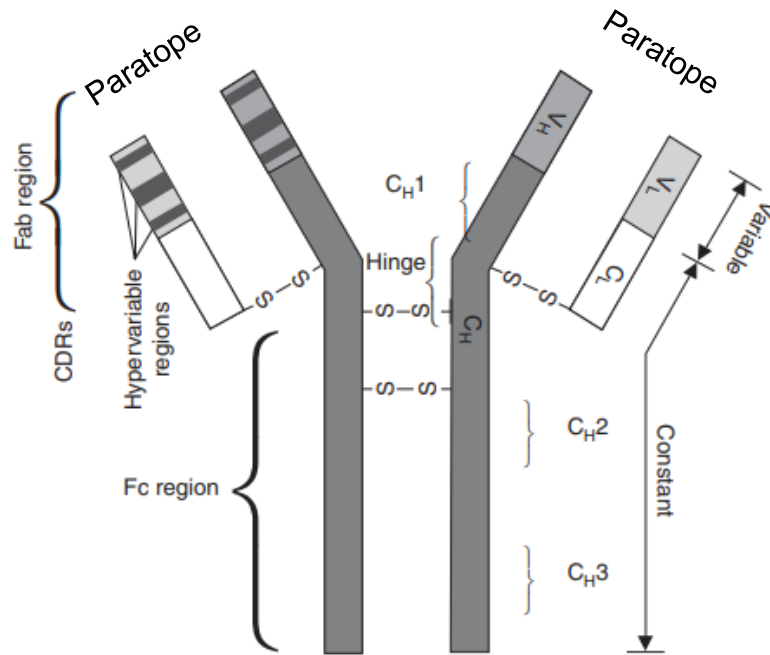


Figure 1 : Structure générale d'une immunoglobuline. Issu de Mould et al., *Antibodies Biodrugs*, 2010 (5)

Le terme anticorps est très souvent employé pour parler d'activité anticorps, désignant ainsi la capacité d'une immunoglobuline à se lier par complémentarité, via son paratope, à un déterminant antigénique spécifique, appelé épitope (26) ; le complexe anticorps-antigène formant ainsi un complexe immun.





1.1.2. L'utilisation des anticorps en thérapeutique

L'utilisation des anticorps en thérapeutique remonte à plus d'un siècle avec les travaux de Von Behring sur la sérothérapie antidiphtérique (27). Cette approche thérapeutique consiste à administrer à un patient, du sérum d'un individu préalablement immunisé contre un pathogène pour lui transférer l'immunité. L'activité neutralisante de ces sera fut rapidement attribuée à des composés ciblant spécifiquement le pathogène, qui n'étaient autres que des

anticorps. Néanmoins, dans le cadre de la sérothérapie, l'effet pharmacologique est porté par des anticorps de nature polyclonale ; c'est-à-dire des anticorps produits par différents clones plasmocytaires. C'est en 1975 que Köhler et Milstein (28) mettent au point la « méthode des hybridomes » permettant de produire des anticorps ayant la même spécificité antigénique. Cette méthode, détaillée en Annexe 1, consiste à rendre immortel, après fusion avec des cellules cancéreuses, un clone plasmocytaire préalablement isolé et capable de produire des anticorps monoclonaux. C'est cette technique qui a permis en 1985, le développement du muromomab, premier anticorps monoclonal thérapeutique murin anti-CD3 (29), utilisé pour prévenir le rejet de greffe. Néanmoins, l'utilisation de ce médicament a rapidement été limitée du fait de réactions d'hypersensibilité, imputables à la nature murine de cet anticorps.

1.1.3. Les différents types d'anticorps monoclonaux

Alors que le premier mAb utilisé était entièrement murin, d'autres structures de plus en plus humanisées ont été développées (Tableau I), dans le but premier de diminuer leur immunogénicité : les anticorps chimériques (-ximab) composés de domaines constants d'origine humaine et de domaine variables d'origine murine ; les anticorps humanisés (-zumab), dont seule la région ultravariante est d'origine murine ; et enfin les anticorps humains (-mumab) dont la totalité de la séquence peptidique est d'origine humaine. Les portions non-humaines étant reconnues par le système immunitaire comme du non-soi, les anticorps chimériques sont considérés comme les plus immunogènes entraînant très fréquemment la production d'anticorps anti-anticorps (ADA).

NOM	COMPOSITION		SUFFIXE (exemple)
Murin	Entièrement murine		-omonab (muromonab)
Chimérique	Région constante humaine (60%) + Région variable murine		-ximab (rituximab)
Humanisé	Région constante humaine (90%) + Région ultra-variable murine		-zumab (tocilizumab, éculizumab)
Humain	Entièrement humanisée (100%)		-mumab (adalimumab)

En rouge, région d'origine murine ; en vert, région d'origine humaine

Tableau I : Structures des anticorps monoclonaux utilisés en thérapeutique et approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) entre 1997 et 2007. D'après Lu et al., *Journal of biomedical science*, 2020 (2) et Paintaud et al., *Thérapie*, 2009 (4).

Les mAbs sont également caractérisés par leur isotype (ou classe) défini par le sous-type de chaîne lourde (IgG: γ , IgA: α , IgM: μ , IgD: δ et IgE: ϵ). La majorité des mAbs appartiennent au sous-type IgG1 (exemple : TCZ, RTX), mais il existe également des IgG2, IgG4 (26) ou encore des mAbs composés de plusieurs sous-types comme l'ECU qui est une IgG2/4.

A côté de ces mAbs dits « complets », d'autres structures alternatives ont été développées, toujours dans le but de diminuer l'immunogénicité et d'améliorer le profil de sécurité (3). Il s'agit par exemple des :

- ✓ Fragments de liaison à l'antigène (Fab) obtenus après action de la papaine qui coupe les liaisons disulfures entre les deux chaînes lourdes ;
- ✓ Protéines chimériques obtenues par fusion de fragments provenant d'un anticorps avec une autre structure d'intérêt.

1.1.4. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques en 2020

La physiopathologie de nombreuses maladies étant de mieux en mieux connue, de nouvelles cibles thérapeutiques sont fréquemment découvertes ; autant de cibles pour lesquelles de nouveaux mAbs peuvent potentiellement être développés. Dans ce sens, le nombre de mAbs commercialisés et/ou en développement n'a cessé de croître depuis le début des années 90 (Figure 2), avec plus de 550 mAbs actuellement en cours de développement clinique (1) dans des indications très diverses (infection par le virus de l'immunodéficience humaine, mélanome, cancer, drépanocytose, etc.).

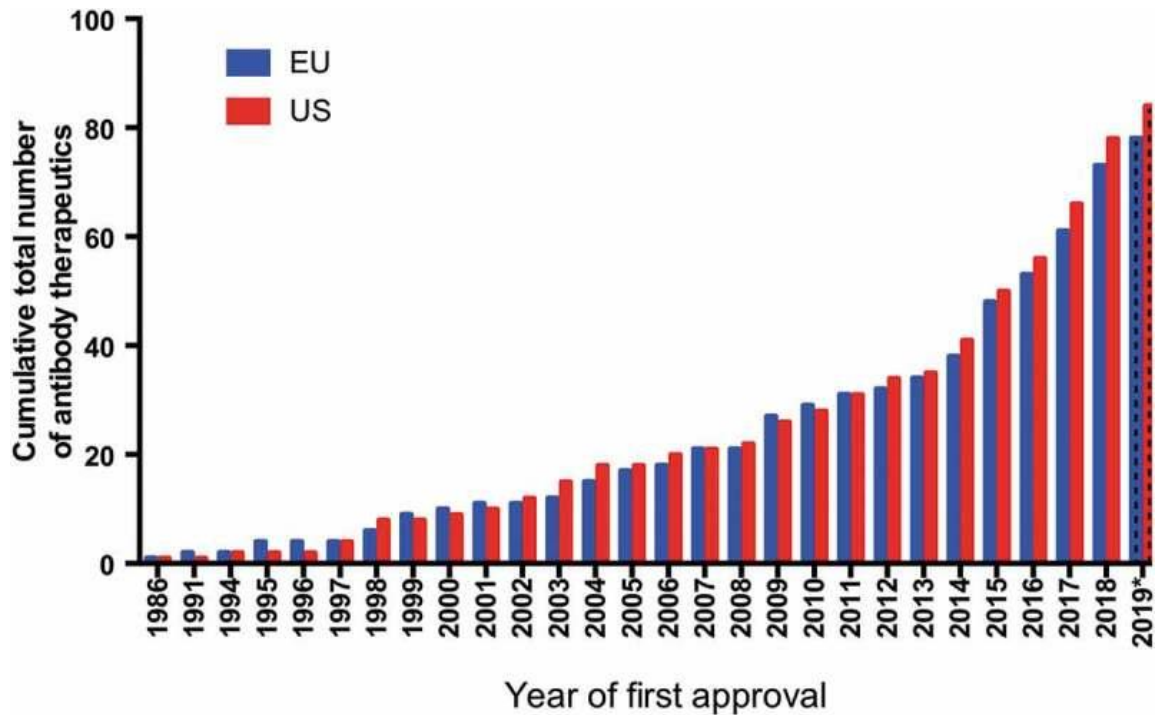


Figure 2 : Nombre d'anticorps monoclonaux thérapeutiques approuvés aux Etats Unis (US) ou dans l'Union Européenne (EU) de 1986 à 2019. Issu de Kaplon et al., mAbs, 2019 (1).

1.2. La pharmacodynamie des anticorps monoclonaux thérapeutiques

Le rôle principal d'un anticorps monoclonal est de cibler un antigène, qu'il soit soluble, comme l'ECU qui se fixe à la fraction C5 du complément (30) ou exprimé à la surface de cellule, tel que le RTX qui se fixe au CD20 des lymphocytes B (10). Les mécanismes d'action pharmacologique résultant de cette interaction vont faire appel à différentes propriétés des anticorps (5,31) détaillés ci-après :

- ✓ Activité neutralisante : en créant un complexe avec sa cible antigénique soluble, l'anticorps l'empêche de se lier à son récepteur spécifique. Après opsonisation, le complexe immun sera alors éliminé par phagocytose et

aura pour conséquence une diminution des concentrations de la cible antigénique (exemple : ECU (30) , l'infliximab (32)) ;

✓ Activité cytotoxique :

- Cytotoxicité directe : indépendamment de toute interaction cellulaire, l'anticorps peut entraîner la transduction directe de signaux intracellulaires, puis une apoptose cellulaire ;
- Cytotoxicité dépendante du complément : une fois fixé à son antigène, l'anticorps, via son fragment Fc va se lier à la protéine C1q du complément et activer la voie classique. Cela va induire la formation du complexe d'attaque membranaire et l'action cytolytique du complément sur la cellule (exemple : RTX, un anti-CD20) ;
- Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps: une fois fixé à son antigène, l'anticorps, via son fragment Fc, va se lier avec un récepteur de type FcγR à la surface des cellules immunitaires (macrophages, cellules *natural killer*, polynucléaires basophiles, etc.), provoquant alors la libération des granzymes, perforines, ainsi qu'une activation de leur fonction phagocytaire, conduisant ainsi à la lyse cellulaire ;

✓ Activité antagoniste : en se liant à un récepteur membranaire, le mAb empêche la fixation du ligand naturel et bloque ainsi la transduction du signal (exemple : le TCZ). On parle d'anticorps couvrants. Parmi les mAbs qui présentent ce mécanisme d'action, on distingue également des anticorps dits lytiques, lorsque leur fixation sur le marqueur de surface conduit à une destruction cellulaire (exemple : le trastuzumab, un anti-HER-2) ;

En outre, les mAbs peuvent être utilisés comme vecteurs, en ciblant un antigène exprimé préférentiellement sur des cellules cibles (cellules cancéreuses par exemple). Ainsi ces mAbs permettront le dépôt *in situ* de composés actifs (radio-isotopes, agents cytotoxiques).

1.3. La pharmacocinétique des anticorps monoclonaux thérapeutiques

1.3.1. Propriétés pharmacocinétiques générales

Contrairement aux petites molécules, les mAbs sont des protéines de haut poids moléculaire (environ 150 kDa) capables de se lier de façon spécifique à un antigène. Par conséquent, le devenir des mAbs dans l'organisme est proche du devenir des anticorps endogènes et explique certaines propriétés pharmacocinétiques particulières de ce type de médicament.

1.3.1.1. Absorption

En raison de leur structure protéique, leur haut poids moléculaire et leur faible perméabilité membranaire, la biodisponibilité des mAbs par voie orale est très faible, de l'ordre de 1-2% (33). La voie parentérale est donc la voie d'administration de choix des mAbs; les voies sous-cutanée et intraveineuse étant le plus souvent utilisées. Leur biodisponibilité, après administration sous-cutanée, de l'ordre de 40-80%, constitue une source importante de variabilité pharmacocinétique (5,22). Après administration sous-cutanée, l'absorption des mAbs se fait par diffusion des anticorps à travers les vaisseaux lymphatiques (34). Le flux lymphatique étant lent, les concentrations en mAbs vont augmenter

lentement, ce qui explique que la concentration sérique maximale ne soit atteinte qu'après 6 à 9 jours, là où l'administration intraveineuse permet une exposition systémique immédiate.

1.3.1.2. Distribution

Les mAbs pénètrent dans les cellules par convection, endocytose en phase fluide ou par endocytose via les récepteurs FcγR exprimés à la surface des cellules du système immunitaire (5,22). La distribution tissulaire est lente, limitée et dépendante de la vascularisation. Cette phase est déterminante pour que les mAbs puissent atteindre leur cible antigénique.

1.3.1.3. Métabolisme et élimination

A la différence de la plupart des médicaments, les mAbs ne subissent pas de réaction de biotransformation, mais un catabolisme protéolytique. De plus, leur taille ne permettant pas une filtration glomérulaire, le rein n'est pas impliqué dans leur élimination (excepté dans certains contextes pathologiques). Leur clairance résulte donc :

- ✓ D'une élimination intracellulaire non spécifique linéaire et lente, par catabolisme lysosomal via les récepteurs FcγR ou par pinocytose (33) ;
- ✓ D'une élimination spécifique non linéaire, où le complexe mAb-antigène est dégradé au niveau lysosomal par un mécanisme saturable et dose-dépendant, ou par la production d'anticorps anti-médicament (ADA) par le système immunitaire entraînant une neutralisation du mAb (4,22,34).

En outre, le récepteur FcRn est également responsable de la transcytose des anticorps et protège les IgG du catabolisme endogène. Après internalisation cellulaire, l'antigène sera détruit et l'anticorps relargué dans la circulation, comme illustré dans la Figure 3 (5,22,35). L'expression de ce récepteur au niveau des cellules vasculaires endothéliales ou du système réticulo-endothélial explique, en partie, la longue demi-vie des mAbs, de l'ordre de 14 à 21 jours (5).

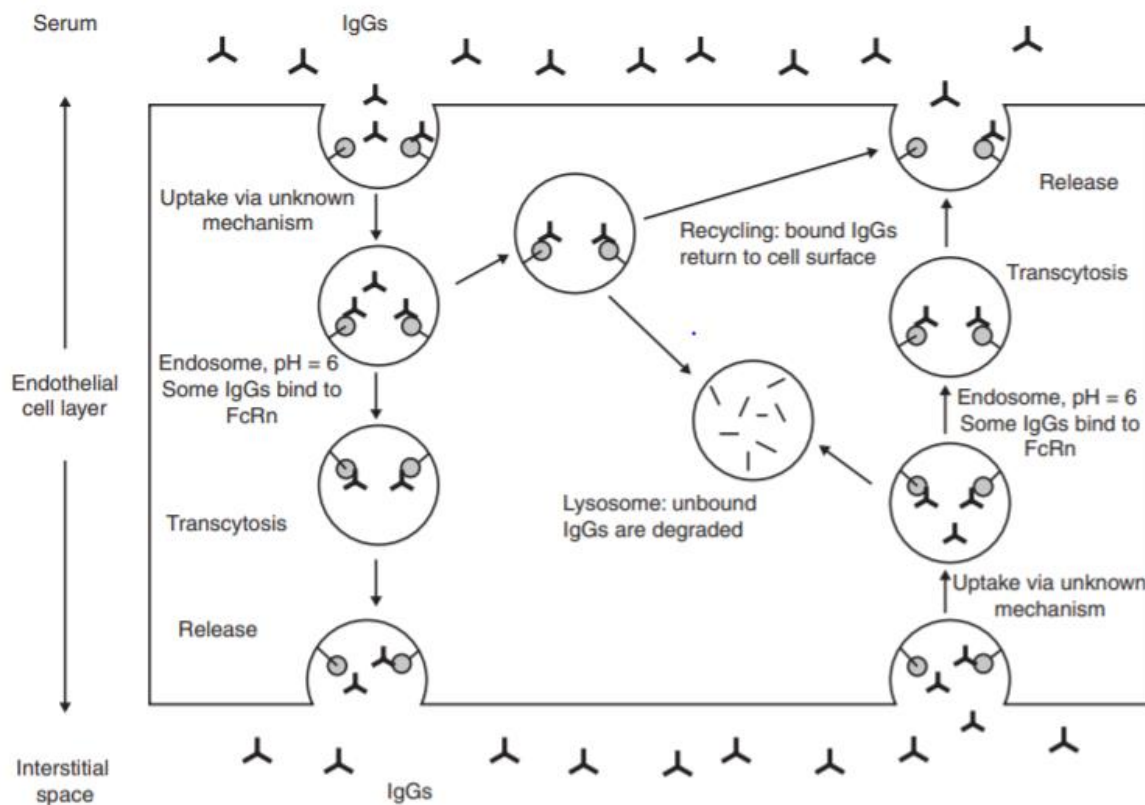


Figure 3 : Processus de recyclage et migration transcellulaire des mAbs via le récepteur FcRn au sein de la cellule endothéliale. Issu de Ternant et al., *Expert Opinion of Biological Therapy*, 2005 (35).

1.3.2. Variabilité pharmacocinétique des anticorps monoclonaux thérapeutiques

Les mAbs présentent une importante variabilité pharmacocinétique que ce soit à l'échelle intra-, comme interindividuelle (Figure 4).

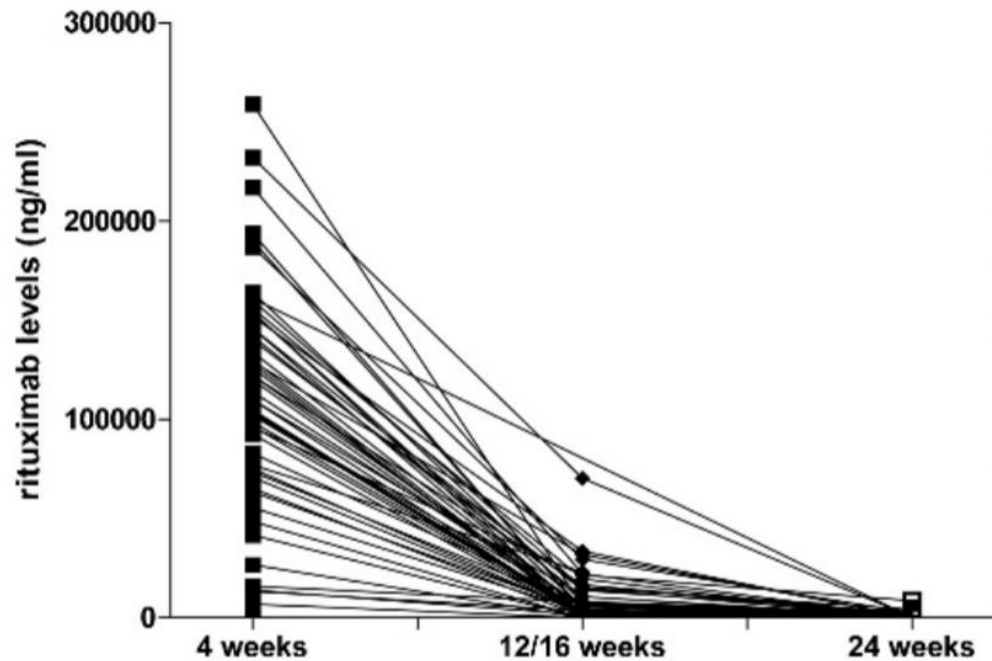


Figure 4 : Concentrations sériques de rituximab chez 58 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde après deux injections de 1 g à J1 et J15. Issu de Thurlings R.M. et al., *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2009 (36).

De nombreux facteurs liés tantôt aux caractéristiques individuelles, à la masse antigénique (37), aux comédications ou encore à l'immunogénicité du mAb considéré sont impliqués dans cette variabilité pharmacocinétique. A titre d'exemple, la présence d'ADA peut être à l'origine d'une hausse de la clairance de certains mAbs (33,38).

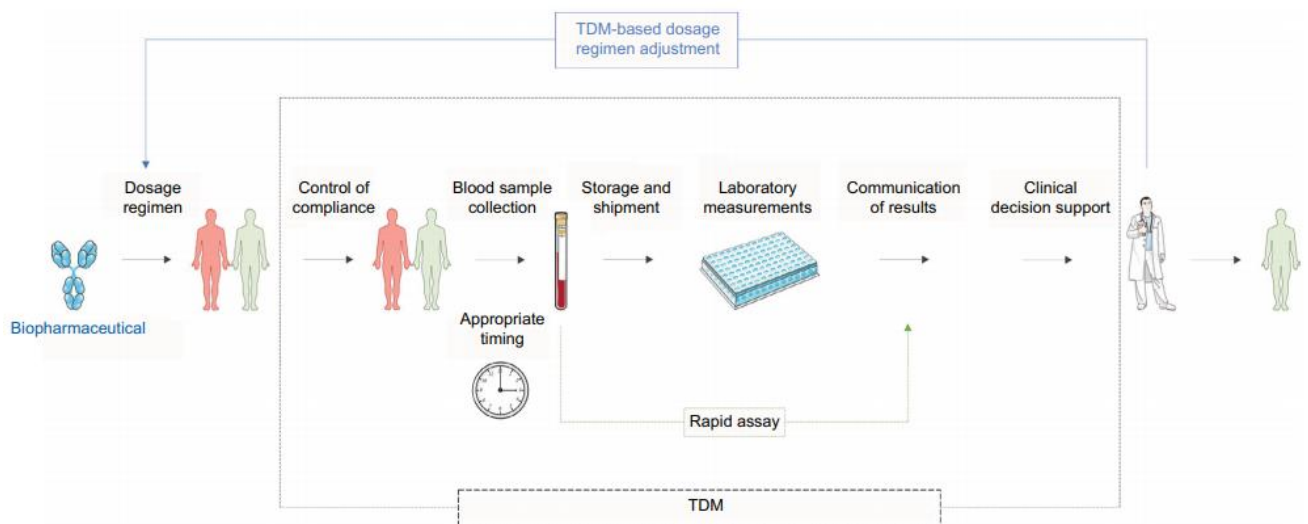
La variabilité pharmacocinétique des mAbs étudiés dans ce travail de thèse, à savoir le RTX, le TCZ et dans une moindre mesure l'ECU a déjà été objectivée par quelques études (21,22,37,39,40). L'importante variabilité des concentrations de RTX a ainsi été mise en évidence dans différentes indications (PR, lupus érythémateux disséminé, pathologies lymphoïdes) (37,40,41), avec des concentrations en RTX inversement corrélées au nombre de lymphocytes B exprimant le CD20 (37). En ce qui concerne le TCZ, Arad *et al.* ont montré que la concentration en TCZ était inversement proportionnelle à l'indice de masse corporelle (39). Enfin, la variabilité interindividuelle des concentrations d'ECU est là encore très importante (coefficient de variation (CV) de 63%) (42), tandis qu'à l'échelle intra-individuelle, les concentrations semblent moins variables (CV de 25%).

Cette importante variabilité pharmacocinétique des mAbs laisse à penser qu'il y aurait un intérêt à individualiser ces traitements pharmacologiques, en réalisant notamment un Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP).

2. Le suivi thérapeutique pharmacologique

2.1. Définition

Le STP se définit par la mesure et l'interprétation des concentrations en médicament dans les fluides biologiques dans l'objectif de déterminer la bonne dose pour un patient donné (Figure 5). Les deux buts principaux du STP sont donc de maximiser l'efficacité du traitement, et de limiter le risque de survenue d'évènements indésirables (8,43–45).



TDM, Therapeutic drug monitoring, Suivi Thérapeutique Pharmacologique.

Figure 5 : Différentes étapes du Suivi Thérapeutique Pharmacologique. Issu de Dora Pascual-Salcedo et al., *Clinical Pharmacology*, 2017 (8).

Au-delà des bénéfices du STP proactif, le STP peut également être utile pour documenter certaines situations cliniques (46) (apparition de signes cliniques ou d'évènements indésirables concentration-dépendants), surveiller une interaction médicamenteuse (47) mais également réduire les coûts d'un médicament onéreux (exemple : l'ECU (42)) ou disponible en faible quantité (intérêt médico-économique).

Cet outil de personnalisation des traitements pharmacologiques, qui a vu le jour dans les années 70, est maintenant utilisé en pratique clinique courante pour différentes classes pharmaco-thérapeutiques tels que les immunosuppresseurs, les anti-infectieux et plus récemment certains mAbs (8).

2.2. Les prérequis au suivi thérapeutique pharmacologique

Parmi la pléthore de médicaments actuellement disponibles, seul un petit nombre d'entre eux font l'objet d'un STP. En effet, pour qu'un médicament soit éligible au STP, des prérequis (résumés dans le Tableau II ci-après) relatifs tantôt au médicament, au patient ou à des considérations d'ordre analytique sont nécessaires (12,43,45,46,48).

L'interprétation du dosage médicamenteux, qui fait partie intégrante du STP, nécessite d'avoir accès à de nombreuses informations relatives au traitement et au patient (12), dont voici une liste non exhaustive :

- ✓ Données démographiques des patients (âge, sexe, poids, indice de masse corporelle, etc.).
- ✓ Délai entre la dernière prise et le prélèvement ;
- ✓ Date d'initiation, posologie et voie d'administration du traitement ;
- ✓ Indication du dosage ;
- ✓ Eventuelles comédications ;

L'obtention de ces informations est absolument indispensable à l'interprétation par le biologiste médical de toute concentration médicamenteuse.

○ Critères liés à la molécule

Effet thérapeutique et/ou indésirable non directement mesurable

Peu ou pas de corrélation entre dose et efficacité/toxicité (Figure 5)

Relation concentration/efficacité et/ou concentration/toxicité établie

Marge thérapeutique étroite

Effets réversibles en cas d'adaptation posologique

Importante variabilité pharmacocinétique

Existence d'interactions médicamenteuses

○ Critères liés au patient

Population cible (nouveau-né, sujet âgé, femme enceinte, patients transplantés et/ou polymédiqués, etc.)

Forte variabilité interindividuelle de la relation dose-concentration (Figure 4)

Variabilité intra-individuelle faible ou prévisible

Traitement au long cours

○ Critères liés à la méthode analytiques

Disponibilité d'une méthode de dosage sensible, spécifique et validée

Coût supportable de l'analyse

Délai de réalisation de l'analyse compatible avec la routine clinique

Tableau II : Prérequis au Suivi Thérapeutique Pharmacologique.

2.3. Les limites et le coût du suivi thérapeutique pharmacologique

En plus des données précédemment citées qui peuvent être manquantes lors de l'interprétation d'un dosage médicamenteux, l'implémentation du STP dans

la pratique clinique courante peut être limitée par de nombreux facteurs qu'il semble utile de rappeler.

L'absence d'intervalles thérapeutiques clairement définis pour certains médicaments, en particulier les plus récents tels que les mAbs constitue un premier obstacle à l'implémentation du STP. Dans les cas où des concentrations thérapeutiques existent, il est important de comprendre que celles-ci ont bien souvent été définies dans une indication précise, pour une population de patients donnée, et ne sont donc pas forcément transposables à d'autres situations (pathologie différente, population différente, etc.) (45,49,50).

De plus, l'intervalle thérapeutique demeure une notion statistique, une sorte d'intervalle de confiance dans lequel la balance bénéfice/risque du médicament considéré est optimisée. Néanmoins, cette zone de concentrations peut se révéler non-pertinente pour certains patients qui peuvent ne pas répondre au traitement, ou à l'inverse présenter des effets indésirables, alors même qu'ils présentent des concentrations thérapeutiques.

En outre, un autre enjeu majeur du STP est de déterminer quel est le marqueur d'exposition le plus pertinent à suivre (concentration maximale/résiduelle, aire sous la courbe, concentration libre/totale; quantification du médicament et/ou de ses métabolites, etc.) (45), dans quelle matrice (plasma/sérum/sang total), ainsi que le moment le plus approprié pour le déterminer (dès l'initiation, à l'état d'équilibre pharmacocinétique, etc.).

Enfin, les éventuels bénéfices du STP doivent être mis en balance avec les contraintes pour le patient (prélèvement supplémentaire) et la société (coût du STP) (51). Si quelques études ont clairement démontré un rapport coût-efficacité favorable pour le STP de certains médicaments (aminoglycosides,

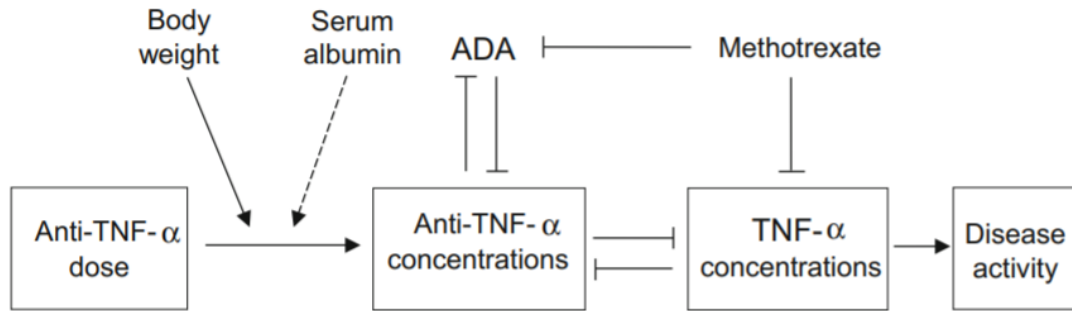
immunosuppresseurs (51), infliximab (52)), des études médico-économiques supplémentaires sont encore nécessaires pour d'autres, en particulier les mAbs les plus récents.

2.4. Le suivi thérapeutique pharmacologique des anticorps monoclonaux thérapeutiques

Dans la mesure où de nombreux mAbs présentent une importante variabilité pharmacocinétique (cf. paragraphe précédent) et qu'ils sont administrés, le plus souvent, dans le cadre de pathologies chroniques où leur effet n'est pas directement mesurable, le STP des mAbs est rapidement apparu comme un outil intéressant de personnalisation de ces traitements.

Le STP des mAbs dirigés contre le TNF α , en particulier des plus anciens comme l'infliximab ou d'adalimumab, a fait l'objet de nombreux travaux, et est dorénavant recommandé chez les sujets atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). En effet, la variabilité pharmacocinétique de ces anti-TNF α , de même que leur relation concentration-effet a bien été documentée. L'intérêt de leur STP a, par la suite, été démontré (6–9), permettant d'intégrer cette approche dans la stratégie globale de prise en charge thérapeutique des patients recevant ces traitements dans le cadre de la prise en charge de leur MICI (53).

Dans le domaine de la rhumatologie, la relation concentration-effet des anti-TNF α a également été bien démontrée (Figure 6) (6). En outre, les autres mAbs indiqués dans le traitement de la PR, incluant le TCZ et le RTX, ont été étudiés (22).



Une augmentation de la concentration en TNF α induit une diminution la concentration en anti-TNF α par une augmentation de sa clairance et est le reflet d'une augmentation de l'activité de la maladie.

Figure 6 : Relation dose-concentration-réponse pour les anti-TNF α . Issu de D. Ternant et al., *Clinical Pharmacokinetic*, 2015 (22).

Quelques données concernant la relation concentration-réponse clinique sont disponibles pour les différents mAbs étudiés dans ce travail de thèse (RTX, TCZ, ECU). Une corrélation positive entre la concentration résiduelle en TCZ et la réponse clinique a ainsi été récemment rapportée chez des sujets atteints de PR (54,55). En ce qui concerne le RTX, bien que la relation concentration-activité de la maladie n'ait pas été démontrée dans la PR (23,36), elle l'a été chez des patients atteints de glomérulonéphrite membraneuse, avec un seuil d'efficacité proposé à 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (21,56). Enfin, la concentration d'ECU a été décrite comme étant inversement corrélée à l'activité du complément (42), suggérant là encore l'existence d'une relation concentration-réponse clinique

3. Les méthodes de dosage des anticorps monoclonaux thérapeutiques

La disponibilité d'une méthode de dosage sensible et spécifique constitue un prérequis à la réalisation d'un STP. Dans le cas des mAbs, de nombreuses méthodes d'immunoanalyse ont été développées (15,57), avec notamment des essais radio-immunologiques, des tests rapides immunochromatographiques (58), des ELISA et plus récemment des tests basés sur des biocapteurs optiques basés sur la technique de résonance plasmonique de surface (59). Ce n'est que plus récemment que des méthodes de quantification des mAbs par CL-SM/SM (17,60,61) ont été développées. Bien que cette dernière approche analytique présente des avantages indéniables en termes de spécificité et de capacité de multiplexage, les méthodes ELISA restent encore actuellement largement plus utilisées.

3.1. L'ELISA

Les tests ELISA sont basés sur la capacité du mAb à se lier à sa cible (22), avec une révélation du complexe grâce à la reconnaissance du domaine constant Fc du mAb par un anticorps dit « de détection ». L'ELISA indirect repose sur le principe de la fixation de la biothérapie sur sa cible préalablement fixée sur la plaque, et ne permet donc pas de différencier des biothérapies dirigées contre une même cible, comme les anti-TNF α (infliximab, adalimumab ou golimumab par exemple) (Figure 7A). L'ELISA de type sandwich (62), plus spécifique, consiste à piéger le composé à doser (la biothérapie dans notre cas) entre un « anticorps de capture » et un « anticorps de détection » (Figure 7B).

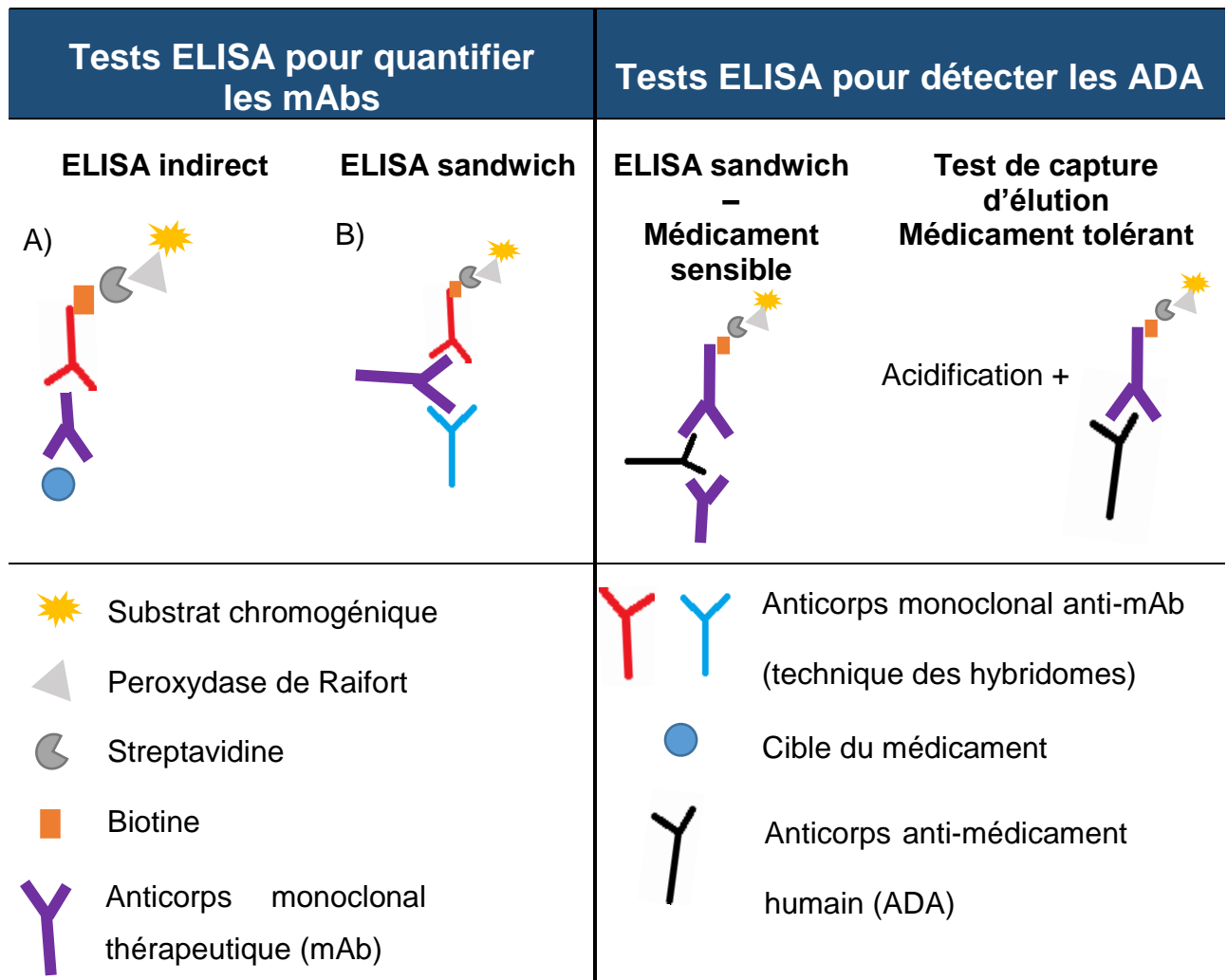


Figure 7 : Principe général des méthodes ELISA utilisées pour quantifier les mAbs et détecter les ADA. A) ELISA indirect avec la cible utilisée comme coating ; B) ELISA sandwich utilisant deux anticorps anti-médicament.

Ces techniques ELISA nécessitent de produire, par la technique des hybridomes, des anticorps anti-médicament spécifiques (Annexe 1) et de coater préalablement des plaques avec l'anticorps de capture pour l'ELISA sandwich. Il s'en suivra le dépôt du sérum/plasma du patient préalablement dilué, puis de l'anticorps de détection conjugué à la biotine. L'ajout de streptavidine couplée à la peroxydase de Raifort (HRP, *horse radish peroxydase*) permettra ensuite une révélation par un substrat chromogénique sous l'action de cette enzyme. Après un

certain temps, la réaction est stoppée par acidification, puis une lecture de l'absorbance à 450 nm est réalisée. Afin d'éliminer les fixations non spécifiques des protéines avec les anticorps et de diminuer le bruit de fond, des étapes de lavages sont nécessaires entre chaque étape. Les industries du diagnostic *in-vitro* délivrent des kits avec des plaques pré-coatées et des réactifs prêts à l'emploi (63). Après lecture de l'absorbance des points de gamme, une relation concentration en mAbs-absorbance est déterminée, permettant d'extrapoler les concentrations en médicaments des échantillons testés. Ces différentes étapes sont résumées dans la figure ci-dessous (Figure 8) :

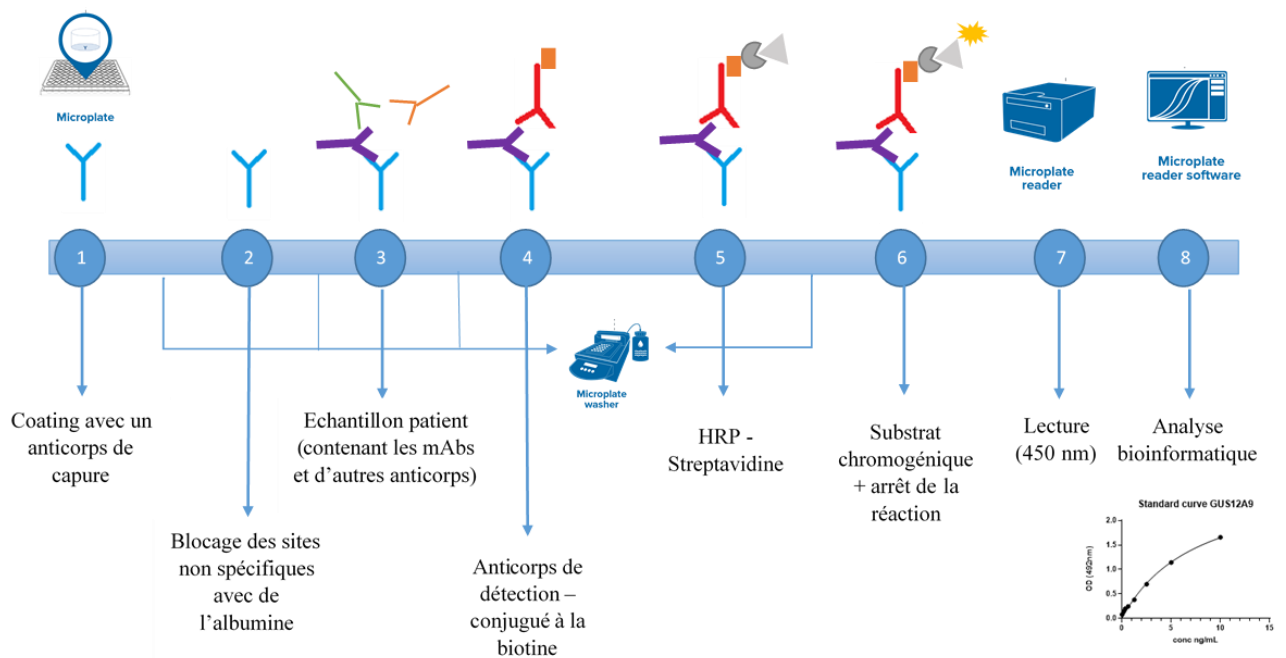


Figure 8 : Différentes étapes de la technique ELISA sandwich.

La détection des ADA repose sur le même principe, avec cette fois-ci une plaque coatée avec le mAb pour lequel on recherche des ADA (Figure 7). En présence de mAb dans l'échantillon, les complexes immuns mAb-ADA peuvent empêcher la détection des ADA, du fait de l'encombrement allostérique. Une

étape supplémentaire d'acidification permettant la dissociation des complexes immuns permet de lever cette interférence, et d'aboutir à une méthode de dosage des ADA dite « médicament-tolérante » (64).

3.2. La CL-SM/SM

La quantification de tout composé en CL-SM/SM repose sur une séparation chromatographique des composés présents dans l'échantillon, suivi d'une détection par spectrométrie de masse (Figure 9). Dans le domaine de la pharmacologie, la spectrométrie de masse en tandem est le plus souvent utilisée et la quantification des composés réalisée via le suivi d'une ou plusieurs transitions MRM (*Multiple reaction monitoring*). Contrairement aux petites molécules où l'on suit la transition MRM d'un ion moléculaire (qui n'est autre que la molécule active ionisée) vers un ion fils, la quantification des mAbs reposera sur le suivi d'une ou plusieurs transitions MRM de peptides dits « protéotypiques » préalablement sélectionnés. Le principe de sélection du peptide d'intérêt, les différentes méthodes de purification de l'échantillon disponibles ainsi que la digestion peptidique, étapes essentielles à la quantification des mAbs par CL-SM/SM, sont détaillées ci-après. En outre, l'ajout d'un standard interne à l'échantillon permettra de corriger les différents facteurs pouvant varier au cours de la préparation de l'échantillons (purification et digestion) et aux variations liées à l'appareil utilisé (ionisation, variations de pressions, etc.) (65). Dans le cadre de la quantification des mAbs par CL-SM/SM, le standard interne choisi sera un anticorps monoclonal stable dont les lysines et arginines seront marqués au carbone 13 et à l'azote 15.

3.2.1. Sélection du peptide d'intérêt

La séquence en acides aminés des mAbs correspondants aux régions variables des chaînes lourdes et légères étant disponibles en ligne (base IMGT de l'international immunogenetics information system : <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB>), une digestion *in silico* par la trypsine va être réalisée et les peptides générés seront alors analysés de manière à ne sélectionner que les peptides spécifiques du mAb considéré (grâce au logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) qui ne présentent pas une séquence humaine. Une fois ces peptides sélectionnés, les transitions m/z (masse/charge) à suivre pour chaque peptide seront déterminées à l'aide du logiciel Skyline[®] 2.5.

3.2.2. Purification de l'échantillon

Une étape de purification pour éliminer notamment les protéines sériques pouvant créer des interférences (albumine, autres immunoglobulines, fibrinogène, etc.) est nécessaire avant l'injection de l'échantillon dans le système chromatographique. De nombreux procédés plus ou moins spécifiques du mAb que l'on cherche à purifier ont été décrits, les techniques les plus courantes étant :

- ✓ La précipitation au sulfate d'ammonium ou au méthanol (technique non spécifique) ;
- ✓ La fixation du mAb sur sa cible antigénique préalablement fixée (17) (méthode immunologique spécifique) ;
- ✓ La technique de Thermofisher utilisant le kit Melon[™] Gel permettant de sélectionner les immunoglobulines de type G (60) ;

- ✓ La sélection de la zone Fab par une nanoparticule (nSMOL, *nano-surface and molecular-orientation limited*) (19) ;
- ✓ La capture via les protéines A ou G (66), ces deux protéines d'origine microbienne se liant avec une haute affinité au fragment Fc des immunoglobulines de mammifères, notamment les IgG.

De ce procédé d'enrichissement, plus ou moins spécifique, dépendra la fraction de médicament dosée (liée, libre ou totale). Les techniques de purification dites spécifiques, basées sur la fixation du mAb sur sa cible antigénique, permettraient ainsi d'extraire uniquement la fraction libre des mAbs (65,67), même si cette hypothèse reste encore controversée (17).

La méthode préalablement développée au Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogénétique et Toxicologie du CHU Grenoble Alpes reposait sur une purification via des plaques coatées à la protéine G (68); ce procédé ayant l'avantage de capturer toutes les IgG contenues dans l'échantillon, permettant ainsi d'envisager une méthode multiplex de dosage des mAbs.

3.2.3. Digestion de l'échantillon

Après cette étape de purification, l'éluât est évaporé sous azote et repris par une solution à pH7, compatible avec une digestion optimale de la trypsine à 37°C (69). Une étape de réduction des ponts disulfures entre les acides aminés, pour augmenter l'accessibilité de l'enzyme à ces sites de clivage, est réalisée par ajout d'urée. Comme indiqué sur la Figure 9, la trypsine lyse la protéine après chaque lysine et arginine. L'ajout de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) conduit à l'oxydation

des méthionines et des cystéines, afin d'obtenir tous les acides aminés sous la même forme, facilitant ensuite le suivi des transitions MRM des peptides (65).

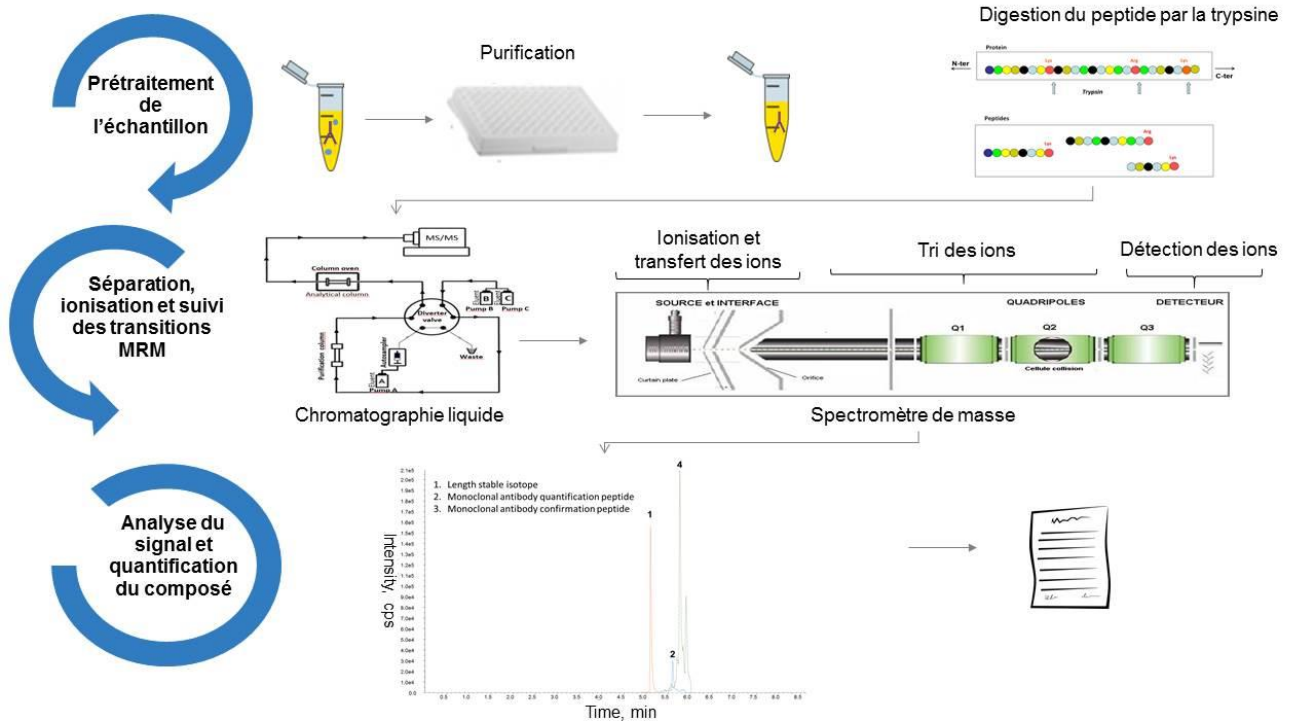


Figure 9 : Principales étapes d'une méthode de quantification des anticorps monoclonaux thérapeutiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

TRAVAUX PERSONNELS EXPERIMENTAUX

Cette seconde partie constitue une présentation de mes travaux expérimentaux réalisés au sein du Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogénétique et Toxicologie du CHU Grenoble Alpes. Ils sont présentés sous forme de 2 articles originaux en anglais, chacun précédé par un résumé en français.

L'objectif premier de ma thèse a été d'améliorer la méthode de dosage des mAbs en CL-SM/SM préalablement développée au sein du laboratoire, afin notamment de diminuer la limite de quantification du RTX (Publication n°1) (70). Ce travail analytique a également été l'occasion d'ajouter un mAb supplémentaire à cette méthode de quantification, à savoir l'ECU et de procéder à une comparaison de notre méthode CL-SM/SM avec deux kits ELISA commerciaux de quantification du RTX.

Le second objectif de ma thèse a été, ensuite, de mettre à profit cette méthode analytique au service d'une étude bioclinique dont le but était d'évaluer la variabilité des concentrations sériques en RTX et TCZ chez des patients atteints de PR, traités en seconde ligne. Ce travail a également été l'occasion d'évaluer le lien entre la concentration en mAb et la réponse au traitement (Publication n°2) (71).

1. Publication n°1

Simultaneous quantification of rituximab and éculizumab in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with rituximab ELISA kits

(Soumis)

Rationnel et objectifs : Des méthodes analytiques spécifiques et sensibles sont nécessaires pour doser les mAbs et réaliser leur STP. Les méthodes ELISA utilisées historiquement pour le dosage des mAbs présentent des performances analytiques limitées notamment en termes de spécificité, ce qui a conduit au développement de méthodes alternatives. Ce travail a eu pour but de valider une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie en tandem (CL-SM/SM) permettant de doser simultanément le RTX et l'ECU, deux anticorps utilisés en néphrologie.

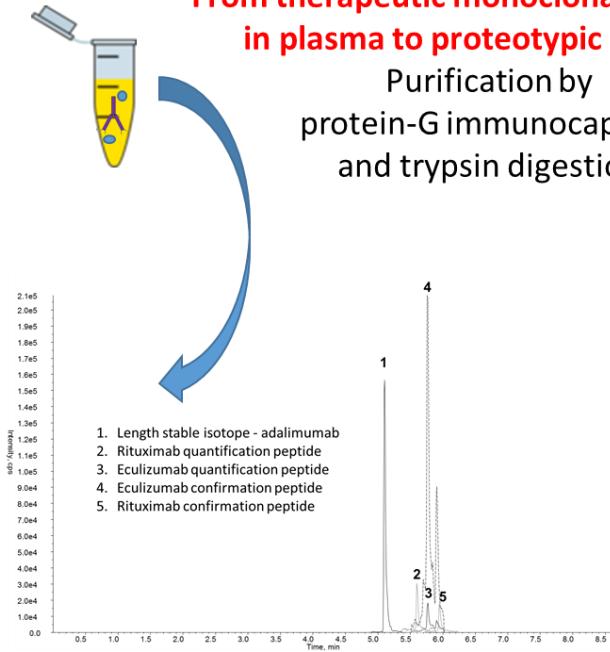
Méthodes : La préparation des échantillons basée sur une purification à la protéine G et une digestion à la trypsine était identique à celle précédemment décrite (20). Un nouveau peptide spécifique du RTX, porteur d'une pyroglutamine en N-terminal et d'un site de non-coupeure par la trypsine a permis d'améliorer la sensibilité. L'adalimumab isotopiquement marqué a été ajouté au plasma comme standard interne. Les concentrations de RTX de 50 sérums humains ont été déterminées à l'aide de cette méthode CL-SM/SM et comparées à celles obtenues avec les kits Lisa Tracker[®] et Promonitor[®].

Résultats : Les courbes de calibrations étaient linéaires de 1.0 à 200.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le RTX et de 5.0 à 200.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour l'ECU. La répétabilité, la reproductibilité, l'exactitude et la précision avaient un coefficient de variation à +/- 15%, en accord avec les critères de validation de la FDA (72). Les concentrations déterminées par CL-SM/SM étaient bien corrélées avec celles mesurées avec les deux kits ELISA, mais un biais significatif a été mis en évidence avec le kit Promonitor[®] (sous-estimation moyenne des concentrations de 69% comparativement à la CL-SM/SM).

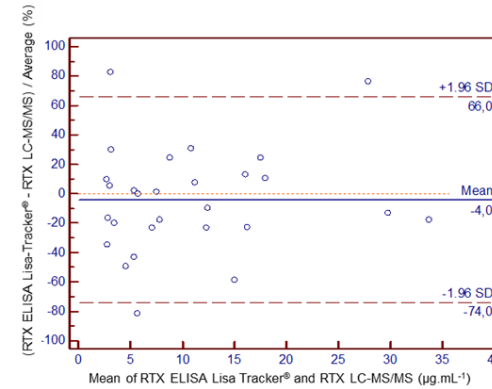
Conclusion : Cette nouvelle méthode en CL-SM/SM permet de doser simultanément le RTX et l'ECU et pourrait donc être utilisées pour le STP de ces deux mAbs utilisés en néphrologie.

From therapeutic monoclonal antibodies in plasma to proteotypic peptides

Purification by
protein-G immunocapture
and trypsin digestion



- ✓ Accuracy
- ✓ Precision
- ✓ Linearity
- ✓ Contamination
- ✓ Stability



Development of a **LC-MS/MS**
method for quantification rituximab
(RTX) and eculizumab (ECU)

Validation of the
method

Comparison with
existing **ELISA** kits
(Lisa Tracker® and
Promonitor®)

Towards a clinical
application
&
**Therapeutic Drug
Monitoring**

1 **Simultaneous quantification of rituximab and éculizumab in human plasma**
2 **by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with**
3 **rituximab ELISA kits**

4

5 Aurélie Truffot¹, Jean-François Jourdil¹, Barbara Seitz-Polski^{2,3}, Paolo Malvezzi⁴,
6 Vesna Brglez^{2,3}, Françoise Stanke-Labesque⁵, and Elodie Gautier-Veyret⁵

7

8 1. Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogénétique et Toxicologie, CHU
9 Grenoble Alpes.

10 2. Laboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, CHU de Nice, Université de Nice-
11 Côte d'Azur, 06202 Nice cedex 3, France.

12 3. UMR2CA, université de Nice Côte d'Azur, 06202 Nice cedex 3, France.

13 4. Service de Néphrologie, Hémodialyse, Aphérèses et Transplantation, Centre
14 Hospitalier Universitaire Grenoble-Alpes, Grenoble, France.

15 5. Univ. Grenoble Alpes, INSERM, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000, Grenoble,
16 France.

17

18 Corresponding author:

19 Dr Elodie Gautier-Veyret

20 Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogénétique et Toxicologie, CHU Grenoble
21 Alpes, CS 10217, 38043 GRENOBLE

22 Tel: +33476765492 ; Email: EGautier@chu-grenoble.fr

23 **Highlights**

- 24 • A validated LC-MS/MS method to simultaneously quantify RTX and ECU.
- 25 • A new RTX quantification peptide allowing improved sensitivity.
- 26 • Comparison with two commercial ELISA kits (Lisa Tracker[®] and
- 27 Promonitor[®]).

28

29 **Keywords**

30 Rituximab, éculizumab, liquid-chromatography tandem mass spectrometry,

31 therapeutic drug monitoring, ELISA.

32 **Abbreviations**

33 ACN, acetonitrile

34 ADA, anti-drug antibodies

35 COFRAC, Comité Français d'Accréditation

36 C5, C5 fraction of complement

37 ECU, éculizumab

38 ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

39 ESI, electrospray ionization

40 FDA, Food and Drug Administration

41 IgG, immunoglobulin G

42 IQC, internal quality controls

43 LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

44 LLOQ, lower limit of quantification

45 mAbs, therapeutic monoclonal antibodies

46 MeOH, methanol

47 MRM, multiple-reaction monitoring

48 nSMOL, nano-surface and molecular orientation limited proteolysis

49 PBS, phosphate-buffered saline,

50 Q-TOF, quadrupole time-of-flight

51 RTX, rituximab

52 SIL-ADM, stable isotope-labeled adalimumab

53 TDM, therapeutic drug monitoring

54 ULOQ, upper limit of quantification

55 **Abstract**

56 Specific and sensitive analytical techniques to quantify therapeutic
57 monoclonal antibodies (mAbs) are required for therapeutic drug monitoring. The
58 quantification of mAbs has been historically performed using enzyme-linked
59 immunosorbent assays (ELISAs), for which the limitations in terms of specificity
60 have led to the development of alternative analytical strategies. Here, we describe
61 the validation of liquid chromatography tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS)
62 method for the simultaneous quantification of rituximab (RTX – anti-CD20) and
63 éculizumab (ECU – anti-C5), two mAbs used in nephrology.

64 Sample preparation was based on our previously published method, using
65 protein G purification and trypsin digestion. A new specific peptide for RTX,
66 containing an N-terminal pyroglutamine and a trypsin miss-cleavage, enables
67 better sensitivity. Full-length stable-isotope-labeled adalimumab (SIL-ADM) was
68 added to plasma samples as an internal standard. RTX in 50 human serum
69 samples was quantified by LC-MS/MS and the concentrations obtained compared
70 to those obtained with two different commercial ELISA kits (Lisa Tracker[®] and
71 Promonitor[®]).

72 Calibration curves were linear from 1.0 to 200.0 µg.mL⁻¹ for RTX and 5.0 to
73 200.0 µg.mL⁻¹ for ECU and within-day and between-day accuracy and precision
74 was within 15%, fulfilling Food and Drug Administration validation criteria. There
75 was good agreement between LC-MS/MS and the Lisa Tracker[®] assay, but
76 significant bias with the Promonitor[®] assay (mean underestimation of 69% for the
77 Promonitor[®] assay).

78 This new LC-MS/MS method allows the simultaneous quantification of RTX
79 and ECU in human samples and could be used for TDM of these two mAbs used
80 in nephrology.

81

A. Introduction

82 Over the last 20 years, therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) have
83 emerged as one of the major new classes of biologics. The use of mAbs has
84 revolutionized therapeutic strategies for numerous diseases, such as solid cancers
85 and inflammatory immune diseases, and considerably improved the prognosis of
86 patients (1,2). However, the clinical response to mAbs and their pharmacokinetics
87 are highly variable (3), suggesting that therapeutic drug monitoring (TDM) could be
88 a useful tool to personalize the dose for each patient and thus improve the
89 benefit/risk ratio.

90 In nephrology, several mAbs, such as rituximab (RTX) and éculizumab (ECU),
91 are candidates for TDM. RTX, a chimeric anti-CD20 IgG₁ monoclonal antibody, is
92 indicated for primary membranous nephropathy (4,5), whereas ECU, a humanized
93 anti-C5 IgG_{2/4} monoclonal antibody that inhibits the complement system, is
94 approved for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical
95 hemolytic uremic syndrome (6,7). These two biologics exhibit high
96 pharmacokinetic variability, which can potentially affect treatment outcomes (8–
97 10). In addition, the financial stakes are high, especially for ECU, which is one of
98 the world's most expensive drugs. TDM of mAbs could thus be a useful tool to
99 reduce costs without modifying treatment efficacy (11,12).

100 TDM requires an accurate and precise method to quantify mAbs in human
101 samples (8,13–15). Numerous enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-
102 based methods are available for the quantification of mAbs, notably for RTX and
103 ECU (8,13,16). However, these approaches are time-consuming and may be
104 limited by lack of specificity or systematic bias (17). Moreover, different ELISA
105 methods are not interchangeable (14,15). Thus, we and others have developed

106 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)-based methods to
107 quantify mAbs in human samples (16,18–21). This highly specific analytical
108 approach allows multiplexing for the quantification of several mAbs in a single
109 analysis (18,19,21), which may be very useful given the increasing number of
110 available mAbs with different specific targets.

111 Our previously published method (19) did not integrate ECU quantification and
112 showed a poor limit of quantification for RTX of $5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, which may be
113 insufficient for some patients with low serum RTX concentrations (8). Here, we
114 describe an improved LC-MS/MS method, adapted from our previously published
115 one (19), that allows simultaneous quantification of RTX and ECU. In addition, we
116 compared RTX concentrations determined with this new method with those
117 obtained with two different commercial ELISA kits (Lisa Tracker[®] and
118 Promonitor[®]).

119

B. Materials and methods

120

a. Multiplex LC-MS/MS method

121

i. Chemicals and reagents

122

RTX (Mabthera[®], Roche, Basel, Switzerland) and ECU (Soliris[®], Alexion,

123

Boston, MA, United States) were obtained from the institutional pharmacy and

124

reconstituted in water to produce stock solutions at concentrations of 10.0 µg.mL⁻¹.

125

Full-length stable isotope-labeled adalimumab (Arginine ¹³C₆-¹⁵N₄ and Lysine ¹³C₆-

126

¹⁵N₂) (SIL-ADM) was purchased from Promise Advanced Proteomics (Grenoble,

127

France). This internal standard has an estimated purity > 95% and isotope

128

incorporation of arginine ¹³C₆, ¹⁵N₄ and lysine ¹³C₆, ¹⁵N₂ > 99%. Sequencing-grade

129

modified trypsin was purchased from Promega[®] (WI, USA). BioXtra urea,

130

ammonium bicarbonate, 30% hydrogen peroxide solution (H₂O₂), and tris

131

(hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) Trizma[®] base were purchased from Sigma

132

Aldrich[®] (MI, USA). LC-MS-grade methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), and

133

formic acid were purchased from Honeywell, Sigma-Aldrich[®] Co (St Louis, MO,

134

USA), and Carlo Erba[®] Reagents (Val de Reuil, France), respectively. Ammonia

135

solution (25%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water

136

(H₂O) with a resistivity ≥ 18.0 MΩ.cm was produced with a Milli-Q Plus[®] system

137

(Millipore, Molsheim, France). Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)

138

solution and 96-well Pierce[™] Protein-G Spin Plates for IgG Screening were

139

purchased from Thermo Scientific[®] (Waltham, MA, United States). Drug-free

140

human plasma from volunteers was provided by the French National Blood

141

Service (Grenoble, France).

142 ii. Preparation of working solutions, calibration standards, and
143 quality-control samples

144 Calibration curves and internal quality controls (IQC) were designed according
145 to the therapeutic range of each mAb. Two batches of RTX and ECU plasma
146 solutions were prepared from the stock solutions, the first for the calibration curve
147 ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of each mAb) and the second for the IQC ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of each mAb).
148 Working solution samples containing 5, 10, 40, 80, and $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of ECU and 1,
149 2.5, 5, 40, 80, and $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of RTX and IQCs containing 5.6, 45, and
150 $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of both were generated by successive dilution in drug-free plasma.

151 iii. Sample preparation: protein-G purification and trypsin
152 digestion

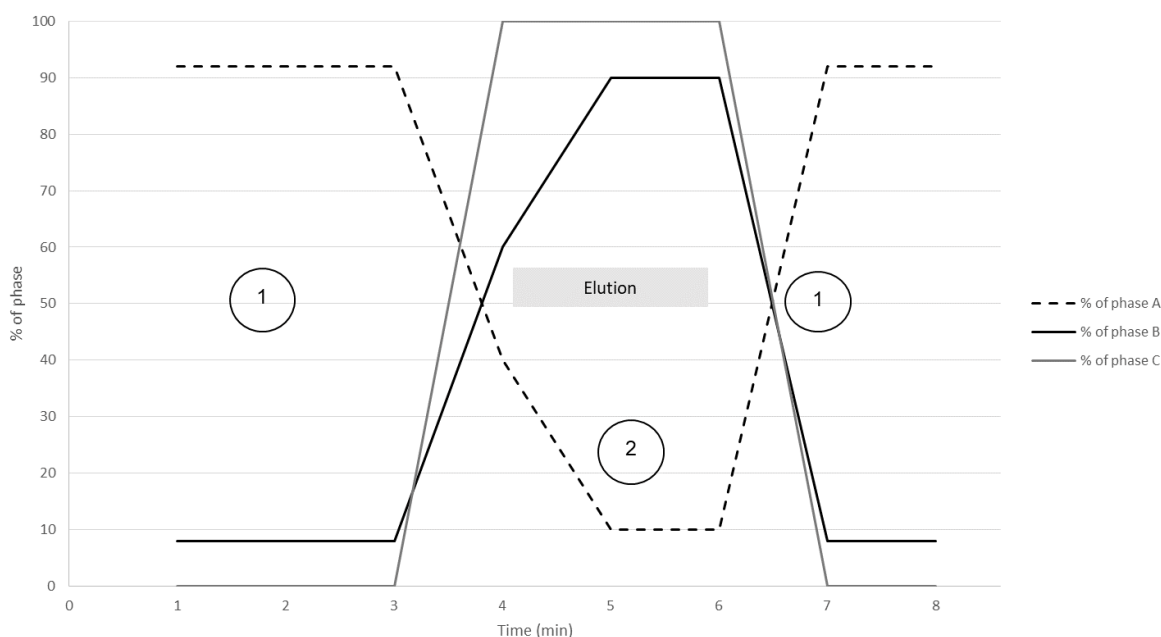
153 The sample preparation was performed as previously described (19), with
154 minor changes. Each point contained 20 μL working solution, 3 μL SIL-ADM, and
155 80 μL PBS. Following incubation for 1 hour at ambient temperature with smooth
156 agitation, protein-G wells containing the samples were washed three times with
157 500 μL PBS buffer. Then, elution was performed by two applications of 175 μL
158 50/50 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ + 0.1% formic acid before evaporation. The following steps,
159 consisting of reconstitution, trypsin digestion, and oxidation, were the same as
160 previously described (19).

161 **b. LC-MS/MS analysis**

162 i. Configuration of two-dimensional liquid chromatography (LC)

163 The Shimadzu[®] (Kyoto, Japan) LC system used consisted of an LC-20AD
164 quaternary pump (pump A) and two LC-20AD XR quaternary pumps (pumps B+C),
165 equipped with a SIL-20AC XR autosampler and a CTO-20AC column

166 compartment. Online sample (15 μ L injected) clean-up was performed with mobile
167 phase A (98/2 H₂O/ACN + 0.1% formic acid) and pump A on a μ -precolumn (C18
168 PepMap100, 5 μ m, 100 Å, Thermo Scientific[®], MA, USA). Chromatographic
169 separation was performed in backflush mode, on an XB C₁₈ analytical column
170 (Phenomenex[®] Kinetex, 2.6 μ m, 2.1 mm \times 50 mm, Aschaffenburg, Germany)
171 (Supplemental Figure 1). The column temperature was maintained at 60°C.
172 Elution was performed at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ under the following conditions:
173 mobile phase B from pump B (same composition as mobile phase A) and mobile
174 phase C from pump C (H₂O/ACN 20/80% + 0.1% formic acid): 0 to 4 min: 8% C; 4
175 to 6.3 min: 8 to 60% C; 6.3 to 6.4 min: 60 to 90% C; 6.4 to 6.9 min: 90% C; 6.9 to
176 7 min: 90 to 8% C, and 7 to 8.6 min: 8% C (Figure 1).



177

178 *Figure 1. Gradient of the mobile phase throughout the run of 8.6 min.*

179 *Step 1. Loading of the sample onto the purification column*

180 *Step 2. Elution of the analytes and transfer to the analytical column,*

181 *followed by analysis in the mass spectrometer*

182 ii. Mass-spectrometry conditions

183 Measurements were performed on an API 5500 QTRAP Tandem Mass
184 Spectrometer (Sciex[®], Toronto, Canada) equipped with a Turbo V[®] ion source,
185 operating in the positive electrospray ionization mode (ESI). Quantification was
186 performed using the MRM mode. The source-dependent parameters were set as
187 follows: ESI voltage, 5500 V; ion source temperature, 500°C; turbo heater gas, 45
188 psi; nebulizer, 60 psi; curtain gas, 30 psi; and collision gas: medium. Proteotypic
189 peptides were selected after *in silico* trypsin digestion using the online software
190 Peptide Cutter from ExPASy[®] (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne,
191 Switzerland) and their MRM setting was optimized using version 4.1 Skyline[®]
192 software (MacCoss Lab Software, Washington, USA). Analyte peak areas were
193 integrated using Analyst software (version 1.6.3) (Table 1).

Analytes	Signature peptide	Position in the antibody	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP(V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Rituximab	Q[PGQ]VQLQQPGAELV K PGASVK +2y6	H-FR1 aa. 1-19	<u>980.5</u>	<u>558.3</u>	75	10	55	15
	Q[PGQ]IVLSQSPAILSASPGEK +2y11	L-FR1 aa. 1-18	904.5	1069.6	75	10	37	12
Eculizumab	LLIYGATNLADGVPSR +2y5	L-CDR2 aa. 46-	<u>830.45</u>	<u>515.1</u>	55	10	30	15
	LLIYGATNLADGVPSR +2y3	61	830.45	359.2	55	10	30	15
SIL- Adalimumab	[¹³ C ₆ - ¹⁵ N ₂] APYTFGQG T K +2y7	L-CDR3 aa. 94- 103	539.3	746.4	100	10	28.3	15

194 *Q[PGQ]: N-terminal glutamine cyclized in pyroglutamate = N-terminal pyroglutamine; SIL, stable isotope-labeled.*

195

196 *Table 1. Mass spectrometry settings and proteotypic peptides: Position of the peptide in the antibody (H: heavy chain, L:*
197 *light chain), MRM transitions, voltage setting declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE), and*
198 *collision cell exit potential (CXP) for each analyte. Dwell times were set automatically by the scheduled MRM mode of the*
199 *software. Scheduled MRM detection was set at 30 s and the target scan time was fixed at 0.5 s. Underlined ions were used*
200 *as quantifiers and the second ions were used for confirmation. The trypsin miss-cleavage is represented in bold.*

201 iii. Method validation

202 The method was validated according to the Food and Drug Administration
203 (FDA) Guidelines for Industrial Bioanalytical Method Validation and the analytical
204 technique guide from the French Committee of Accreditation (COFRAC) (22,23).

205 Calibrator points were prepared from 1.0 to 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for RTX and 5.0 to
206 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ECU and three IQCs at 5.6, 45, and 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Acceptance
207 criteria to validate our improved LC-MS/MS method according to the FDA
208 guidelines are summarized in Supplemental Table 1.

209 The upper limit of quantitation (ULOQ) was fixed at the highest concentration of
210 the calibration curve and validated with the same levels of precision and accuracy
211 criteria as those required for the medium and high levels of the IQC.

212 **c. Comparison of the LC-MS/MS method with the two**
213 **ELISA kits for the quantification of rituximab in**
214 **human serum**

215 Serum RTX concentrations of 50 samples from primary membranous
216 nephropathy patients (from the study NCT02199145 entitled ‘Role of Anti-mouse
217 PLA2R1 ELISA in Membranous Nephropathy’) were determined during routine
218 TDM with Lisa Tracker[®] Duo Rituximab (Theradiag, Croissy Beaufourg, France).
219 The serum samples were then analyzed using our new LC-MS/MS method and
220 the Promonitor[®] RTX 1-DV kit (Grifols Progenika Biopharma, Vizcaya, Spain).

221 Both ELISA kits were used according to the manufacturer’s instructions. The
222 logistical adjustment logarithmic calibration curve was performed using
223 myassays.com for the Promonitor[®] RTX 1-DV kit. The detection of anti-drug
224 antibodies (ADA) was also performed during routine TDM using Lisa Tracker[®] Duo

225 Rituximab (Theradiag, Croissy Beaufourg, France). The performance
226 characteristics of both ELISA kits are summarized in Supplemental Table 2.

227 **d. Statistical analysis**

228 Continuous data are expressed as medians (10th-90th percentiles) and
229 categorical variables as numbers (percentages). The concentrations of RTX
230 obtained by LC-MS/MS were compared to those obtained by the ELISA kits using
231 non-parametric Passing and Bablok analysis and Bland and Altman plots (24).
232 Statistical tests were performed using Medcalc 12.5 (MedCalc Software, Ostende,
233 Belgium).

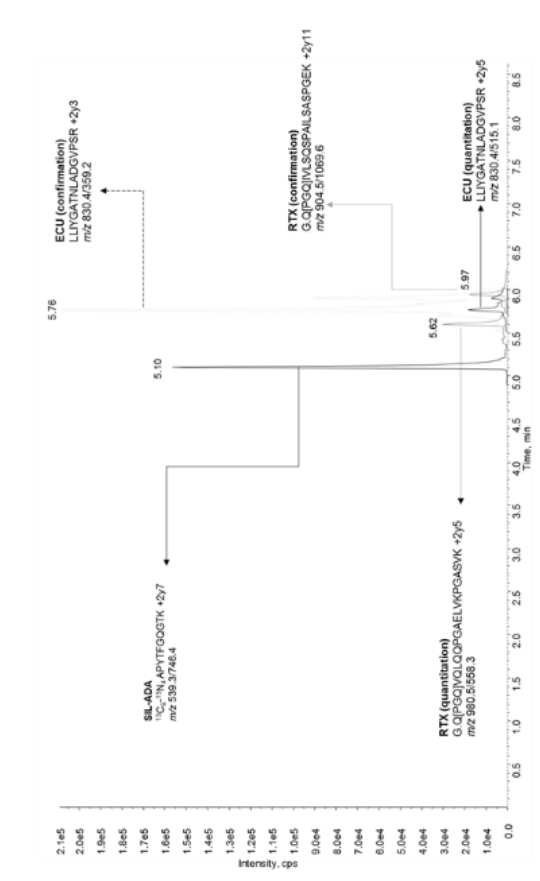
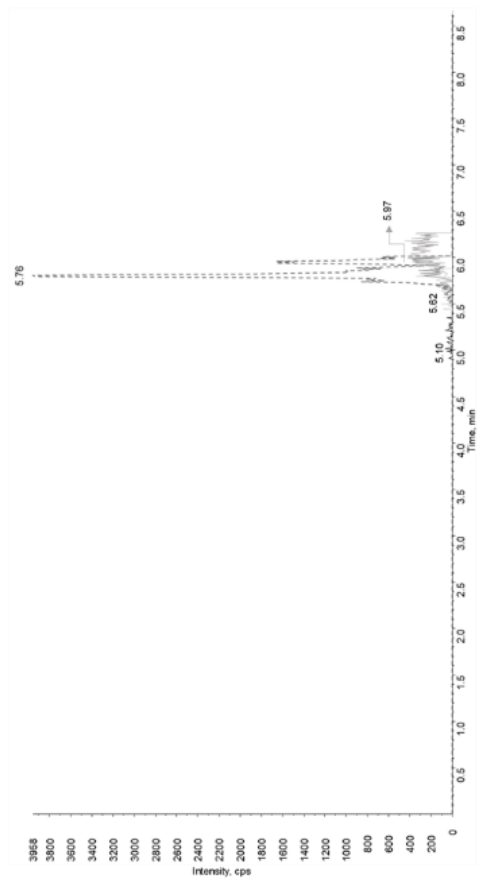
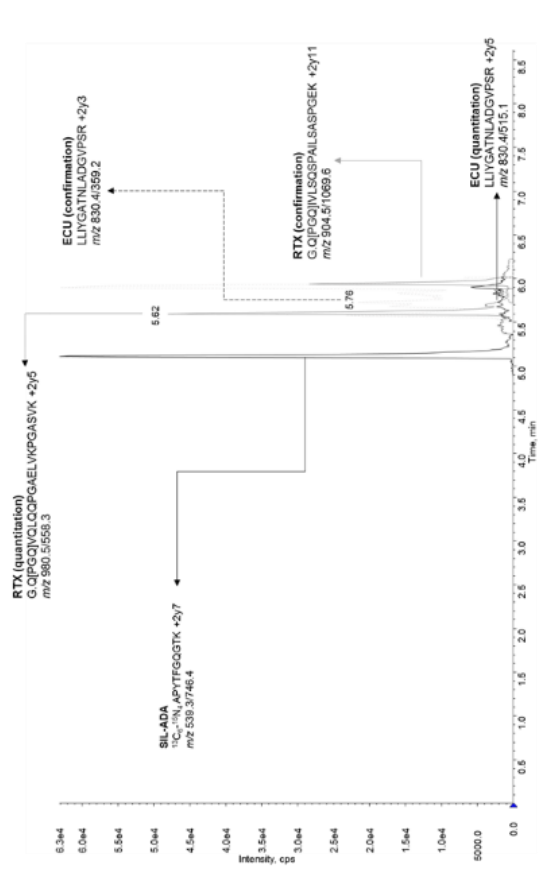
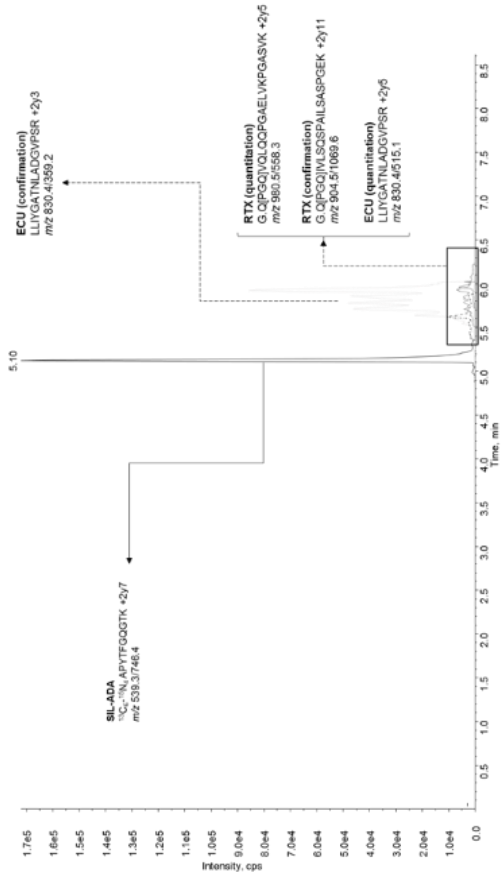
234 **C. Results**

235 **a. Validation of the LC-MS/MS method**

236 **i. Chromatograms**

237 Representative chromatograms are shown in Figure 2 of a double blank (2a), a
238 blank (2b), a calibration curve point set at $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ECU and RTX (2c), and
239 a sample from a patient treated with RTX and measured to be $19.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (2d).

240 The signal measured in the double blank (2a) showed the absence of any
241 interference due to signals from endogenous compounds overlapping with the
242 selected ion transition for the peptide selected for both mAbs and SIL-ADM. The
243 blank (2b) showed the MRM signals measured for the transitions corresponding to
244 unlabeled peptides to be at the level of the background noise in drug-free serum
245 spiked with SIL-ADM. These levels of interference were not significant relative to
246 the level of signal obtained at the LLOQ ($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for RTX and $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for
247 ECU).



249 *Figure 2. Chromatograms illustrating the selected proteotypic peptides of rituximab*
250 *(RTX), éculizumab (ECU), and the internal standard (SIL-ADM).*

251 *a. Double blank showing no interference by RTX, ECU, or SIL-ADM*

252 *b. Drug-free plasma with SIL-ADM (blank)*

253 *c. Calibration curve point at $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of RTX (1) and ECU (2)*

254 *d. Sample from a patient treated with RTX and measured at*
255 *$19.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ using SIL-ADM and showing no interference by ECU*

256

257 *ii. Accuracy and precision*

258 Within-day and between-day imprecision and accuracy are presented for the
259 three IQCs in Table 2. All calculated concentrations were within acceptance limits
260 (< 15% for precision and within $\pm 15\%$ of the nominal value for accuracy, except
261 for the LLOQ for which < 20% is accepted).

Analyte	IQC concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Within-day precision and accuracy (n = 6)			Between-day precision and accuracy (n = 6)		
		Mean concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)	Bias (%)	Mean concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV (%)	Bias (%)
RTX	5.6	4.8	6.7	-13.8	4.7	7.8	-15.2
	45	47.0	5.8	-4.5	45.3	7.6	0.78
	150	131.8	14.1	-12.1	133.8	9.0	-10.8
ECU	5.6	6.6	12.3	17.9	6.3	5.4	11.7
	45	39.6	7.2	-12.0	45.1	14.4	0.3
	150	131.0	11.5	-12.7	151.7	10.8	1.1

262 *RTX: rituximab, ECU: éculizumab, IQC: Internal quality control, CV: coefficient of variation.*

263 *Table 2. Within- and between-day precision (expressed as coefficients of variation) and accuracy (expressed as bias) of the*

264 *LC-MS/MS method for the quantification of rituximab (RTX) and éculizumab (ECU).*

265 iii. Linearity and limits of quantification

266 Ratios of the peptide peak areas and SIL-ADM peptide peak areas (y-axis)
267 were plotted against the ratios of mAb and SIL-ADM concentrations (x-axis) and
268 the calibration curve calculated for a 1/x-weighted least squares linear regression,
269 with a coefficient of determination (r^2) > 0.99 for both RTX and ECU. The LLOQ for
270 RTX was 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (bias = 1.3%, CV = 17.0%, n = 6) and 5.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for ECU
271 (bias = -0.5%, CV = 16.1%, n = 6). The ULOQ was 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for both analytes
272 (RTX: bias = -0.9%, CV = 9.9% – ECU: bias = 0.2%, CV = 3.8%, n = 6). These
273 limits comply with FDA and COFRAC guidelines (23).

274 iv. Carry-over interference

275 The percentage of contamination was -0.22% for RTX and 0.72% for ECU (n =
276 3). These low contamination rates exclude any intersample contamination.

277 v. Stability of prepared samples

278 The relative bias (relative bias = $\frac{(\text{concentration } J_0 - \text{concentration } J_{24h})}{\text{concentration } J_{24h}}$) was < 15%
279 (n = 6) for both RTX and ECU after storage of the IQC samples in injection vials at
280 4°C for 24 or 96 hours (Supplemental Table 3).

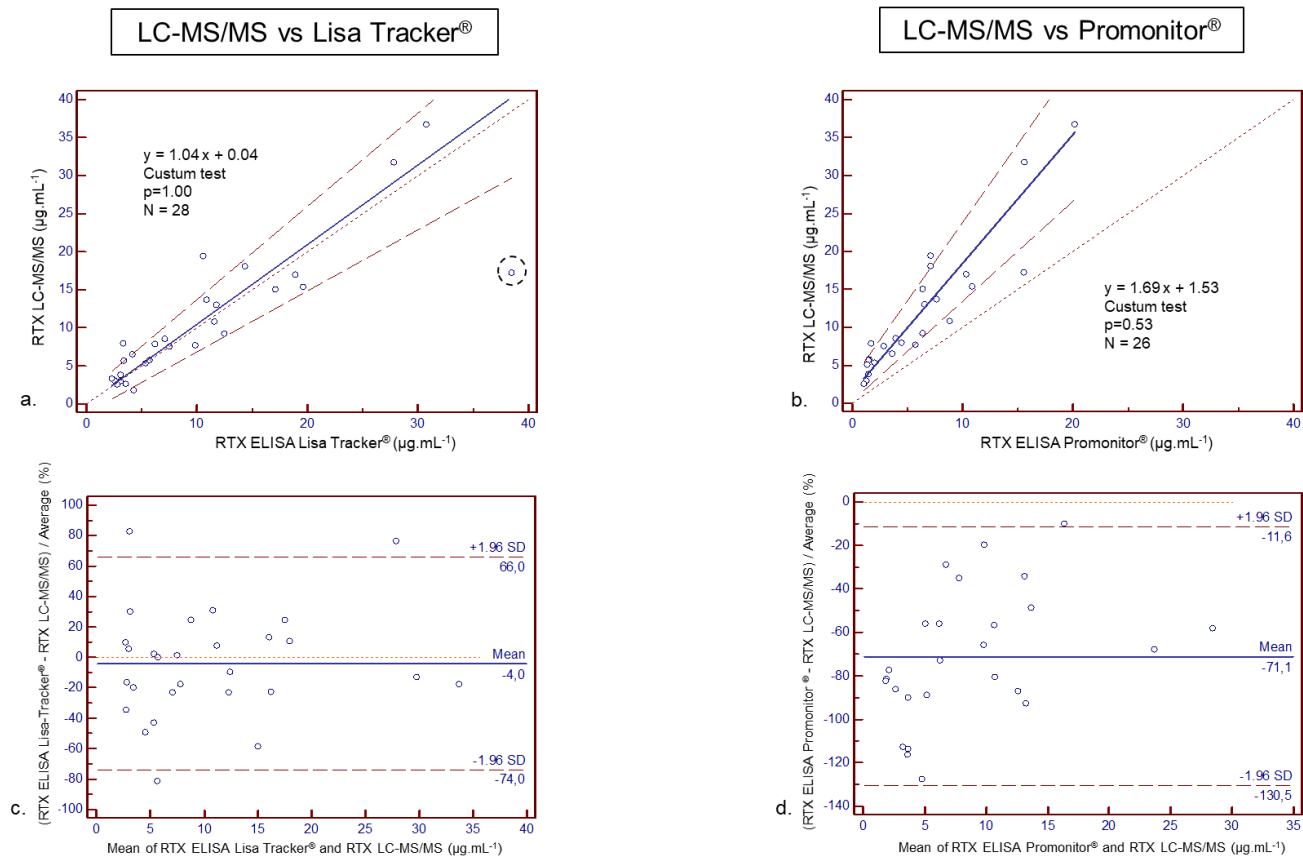
281 **b. Comparison of the LC-MS/MS method with the**
282 **ELISA methods for the quantification of RTX in**
283 **human serum**

284 RTX concentrations determined with the LC-MS/MS method were compared with
285 those obtained with the two commercial ELISA kits. Passing and Bablok
286 regression analysis and Bland-Altman plots for each LC-MS/MS-ELISA pair are
287 shown in Figure 3. Results of the samples with RTX concentrations outside the

288 analytical range for at least one method are presented in Table 3.

Sample (n = 25)	RTX LC-MS/MS ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RTX Lisa Tracker [®] ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RTX Promonitor [®] ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Presence of ADA
P01	1.2	< 2	< 0.75	Negative
P02	74.7	> 50	> 51.0	Negative
<i>P04</i>	< 1	< 2	3.96	<i>Positive</i>
P05	< 1	< 2	< 0.75	Negative
P08	< 1	< 2	< 0.75	Negative
P10	< 1	< 2	< 0.75	Negative
P12	1.8	4.31	< 0.75	Negative
P13	< 1	< 2	< 0.75	Negative
P14	< 1	< 2	< 0.75	Negative
P16	< 1	4.98	< 0.75	Negative
P18	< 1	< 2	5.29	Negative
<i>P19</i>	< 1	< 2	< 0.75	<i>Positive</i>
<i>P20</i>	< 1	< 2	< 0.75	<i>Positive</i>
P25	< 1	< 2	3.25	Negative
<i>P27</i>	< 1	< 2	< 0.75	<i>Positive</i>
<i>P29</i>	< 1	< 2	< 0.75	<i>Positive</i>
P30	< 1	< 2	< 0.75	Negative
P32	3.0	2.58	< 0.75	Negative
P34	3.7	< 2	< 0.75	Positive
P36	< 1	< 2	< 0.75	<i>Positive</i>
P38	< 1	< 2	3.37	<i>Positive</i>
P43	3.3	2.31	< 0.75	Negative
P45	5.3	< 2	1.4	Positive
<i>P47</i>	< 1	< 2	< 0.75	<i>Positive</i>
<i>P48</i>	< 1	< 2	< 0.75	<i>Positive</i>

289 *Table 3. Agreement between rituximab (RTX) concentrations that were out of the*
290 *analytical range for at least one of the techniques ($< 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for LC-MS/MS,*
291 *$< 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ or $> 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for Lisa Tracker[®], and $< 0.75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ or $> 51 \mu\text{g.mL}^{-1}$*
292 *for Promonitor[®]). Characters in italics indicate samples with antidrug antibodies*
293 *(ADA) and undetectable RTX concentrations, regardless of the method used ($n =$*
294 *9). Bold characters indicate samples with ADA and RTX detected by the LC-*
295 *MS/MS method but not ELISA ($n = 2$).*



296

297 *Figure 3. Interassay comparison of the methods of RTX quantification: LC-MS/MS vs Lisa Tracker[®] (1) or Promonitor[®] (2).*

298 *a-b: Passing & Bablock representations*

299 *c-d: Bland-Altman plots. The difference between two measurements ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) is plotted on the y-axis and the average of*

300 *the two measurement ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) on the x-axis. Dashed lines represent the 95% limits of agreement of the bias.*

301 i. LC-MS/MS versus Lisa Tracker[®]

302 No significant deviation from linearity was shown by the Passing and Bablok
303 regression analysis (Figure 3a) (Custum test, $p = 1.00$, slope = 1.04, $n = 28$). Only
304 one patient (P17) had a notable discrepancy (circled with a dotted line in Figure
305 3a): $17.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ with our LC-MS/MS method vs $38.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ with the Lisa-
306 Tracker[®] assay. The Bland and Altman plot showed the mean bias of these two
307 methods to be close to zero (4%) (Figure 3c).

308 Agreement between the two methods was also good for samples with RTX
309 concentrations outside the analytical range (Table 3). RTX was undetectable in 17
310 samples by both the Lisa Tracker[®] and LC-MS/MS methods. RTX was
311 undetectable in three samples (P01, P34, P45) with Lisa Tracker[®], but low
312 concentrations were measured by LC-MS/MS. Conversely RTX was undetectable
313 in one sample (P16) by LC-MS/MS but a low concentration was measured by Lisa
314 Tracker[®]. One sample (P02) had a RTX concentration above the ULOQ for the
315 Lisa Tracker[®] assay, with a concentration of $74.7 \mu\text{g. mL}^{-1}$ by LC-MS/MS.

316 ii. LC-MS/MS versus Promonitor[®]

317 Passing and Bablok regression analysis revealed no significant deviation from
318 linearity (Custum test, $p = 0.53$, $n = 26$) (Figure 3b). The slope from the equation
319 for the linear regression (1.69) indicates that LC-MS/MS overestimated the
320 concentrations by 69% relative to those estimated using the Promonitor[®] kit. The
321 Bland and Altman chart (Figure 3d) plot showed the mean difference to be 71.1%,
322 regardless of the concentration.

323 The two methods were in agreement for RTX concentrations outside the
324 analytical range (Table 3). RTX was undetectable by both Promonitor[®] and LC-
325 MS/MS for 14 samples. It was undetectable by Promonitor[®] but low concentrations

326 were measured by LC-MS/MS for five samples (P01, P12, P32, P34, P43) and it
327 was undetectable by LC-MS/MS but low concentration were measured by
328 Promonitor[®] for four (P04, P18, P25, P38). The RTX concentration of sample P02
329 was above the ULOQ of the Promonitor[®] assay, as it was for the Lisa-Tracker[®] kit.

330 iii. Impact of anti-drug antibodies on RTX quantification

331 ADA was detected in 11 samples (italicized rows in Table 3). Among them,
332 RTX was undetectable in nine, regardless of the method used. Low concentrations
333 of RTX were measured in two samples by the LC-MS/MS method, whereas it was
334 undetectable for both ELISA kits (P34) or only the Lisa-Tracker[®] kit (P45).

335 **D. Discussion**

336 Our LC-MS/MS method allows the simultaneous quantification of RTX and
337 ECU, two mAbs widely used in nephrology. The new specific peptide for RTX
338 quantification enables better sensitivity. In addition, the large range of
339 concentrations measured with this LC-MS/MS method are consistent with its use
340 for TDM of both RTX and ECU (8,13,15).

341 RTX serum concentrations are highly variable (25) and can be particularly low,
342 even undetectable in some patients (8,26,27). As a threshold of 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the
343 trough RTX concentration has been associated with a long-term response in
344 primary membranous nephropathy (26), our previous LC-MS/MS method of
345 quantification of RTX (19), like others (16,28), with a LLOQ of 5.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, was not
346 suitable for RTX TDM. To improve the sensitivity of our previous LC-MS/MS
347 method (19), two new proteotypic peptides with several unique features were
348 monitored for RTX quantification (see Table 1). First, both peptides have an N-
349 terminal glutamine cyclized in pyroglutamate, corresponding to the loss of an $-\text{NH}_3$

350 group, i.e. -17 Da. Although the spontaneous *in vivo* formation of pyroglutamate
351 has been well described (29), its origin is hypothetical and may occur at various
352 moments: during mAb production in the bioreactor, sample preparation, or the
353 analytical process (liquid chromatography and/or electrospray ionization).
354 Moreover, the percentage of N-terminal pyroglutamine that occurs during the
355 preparation process appears to depend on the temperature and buffer composition
356 (30,31). Second, the sequence of the RTX quantification peptide includes an
357 arginine (K) followed by a proline (P), which is a site of miss-cleavage by trypsin
358 (32) (Table 1). Finally, MS sensitivity turned out to be better when monitoring this
359 miss-cleaved peptide than that previously monitored (19), allowing us to obtain a
360 LLOQ of 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, making our LC-MS/MS method compatible for RTX TDM,
361 including for patients with increased RTX clearance (8,26).

362 ECU, another mAb used by nephrologists, also shows highly variable
363 pharmacokinetics, with an established exposure-effect relationship (12).
364 Simulation data have shown that ECU TDM can decrease the variability of ECU
365 concentrations and the inhibition of C5 activity, while reducing costs (12). As there
366 are currently few analytical methods for ECU TDM (10,21,33,34), we integrated
367 ECU into our LC-MS/MS method.

368 Our LC-MS/MS method had within-day and between-day accuracy and
369 precision within 15%, fulfilling FDA validation criteria (23). The range of
370 concentrations measured with our LC-MS/MS method was broad for both mAbs
371 (from 1 to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for RTX and 5.0 to 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ECU), as for other
372 previously described LC-MS/MS methods (16,21,33). Such a wide range allows
373 direct quantification of RTX/ECU in human samples, whereas ELISA methods
374 often require dilution (see supplemental Table 3 and (10,12,34)), as illustrated

375 here by the results with sample P02 (see Table 3). Our analytical approach is thus
376 suitable for performing TDM of RTX and ECU.

377 The second aim of this study was to compare RTX concentrations measured
378 with our LC-MS/MS method with those measured with two commercial ELISA kits:
379 Lisa Tracker[®] and Promonitor[®]. The RTX concentrations measured by LC-MS/MS
380 correlated strongly with those determined by both ELISA assays (Custum test,
381 $p = 1.00$ and $p = 0.53$ for Lisa-Tracker[®] and Promonitor[®] kits, respectively).
382 Agreement between the results of the LC-MS/MS method and the Lisa-Tracker[®] kit
383 was excellent (slope of 1.04 in Figure 3a, a bias of 4% in Figure 3b), as previously
384 found for ADM (20). Such a finding suggests that the therapeutic range of RTX
385 proposed in clinical studies based on results of the Lisa-Tracker[®] kit (8) could be
386 transposable to RTX TDM with our LC-MS/MS method.

387 Conversely, comparison of RTX concentrations measured using our LC-
388 MS/MS method and the Promonitor[®] kit revealed a high systematic bias, with RTX
389 concentrations approximately 69% higher for LC-MS/MS (Figure 3b and 3d). Such
390 discrepancies between LC-MS/MS and ELISA have been widely reported for the
391 quantification of mAbs and could be multifactorial. The lack of specificity of ELISA,
392 with non-specific binding of interfering proteins, may be responsible. Moreover, the
393 presence of ADA could differentially affect methods for the quantification of RTX.
394 Indeed, commercially available ELISA only quantifies the unbound excess of the
395 drug and/or ADA and not when they are in a complex with each other (14).
396 Drug/ADA complexes may also interfere with the protein-G purification step in our
397 LC-MS/MS method (35).

398 In our study, RTX was undetectable in 9/11 samples with ADA, regardless of
399 the method used (Table 3), which means that the systematic bias observed

400 between the LC-MS/MS method and the Promonitor[®] kit was not related to ADA.
401 For the other two samples with ADA, RTX could be quantified at low
402 concentrations by LC-MS/MS, whereas it was undetectable using one or both
403 ELISA kits. Although this finding needs to be confirmed in a larger cohort, this
404 result suggests that our LC-MS/MS approach may be better for patients who have
405 become immunized against their biological.

406 Our study had several limitations. First, the quantification of a RTX biosimilar
407 using our LC-MS/MS method is uncertain and needs to be verified, as a single
408 change in the amino-acid sequence would change the mass/charge ratio of the
409 peptides. Moreover, our study did not include any clinical data, which limited
410 investigations to explain discrepancies between the analytical methods, especially
411 for sample P17 (Figure 3).

412 **E. Conclusion**

413 We describe a precise and accurate LC-MS/MS method for the
414 simultaneous quantification of RTX and ECU in human samples. This method
415 could be used in further clinical studies to determine the therapeutic
416 concentrations of RTX and ECU associated with clinical efficacy.

417

418 **Acknowledgements**

419 The authors thank Karine Scalabrino for her excellent technical assistance and
420 Aurélien Millet for his chemical and analytical help.

421 **Conflict of interest**

422 The authors report no conflicts of interest related to this work.

423 References

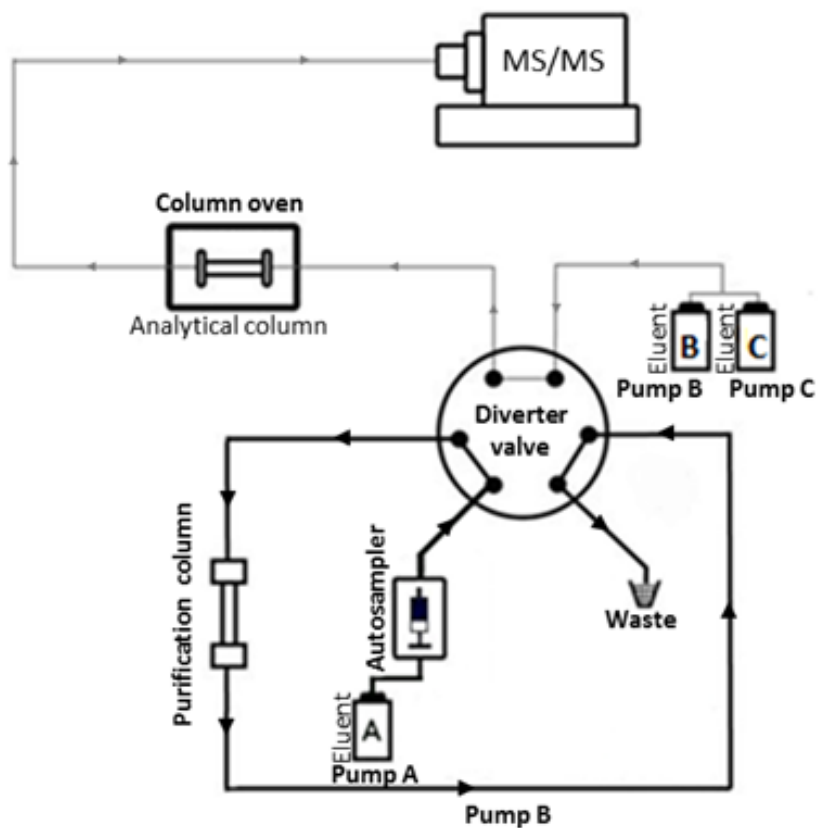
- 424 1. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody
425 market. *mAbs*. 2015 Jan 2;7(1):9–14.
- 426 2. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in
427 2020. *MAbs*. 2019 Dec 26;12(1):1703531.
- 428 3. Mould DR, Green B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of
429 monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development.
430 *BioDrugs*. 2010 Feb 1;24(1):23–39.
- 431 4. European Medicines Agency. Summary of product characteristics : rituximab.
432 1998.
- 433 5. Bomback AS, Fervenza FC. Membranous Nephropathy: Approaches to
434 Treatment. *American Journal of Nephrology*. 2018;47(1):30–42.
- 435 6. European Medicines Agency. Summary of product characteristics :
436 éculizumab. 2007.
- 437 7. Grenda R, Durlik M. Eculizumab in Renal Transplantation: A 2017 Update.
438 *Ann Transplant*. 2017 Sep 12;22:550–4.
- 439 8. Seitz-Polski B, Dahan K, Debiec H, Rousseau A, Andreani M, Zaghrini C, et
440 al. High-Dose Rituximab and Early Remission in PLA2R1-Related
441 Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019 Aug 7;14(8):1173–
442 82.
- 443 9. Berinstein NL, Grillo-López AJ, White CA, Bence-Bruckler I, Maloney D,
444 Czuczman M, et al. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8)
445 concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade
446 or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998 Sep;9(9):995–1001.
- 447 10. Wehling C, Amon O, Bommer M, Hoppe B, Kentouche K, Schalk G, et al.
448 Monitoring of complement activation biomarkers and éculizumab in
449 complement-mediated renal disorders. *Clin Exp Immunol*. 2017
450 Feb;187(2):304–15.
- 451 11. Roblin X, Attar A, Lamure M, Savarieau B, Brunel P, Duru G, et al. Cost
452 savings of anti-TNF therapy using a test-based strategy versus an empirical
453 dose escalation in Crohn's disease patients who lose response to infliximab. *J*
454 *Mark Access Health Policy*. 2015 Oct 30;3:29229.
- 455 12. Wijnsma KL, ter Heine R, Moes DJAR, Langemeijer S, Schols SEM,
456 Volokhina ElenaB, et al. Pharmacology, Pharmacokinetics and
457 Pharmacodynamics of Eculizumab, and Possibilities for an Individualized
458 Approach to Eculizumab. *Clin Pharmacokinet*. 2019;58(7):859–74.

- 459 13. Gatault P, Brachet G, Ternant D, Degenne D, Récipon G, Barbet C, et al.
460 Therapeutic drug monitoring of éculizumab: Rationale for an individualized
461 dosing schedule. *MAbs*. 2015 Sep 4;7(6):1205–11.
- 462 14. Dreesen E, Bossuyt P, Mulleman D, Gils A, Pascual-Salcedo D. Practical
463 recommendations for the use of therapeutic drug monitoring of
464 biopharmaceuticals in inflammatory diseases. *Clinical Pharmacology:
465 Advances and Applications*. 2017;9:101–11.
- 466 15. Dreesen E, Gils A. Pharmacodynamic Monitoring of Biological Therapies in
467 Chronic Inflammatory Diseases. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2019
468 Apr;41(2):131–141.
- 469 16. Mills JR, Cornec D, Dasari S, Ladwig PM, Hummel AM, Cheu M, et al. Using
470 Mass Spectrometry to Quantify Rituximab and Perform Individualized
471 Immunoglobulin Phenotyping in ANCA-Associated Vasculitis. *Anal Chem*.
472 2016 21;88(12):6317–25.
- 473 17. Bertin D, Serrero M, Grimaud JC, Desjeux A, Desplat-Jégo S. Monitoring of
474 infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel
475 diseases: A comparison of three commercially available ELISA kits. *Cytokine*.
476 2020 Feb 1;126:154859.
- 477 18. Chiu H-H, Liao H-W, Shao Y-Y, Lu Y-S, Lin C-H, Tsai I-L, et al. Development
478 of a general method for quantifying IgG-based therapeutic monoclonal
479 antibodies in human plasma using protein G purification coupled with a two
480 internal standard calibration strategy using LC-MS/MS. *Anal Chim Acta*. 2018
481 Aug 17;1019:93–102.
- 482 19. Willeman T, Jourdil J-F, Gautier-Veyret E, Bonaz B, Stanke-Labesque F. A
483 multiplex liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the
484 quantification of seven therapeutic monoclonal antibodies: Application for
485 adalimumab therapeutic drug monitoring in patients with Crohn's disease.
486 *Anal Chim Acta*. 2019 Aug 27;1067:63–70.
- 487 20. Jourdil J-F, Némoz B, Gautier-Veyret E, Romero C, Stanke-Labesque F.
488 Simultaneous Quantification of Adalimumab and Infliximab in Human Plasma
489 by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug
490 Monitoring*. 2018 Aug;40(4):417–24.
- 491 21. Iwamoto N, Takanashi M, Yokoyama K, Yonezawa A, Denda M, Hashimoto
492 M, et al. Multiplexed monitoring of therapeutic antibodies for inflammatory
493 diseases using Fab-selective proteolysis nSMOL coupled with LC-MS. *J
494 Immunol Methods*. 2019 Sep;472:44–54.
- 495 22. COFRAC - Section Santé humaine. Guide technique d'accréditation de
496 vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie
497 médicale. 2018.
- 498 23. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation - Guidance for
499 Industry. 2018.

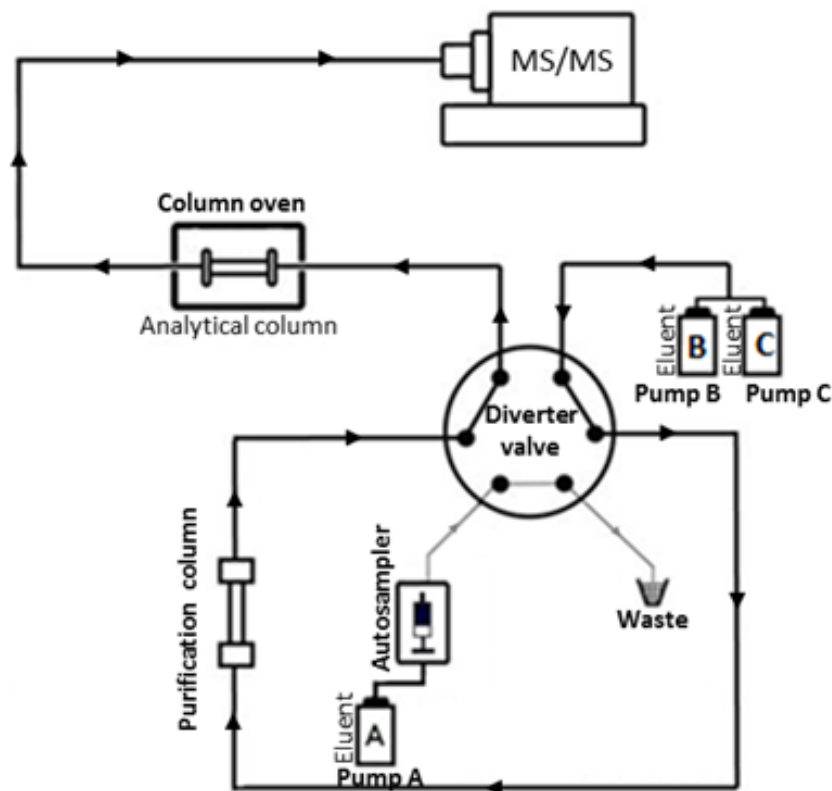
- 500 24. Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting
501 difference against standard method is misleading. *Lancet*. 1995 Oct
502 21;346(8982):1085–7.
- 503 25. Regazzi MB, Iacona I, Avanzini MA, Arcaini L, Merlini G, Perfetti V, et al.
504 Pharmacokinetic behavior of rituximab: a study of different schedules of
505 administration for heterogeneous clinical settings. *Ther Drug Monit*. 2005
506 Dec;27(6):785–92.
- 507 26. Boyer-Suavet S, Andreani M, Cremoni M, Brglez V, Benzaken S, Bernard G,
508 et al. Rituximab bioavailability in primary membranous nephropathy. *Nephrol
509 Dial Transplant*. 2019 Aug 1;34(8):1423–5.
- 510 27. Fogueri U, Cheungapakitporn W, Bourne D, Fervenza FC, Joy MS. Rituximab
511 Exhibits Altered Pharmacokinetics in Patients With Membranous
512 Nephropathy. *Ann Pharmacother*. 2019;53(4):357–63.
- 513 28. Reinders LMH, Klassen MD, Jaeger M, Teutenberg T, Tuerk J. Development
514 of an analytical method to assess the occupational health risk of therapeutic
515 monoclonal antibodies using LC-HRMS. *Anal Bioanal Chem*. 2018 Apr
516 1;410(11):2829–36.
- 517 29. Liu YD, Goetze AM, Bass RB, Flynn GC. N-terminal glutamate to
518 pyroglutamate conversion in vivo for human IgG2 antibodies. *J Biol Chem*.
519 2011 Apr 1;286(13):11211–7.
- 520 30. Liu Z, Valente J, Lin S, Chennamsetty N, Qiu D, Bolgar M. Cyclization of N-
521 Terminal Glutamic Acid to pyro-Glutamic Acid Impacts Monoclonal Antibody
522 Charge Heterogeneity Despite Its Appearance as a Neutral Transformation.
523 *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019 Oct 1;108(10):3194–200.
- 524 31. Dick LW, Kim C, Qiu D, Cheng K-C. Determination of the origin of the N-
525 terminal pyro-glutamate variation in monoclonal antibodies using model
526 peptides. *Biotechnol Bioeng*. 2007 Jun 15;97(3):544–53.
- 527 32. Rodriguez J, Gupta N, Smith RD, Pevzner PA. Does trypsin cut before
528 proline? *J Proteome Res*. 2008 Jan;7(1):300–5.
- 529 33. Ladwig PM, Barnidge DR, Willrich MAV. Quantification of the IgG2/4 kappa
530 Monoclonal Therapeutic Eculizumab from Serum Using Isotype Specific
531 Affinity Purification and Microflow LC-ESI-Q-TOF Mass Spectrometry. *J Am
532 Soc Mass Spectrom*. 2017;28(5):811–7.
- 533 34. Passot C, Desvignes C, Ternant D, Bejan-Angoulvant T, Dureau A-C, Gatault
534 P, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent
535 assay to measure free éculizumab concentration in serum. *Bioanalysis*. 2017
536 Aug;9(16):1227–35.
- 537 35. Heinig K, Wirz T, Schick E, Guenzi A. Bioanalysis of therapeutic peptides:
538 Differentiating between total and anti-drug antibody bound drug using liquid

539 chromatography–tandem mass spectrometry quantitation. Journal of
540 Chromatography A. 2013 Nov 5;1316:69–77.

Supplemental Figure 1. Scheme describing the 2-D liquid chromatography system



Step 1. Loading of the sample on the purification column



Step 2. Elution of analytes and their transfer to the analytical column, followed by the analysis in the mass spectrometer

Supplemental Table 1. Summary of acceptance criteria to validate our improved LC-MS/MS method according to FDA guidelines.

Parameters	Analysis	Acceptance criteria
<u>Reproducibility</u> : between-day accuracy (bias) and precision	Assessed by extraction of all IQCs (n = 3) in six independent runs on independent days.	Accuracy should be within $\pm 15\%$ of the nominal value (and $\pm 20\%$ for the LLOQ) Precision, expressed as the coefficient of variation (CV), should be $< 15\%$ (and $< 20\%$ for the LLOQ)
<u>Repeatability</u> : within-day accuracy (bias) and precision	Assessed by six extractions of all IQCs (n = 3) on the same day during the same run	
<u>Sensitivity</u> (defined by the LLOQ)	Assessed by six independent runs	The LLOQ was fixed as the lowest concentration of the calibration curve: accuracy $\pm 20\%$ and precision $\pm 20\%$ CV
<u>Dilution</u> (four-fold)*	Five replicates a plasma blank spiked at a concentration above the ULOQ and then diluted	Accuracy $\pm 15\%$ and precision $\pm 15\%$ CV
<u>Carry-over interference</u>	Assessed by analyzing three injections of low-level IQC after three injections of high-level IQC	The percentage of contamination should not exceed 20% of the LLOQ.
<u>Stability</u> of prepared samples	Injection vials at 4°C for 24 and 96 h	Accuracy $\pm 15\%$: deviation from the target concentration measured in freshly prepared samples should be $\pm 15\%$

*not performed here since our method allows quantification of a large range of concentrations for both RTX and ECU

Supplemental Table 2. Comparison of commercial assay performance, according to validation tests of the manufacturer, and our in-house mass-spectrometry method

	RTX assays		
	Lisa-Tracker [®]	Promonitor [®] RTX 1-DV	LC-MS/MS
Test duration	200 min	165 min	17 hours, including 12 hours in the incubator
Measuring range	2 - 50 µg.mL ⁻¹	3.75 – 51 µg.mL ⁻¹	1 - 200 µg.mL ⁻¹
Pretreatment of serum/plasma	Predilution 1:1001 by Theralis [®]	Predilution 1:50 (or 1:200 if > ULOQ and 1:10 if < LLOQ)	Protein G purification
Coating	Monoclonal anti-RTX antibodies	Monoclonal anti-RTX antibodies	NA
Immune complexes revelation step(s)	Two steps: Anti-human IgG biotinylated antibodies HRP streptavidin	One step: HRP-labelled anti-RTX monoclonal antibody	NA
LLOQ	2 µg.mL ⁻¹	3.75 µg.mL ⁻¹ with a predilution 1:50	1 µg.mL ⁻¹
ULOQ	No recommendation on factor dilution	Dilution 1/200 or 1/2500 possible	
Automatization	Possible, not here	Possible, not here	Yes (not the sample pretreatment)

Volume sample (μL)	3	10	20
ELISA method	Bridging	Bridging	NA
Interference	Cross reaction with ibritumomab, tiuxetan, and tositumomab (2 others anti-CD20) Treatment with biotin can affect the results	No interference with infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab, tocilizumab, or certolizumab	

LLOQ: lower limit of quantification, ULOQ: upper limit of quantification, NA: not available, HRP: horse radish peroxidase

Supplemental Table 3. Stability of RTX and ECU in the injection vials after storage for 24 or 96 hours at +4°C in the auto sampler (n = 6).

Drug	Nominal concentration (µg mL ⁻¹)	Measured concentration (µg mL ⁻¹)		
		0 h	24 h	96 h
Rituximab	5.6	4.5	-4.1	-2.4
	45	46.3	-1.1	-0.2
	150	119.3	-0.87	1.2
Eculizumab	5.6	6.2	-3.0	-2.1
	45	42.3	-1.4	2.3
	150	131.0	-2.0	-2.8

2. Publication n°2

**Variability of rituximab and tocilizumab
concentrations in patients with rheumatoid
arthritis**

(Soumission en cours)

Rationnel et objectifs : Les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) en échec sous anti-TNF α sont éligibles à un traitement par d'autres anticorps monoclonaux comme le RTX et le TCZ. Tandis que la variabilité pharmacocinétique et le lien concentration-effet des anti-TNF α a bien été démontré, peu de données existent sur ces alternatives thérapeutiques. Cette étude a eu pour but l'évaluation de la variabilité des concentrations sériques en RTX et en TCZ chez des patients atteints de PR, traités en seconde ligne. Le lien entre la concentration en RTX/TCZ et la réponse clinique a également été investigué.

Méthodes : Les concentrations en RTX (n = 35) et TCZ (n = 46) de patients atteints de PR ont été déterminées à 24 semaines par CL-SM/SM. Notre méthode de quantification, préalablement développée (70) fut améliorée grâce à l'intégration du RTX isotypiquement marqué comme standard interne. La réponse clinique à la semaine 24 fut évaluée par la variation du DAS28 (*Disease activity score 28*) et selon les recommandations EULAR (*European League Against Rheumatism*).

Résultats : Les concentrations résiduelles en RTX (médiane [10^{ème}-90^{ème} percentiles] : <0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [<0.1 – 5.1]) et TCZ (5.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [<0.1–27.8]) étaient très variables avec des coefficients de variation respectifs de 171.3%. Excepté le traitement par méthotrexate qui était associé à des concentrations en RTX diminuées (p = 0.03), aucun autre déterminant des concentrations de RTX et TCZ n'a pu être identifié. La réponse au traitement n'était, par ailleurs, pas associée aux concentrations en RTX ou en TCZ.

Conclusion : La variabilité de la concentration en TCZ et en RTX à 24 semaines chez les patients atteints de PR traités en seconde ligne était très élevée. Aucune relation entre la concentration et la réponse clinique n'a été démontrée.

1 **Variability of rituximab and tocilizumab trough concentrations in patients**
2 **with rheumatoid arthritis**

3

4 Aurélie Truffot¹, Elodie Gautier-Veyret², Athan Baillet³, Jean-François Jourdil¹,
5 Françoise Stanke-Labesque², Jacques-Eric Gottenberg⁴

6

7 1, Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogénétique et Toxicologie, CHU
8 Grenoble Alpes

9 2, Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000, Grenoble,
10 France

11 3, University Grenoble Alpes, GREPI TIMC, CNRS UMR 5525, Grenoble, France.

12 4, Département of Rheumatology, National Reference Center for Rare Systemic
13 Autoimmune Diseases, Strasbourg University Hospital, CNRS Institut de Biologie
14 Moléculaire et Cellulaire, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique/Laboratory
15 of excellence MEDALIS, Université de Strasbourg, Hôpital Hautepierre, 1 Avenue
16 Molière, 67000 Strasbourg. Strasbourg, France

17

18 Corresponding author:

19 Dr Jacques-Eric Gottenberg

20 Département of Rheumatology, National Reference Center for Rare Systemic
21 Autoimmune Diseases, Strasbourg University Hospital, CNRS Institut de Biologie
22 Moléculaire et Cellulaire, Immunopathologie et Chimie Thérapeutique/Laboratory

23 of excellence MEDALIS, Université de Strasbourg, Hôpital Hautepierre, 1 Avenue
24 Molière, 67000 Strasbourg. Strasbourg, France

25 Tel: +33 (0)3 88 12 79 53

26 Email: Jacques-eric.gottenberg@chru-strasbourg.fr

27

28 **Keywords**

29 Rituximab, tocilizumab, rheumatoid arthritis, pharmacokinetics, therapeutic drug
30 monitoring.

31

32 **Highlights**

- 33 • Highly variable concentrations of rituximab and tocilizumab in rheumatoid
34 arthritis patients treated in second-line.
- 35 • No highlighted link between rituximab/tocilizumab concentration and
36 response to treatment at 6 months.

37

38 **Abbreviations**

39 ADA, anti-drug antibodies

40 BMI, body mass index

41 CD20, cluster of differentiation 20

42 COFRAC, comité français d'accréditation

43 CRP, C reactive protein

44 CV, coefficient of variation

45 DAS28 score, disease activity score 28

46 DMARD, disease modifying anti-rheumatic drug

47 ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

48 EULAR, European League Against Rheumatism

49 ESR, erythrocyte sedimentation rate

50 FDA, food and drug administration

51 IgG, immunoglobulin G

52 IQC, internal quality controls

53 IV, intravenously

54 LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

55 LLOQ, lower limit of quantification

56 mAbs, therapeutic monoclonal antibodies

57 MTX, methotrexate

- 58 ROC, rotation or change
- 59 RA, rheumatoid arthritis
- 60 RTX, rituximab
- 61 SIL-RTX, stable isotope-labeled rituximab
- 62 TNF α , tumor necrosis factor α
- 63 TDM, therapeutic drug monitoring
- 64 TCZ, tocilizumab

65 **Abstract**

66 Patients with rheumatoid arthritis (RA) are eligible to treatment with
67 therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) targeting the tumor necrosis factor α
68 (TNF α), but also with others such as rituximab (RTX) and tocilizumab (TCZ). While
69 pharmacokinetic variability and the link between concentration and clinical
70 response of anti-TNF α mAbs were well described in RA patients, little is known
71 about alternatives strategies such as RTX and TCZ. This study aimed at
72 evaluating the variability of RTX and TCZ serum concentrations in RA patients
73 treated in second-line and to evaluate the relationship between RTX/TCZ trough
74 concentrations and the clinical response.

75 Serum trough concentrations of mAbs of RA patients treated with RTX (n =
76 35) or TCZ (n = 46) and included in the Rotation or Change study were determined
77 at week 24, using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method.
78 Clinical response was assessed at week 24 by the variation of the disease activity
79 score in 28 joints-erythrocyte sedimentation rate between baseline (Δ DAS28-ESR)
80 and according to the European League Against Rheumatism (EULAR)
81 recommendations.

82 RTX and TCZ trough concentrations were highly variable, with coefficient of
83 variation of 171.3% for RTX (median [10th-90th percentiles] : < 0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [$< 0.1 -$
84 5.1]) and 132.6% for TCZ (median [10th-90th percentiles]: 5.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [$< 0.1-27.8$]).
85 Univariate analysis did not identify any determinant of these variabilities, except
86 cotreatment with methotrexate which was associated with reduced RTX
87 concentrations ($p = 0.03$). Response to treatment was not related to RTX and TCZ
88 trough concentration.

89 RTX and TCZ trough concentrations at 24 weeks were highly variable in RA
90 patients treated in second-line, which may have masked any relationship between
91 RTX/TCZ concentration and clinical response in our study.

92

A. Introduction

93 Rheumatoid arthritis (RA), the most frequent chronic inflammatory joint
94 disease, affects 0.5-1% of the population in the industrialized world (1). It is
95 characterized by joint pain, stiffness, and swelling due to synovial inflammation
96 and effusion leading to cartilage and bone damage (2). Treatment of RA has
97 greatly improved over the last two decades with the marketing of therapeutic
98 monoclonal antibodies (mAbs), especially those targeting the tumor necrosis factor
99 α (TNF α) such as infliximab, adalimumab or golimumab (3,4). Anti-TNF α agents
100 are thus now proposed to patients with inadequate response to conventional
101 disease-modifying antirheumatics drugs (cDMARD), i.e. methotrexate,
102 sulfasalazine, leflunomide, azathioprine, etc. (4,5). However, until one-third of
103 patients with RA experiences failure with anti-TNF α treatment (6), leading to the
104 evaluation of therapeutic alternatives such as rituximab (RTX) and tocilizumab
105 (TCZ) (7–9). RTX, a chimeric monoclonal antibody targeting cluster of
106 differentiation 20 at the surface of B lymphocyte (10), was approved in 2006 for
107 severe RA patients who did not respond to prior DMARD and who failed to
108 treatment with an anti-TNF α agent (4,8,11). TCZ (12) is the first humanized anti-IL-
109 6 receptor subunit alpha monoclonal antibody approved in 2009 in the same
110 indication (4,8,13).

111 Pharmacokinetic of mAbs approved in RA is highly variable (3,14), with for
112 example standard deviations of serum mAbs concentrations reaching until 97%
113 (14). Several covariates like the presence of anti-drug antibodies (ADA) (15),
114 antigenic burden and body mass index (BMI) (16) contributed to explain this
115 variability, especially for anti-TNF α mAbs. In addition, the relation between trough
116 concentration and clinical response is now well established in patients with RA

117 treated by anti-TNF α agents (3,17,18). However, less data are available for non-
118 TNF α -targeted mAbs. Some authors have reported highly variable TCZ trough
119 concentrations in RA patients (19,20) and a link between TCZ exposure and
120 biological and/or clinical response (19–21). Highly variable RTX concentrations
121 have also been reported (15). However, the exposure–response relationship was
122 not evident, since some studies have reported a link between RTX concentrations
123 and the disease activity (22), while others not (15,23).

124 All these studies used immunoassays to quantify RTX or TCZ in serum of RA
125 patients, while analytical limitations of these methods in terms of lack of specificity
126 and variability between different kits are well described (24–26) To overcome this
127 limitation, highly-specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry
128 (LC-MS/MS) methods has been recently developed to quantify mAbs in human
129 samples (27–29).

130 To further evaluate the pharmacokinetic variability of RTX and TCZ, we
131 measured RTX/TCZ trough serum concentrations in serum samples of RA patients
132 in second-line mAb treatment, using a LC-MS/MS method adapted from our
133 previously published method (27,29). Secondly, the relationship between both
134 RTX/TCZ trough concentrations and the clinical response was investigated.

135

B. Material and methods

136

a. Patient cohort

137

i. Study design

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

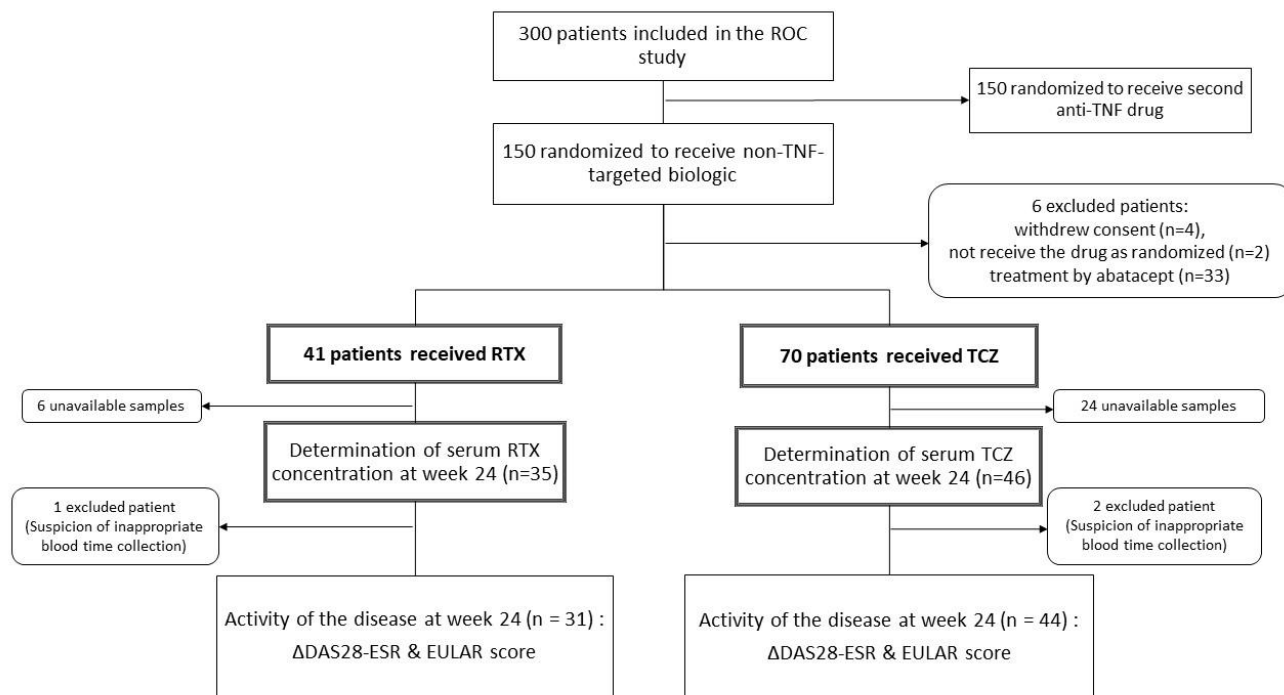
149

150

151

152

This work is an ancillary study of the ROC (Rotation Or Change) trial (6,30) in which 300 patients were randomly assigned in a 1:1 ratio to receive a non-TNF α -target biologic or a second anti-TNF α agent from December 2009 to August 2012 (6). This 52-week multicenter, pragmatic, randomized, controlled, open-label study assessed the efficacy at 24 weeks of 2 treatment strategies: switch for a second anti-TNF α treatment versus non-anti-TNF α biotherapy (RTX, TCZ or abatacept) in RA patients insufficiently improved by a first anti-TNF α drug. Adults previously included in the ROC study (6,30) and treated by RTX (1 g intravenously (IV) and another two weeks later) or TCZ (8 mg/kg monthly, IV) were eligible (See flow chart in Figure 1). Patients who withdrew the consent during the study or not receive the drug as randomized, as well as patients for whom sera were unavailable were excluded. Serum samples handled at week 24 (just before drug infusion for TCZ) were used to quantify TCZ (n = 46) or RTX (n = 35) in the laboratory of Pharmacology, Pharmacogenetics and Toxicology of the Grenoble-Alps University Hospital.



153

154 *Figure 1. Flow-chart of the study.*

155 *n: number of samples; EULAR: European League Against Rheumatism; ΔDAS28-*

156 *ESR : variability of disease score activity - erythrocyte sedimentation rate; RTX:*

157 *rituximab; TCZ: tocilizumab*

158

ii. Ethics

159

The study was conducted according to the current regulation of the

160

International Conference on Harmonization guidelines and the principles of the

161

Declaration of Helsinki. All patients gave written informed consent for the ROC

162

study (Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2009/4507,

163

N° EUDRACT: 2009-013482-26). The ROC study was approved by ethic

164

committee and this ancillary study was approved by the institutional review board

165

of the Délégation de la Recherche Clinique et à l'Innovation of the Grenoble Alps

166

University Hospital (Réf INDS : MR 1415090919).

167

b. Evaluation of treatment efficacy

168 The disease activity was evaluated at weeks 0 and 24 by the disease activity
169 score in 28 joints-erythrocyte sedimentation rate (DAS28-ESR). This composite
170 score ranges from 0-9.3 and takes into account the number of tender joints [range,
171 0-28], number of swollen joints [range, 0.28], patient global assessment of disease
172 activity [numeric analog scale range, 0-10, with 0 representing the best and 10 the
173 worst], and the ESR (8). The clinical response was evaluated according to the
174 European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations. A good
175 EULAR response is defined as a decrease in the DAS28-ESR more than 1.2
176 points with a score of 3.2 or less. A moderate EULAR response is defined as a
177 decrease in DAS28-ESR more than 0.6 points with a score of 5.1 or lower (6,8).

178

c. Rituximab and tocilizumab quantification by liquid- chromatography-tandem mass spectrometry

179

180 Serum RTX or TCZ concentrations were determined by LC-MS/MS using a
181 method adapted from our previously described one (27,29). Briefly, after protein-G
182 purification and trypsin digestion, a two-dimensional liquid chromatography and
183 mass-spectrometry method (27,29) was used. RTX quantification was improved by
184 the integration of a new internal standard, namely the standard isotope-labelled-
185 RTX (SIL-RTX) as internal standard (supplementary Table 1), while
186 SIL-adalimumab was used as internal standard for TCZ (27,29). Analyte peak
187 areas were integrated using Analyst software (version 1.6.3). The method was
188 validated according to the food and drug administration (FDA) guidelines (17) for
189 industrial bioanalytical method validation. Calibration curves were ranging from 1.0
190 to 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and internal quality controls (IQC) were set up at 5.6, 45.0 and

191 150.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for both mAbs. Within-day and between-day imprecision and
192 accuracy for RTX quantification are presented for the three IQCs in the
193 supplemental data Table 2. All calculated concentrations were within the
194 acceptance limits ($< 15\%$ for precision and within $\pm 15\%$ of the nominal value for
195 accuracy, except for the lower limit of quantification for which $< 20\%$ were
196 accepted).

197 Ratios of peptides peak areas and SIL peptide peak areas (y-axis) were plotted
198 against the ratios of mAb and the corresponding SIL concentrations (x-axis), and
199 calibration curve were calculated for a $1/x$ -weighted least squares linear
200 regression, with a coefficient of determination (r^2) greater than 0.99 for RTX and
201 TCZ. The lower limit of quantification for RTX and TCZ were $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (RTX:
202 bias = -8.6% ; CV = 12.4% ; $n = 6$ – TCZ: bias = -8% ; CV = 14.2% ; $n = 6$). The
203 upper limit of quantification was $200.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for both analytes
204 (RTX: bias = -0.8% ; CV = 2.3% – TCZ: bias = -2.4% ; CV = 2.5% ; $n = 6$). These
205 limits complied with FDA and COFRAC guidelines (31). The percentage of
206 contamination were -0.07% for RTX and 0.01% for TCZ ($n = 3$). These low
207 contamination rates excluded any inter-sample contamination. Storage tests were
208 also performed and peptides were stable in injection vials at 4°C during 96 hours
209 (relative bias were under 15%).

210 **d. Statistical analysis**

211 Continuous variables are described with median [10^{th} percentile – 90^{th}
212 percentile] and categorical variables with numbers (percentage). Non parametric
213 tests were used. Relationships between TCZ or RTX trough concentration and
214 others variables were investigated by Spearman's correlation for continuous

215 variables such as body mass index and Man-Whitney/Kruskal-Wallis tests for
216 categorical variables, such as EULAR response. A p value of 0.05 was considered
217 as significant. Statistical tests were performed with Medcalc 12.5 (MedCalc
218 Software, Ostende, Belgium).

219 **C. Results**

220 **a. Baseline characteristics of patients**

221 Clinical and biological patient's characteristics are presented in Table 1.
222 Three sera with very high TCZ (n = 2 at 274 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 203 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) or RTX (n =
223 1 at 157 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) concentrations suggesting an inappropriate blood time collection
224 were also excluded (See flow chart in Figure 1). More than 80% of patients
225 presented rheumatoid factor, anti-citrullinated protein (anti-CCP) antibodies at
226 baseline. The baseline disease activity, represented by the DAS28-ESR was
227 upper than 3.2 for both groups of patients treated by RTX or TCZ.

Characteristics		Rituximab n = 34	Tocilizumab n = 44
Demographic & biological parameters			
Women		27 (79.4)	35 (79.5)
Age, y		69.0 [49.9 – 84.1]	63.5 (47.9-77.2)
Rheumatoid factor positive**		28 (84.8)	35 (79.5)
Anti-CCP positive**		27 (81.8)	37 (84.1)
Body Mass Index**, kg/m ²		23.0 [19.2 – 31.7]	25.8 [19.7-36.5] *
Weight**, kg		57.5 [50.0 – 82.1]	68.0 [46.8 – 103.2] *
ESR**, mm		27.0 [4.6 – 92.0] *	31.5 [7.9 – 69.9]
CRP**, mg.L ⁻¹		5.0 [1.0 – 63.1]	10.0 [3.0 – 77.4] *
Concomitant treatment with a DMARD		24 (70.6)	33 (75.0)
	<i>Methotrexate</i>	20 (58.8)	27 (61.4)
Concomitant treatment with corticosteroids		16 (47.1)	21 (47.7)
RTX/TCZ dosing, mg		1000 [500 – 1000]	540 [400 – 800]
Interval between perfusion, week		-	4.0 [2.0 – 4.0]
mAb concentration, µg.mL ⁻¹		<1.0 [<1.0– 5.1]	5.4 [<1.0 – 27.8]
Activity of the disease			
DAS28-ESR	W 0	5.0 [3.6 – 7.0] *	5.2 [4.0 – 7.3]
	W 24	4.0 [2.5 – 6.1]	3.2 [1.4 – 5.6]
EULAR response W 24	<i>Good response</i>	8 (25.8) *	25 (56.8)
	<i>Moderate response</i>	10 (32.3) *	14 (31.8)
	<i>No response</i>	13 (41.9) *	5 (11.4)

CCP, anti-citrullinated protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C reactive protein; DMARD, Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug; RTX, rituximab; TCZ, tocilizumab; mAb, monoclonal antibody; DAS28, disease activity score; EULAR, european league against rheumatism; W, week.

Data are presented as number (%) or median [10th-90th percentiles].* Numbers could vary due to missing data. ** at the moment of inclusion

228 Table 1. Clinical and biological characteristics of patients

229

b. Response to RTX

230

i. RTX trough concentration

231

RTX trough concentrations were ranged from $< 1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $13.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$

232

and the coefficient of variation (CV) was 171.3% (Figure 2a), including 17 under

233

34 samples with a concentration under the limit of quantification. The median [10th-

234

90th percentiles] was $< 1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [< 1.0 – 5.1]. Univariate analysis of RTX trough

235

concentrations did not show any association with age, sex, weight and BMI

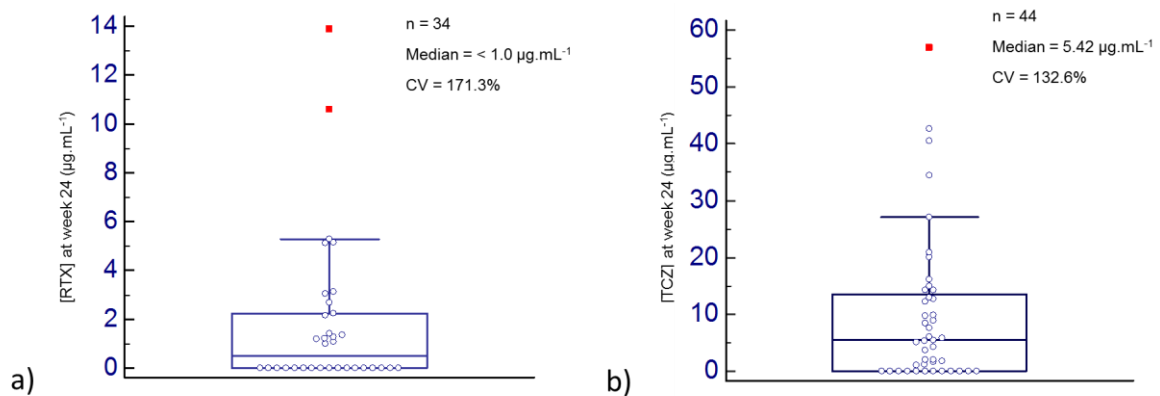
236

(Table 2). Methotrexate cotreatment was associated with significantly lower RTX

237

concentrations (See Table 2 and Figure 3a).

238



239

Figure 2. Variability of rituximab (RTX) (2a) and tocilizumab (TCZ) (2b) trough

240

concentration measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry 24

241

weeks after the first injection. (Box plot represent the median and 25th-75th

242

percentiles; whiskers represents the 10th-90th percentiles; blue circles represents

243

concentrations which are in the 95% confidence interval and red squares

244

concentrations which are outside).

Variables	RTX concentration p value	TCZ concentration p value
Demographic		
Age	0.066	0.942
Sex	0.909	0.109
Weight	0.247	0.967
Body mass index	0.390	0.595
Biologic		
Rheumatoid factor	0.331	0.468
Anti-CCP antibodies	0.519	0.915
Cotreatment		
With methotrexate	0.030	0.706
With corticosteroids	0.417	0.776
Disease activity		
Δ DAS28-ESR	0.958	0.077
EULAR response at W 24	0.601	0.366

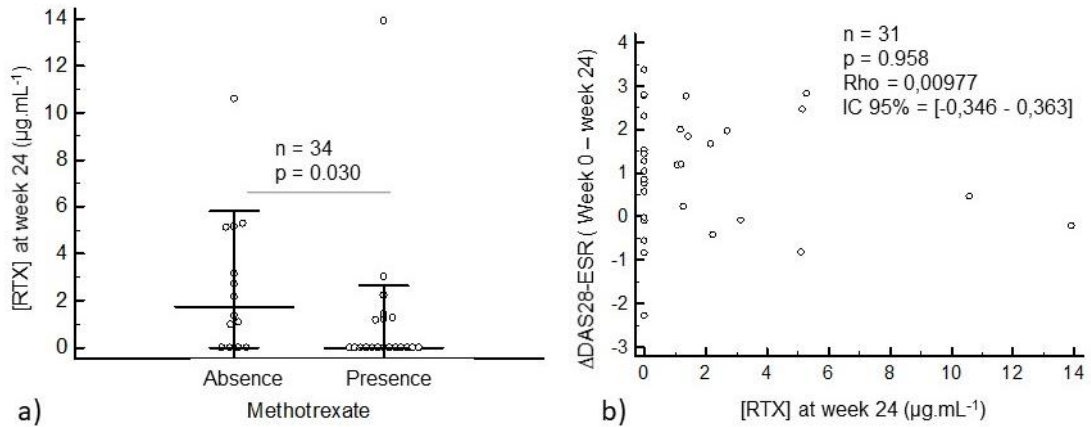
CCP, anti-citrullinated protein; DAS28, disease activity score; EULAR, european league against rheumatism; RTX, rituximab; TCZ, tocilizumab; W, week.
Bold numbers indicates statistical significance

245 Table 2. Link between rituximab (RTX) or tocilizumab (TCZ) trough concentrations
246 and demographic and biological parameters.

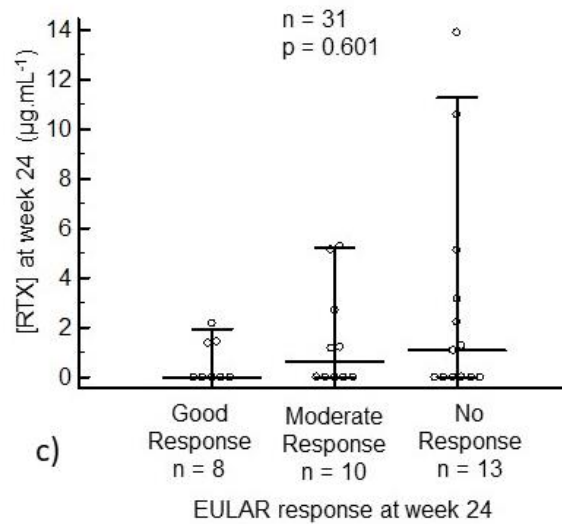
247 ii. RTX trough concentration and disease activity

248 Sixteen patients (51.6%) did not achieve a Δ DAS28-ESR > 1.2, which is
249 considered as a clinical significant change. Nine of these 16 patients (56.2%) had
250 a RTX concentration < 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Among the fifteen patients with Δ DAS28-ESR
251 > 1.2, seven (46.7%) had undetectable RTX concentration. Frequency of
252 undetectable RTX concentration was not different between patients with Δ DAS28-
253 ESR < or > 1.2 (56.2% vs 46.7%, $p = 0.594$). RTX concentration was not related to

254 the variation of the disease activity (Δ DAS28-ESR) between week 0 and week 24
 255 (See Figure 3b).



256



257

258 *Figure 3. Link between rituximab (RTX) concentrations and methotrexate*
 259 *cotreatment and clinical response*

260 *a) Impact of methotrexate cotreatment on RTX concentrations*

261 *b) Link between RTX trough concentration and Δ DAS28-ESR at week 24*

262 *c) Link between RTX trough concentration and the EULAR response*

263 *at week 24*

264 Considering the EULAR response at 24 weeks, 41.9% had no response,
265 while 25.8 and 32.3% of patients presented a good or moderate EULAR response,
266 respectively (Table 1). However, RTX concentration was not different according to
267 the EULAR response at week 24 (Figure 3c). Similar finding were obtained when
268 patients with no response or moderate response were grouped (data not shown).

269 CV of RTX concentrations were 156.5%, 136.6% and 143.4% in patients with
270 no response, moderate and good response, respectively ($p = 0.291$).

271 **c. Response to TCZ**

272 i. TCZ trough concentration

273 TCZ trough concentration ranged from $< 1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $56.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ with a
274 median [10th-90th percentiles] of $5.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [< 1.0 – 27.8] and a CV of 132.6%
275 (Figure 2b). Univariate analysis did not find any association between TCZ trough
276 concentration and demographic and biological parameters (Table 2).

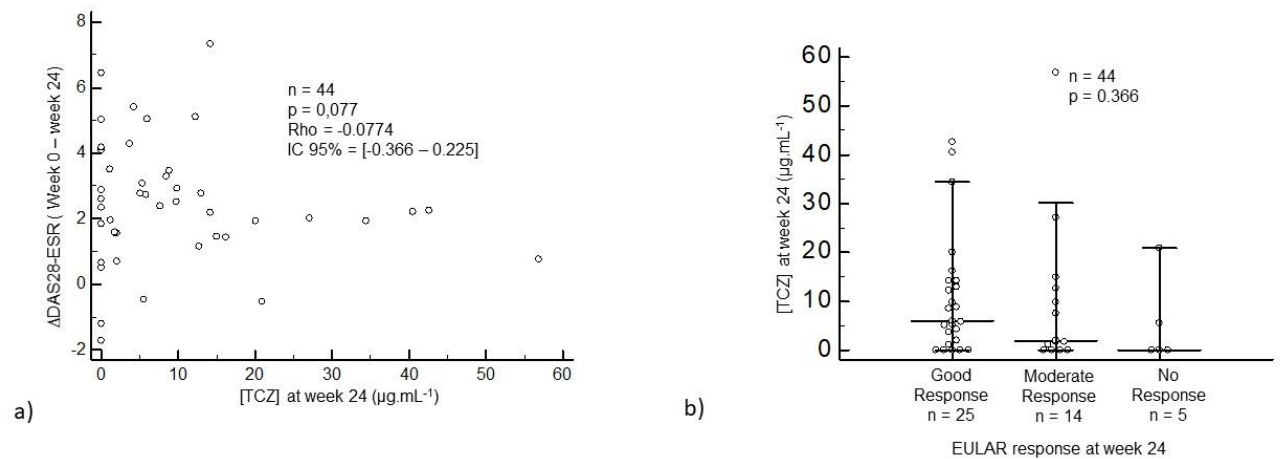
277 ii. TCZ trough concentration and disease activity

278 Nine patients (20.4%) did not achieve a $\Delta\text{DAS28-ESR} > 1.2$, which is
279 considered to be a clinical significant change. Four of these 9 patients (44.4%) had
280 TCZ concentration $< 1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Among the 35 patients with $\Delta\text{DAS28-ESR} > 1.2$,
281 eight had undetectable TCZ concentration (22.8%). Frequency of undetectable
282 TCZ concentration was not different between patients with $\Delta\text{DAS28-ESR} < \text{or} >$
283 1.2 (44.4% vs 22.8%, $p = 0.227$). TCZ concentration was not related to the
284 variation of the disease activity ($\Delta\text{DAS28-ESR}$) between week 0 and week 24
285 (Figure 4a).

286 Considering the EULAR response at 24 weeks, 56.8% of patients presented
287 a good response, 31.8% a moderate response and 11.4% had no response

288 (Table 2). However, TCZ concentration was not different according to the EULAR
289 response determined at week 24 (Figure 4b). Similar findings were obtained when
290 patients with no response and moderate were grouped (data not shown).

291 CV of TCZ concentrations were 171.3%, 162.0% and 113.7% in patients with
292 no response, moderate and good response, respectively ($p = 0.703$).



293

294 *Figure 4. Link between tocilizumab (TCZ) concentrations and clinical response*

295 a) *Link between TCZ trough concentration and Δ DAS28-ESR at week 24*

296 b) *Link between TCZ trough concentration and the EULAR response at*
297 *week 24*

298 **D. Discussion**

299 This retrospective study reported highly variable serum trough concentrations
300 of RTX and TCZ measured by LC-MS/MS in patients with RA treated in second-
301 line therapy. Such finding is congruent with highly variable pharmacokinetics of
302 mAbs targeting TNF α (14,17,22) and also with studies focusing either on TCZ
303 (19,20) or RTX (15,32,33) in RA patients. The pharmacokinetic variability of mAbs
304 are explained by numerous factors such as the antigenic burden, the presence of

305 ADA, various BMI (20) or also comedication (33). Here, we did not identify any
306 association between TCZ trough concentration and age, sex, BMI, presence of
307 rheumatoid factor or anti-CCP antibodies, comedication, which is consistent with
308 previous studies (34,35). Concerning RTX, the unique identified determinant of its
309 trough concentration was cotreatment by methotrexate, which is associated with
310 significantly lower RTX trough concentration. This is consistent with a previous
311 study (33) conducted in RA patients, but in contrast with others that did not find
312 any association between methotrexate cotreatment and pharmacokinetic
313 parameters of RTX (trough concentration, area under the curve, half-life,
314 clearance) (15,23). These discrepancies could be explained by different
315 frequencies of patients treated by methotrexate according to studies and underline
316 the need of additional studies to confirm or not the impact of methotrexate on RTX
317 exposure.

318 The secondary objective of this study was the evaluation of the relationship
319 concentration-clinical efficacy of RTX and TCZ considering both the Δ DAS28-ESR
320 and the EULAR responses. The clinical response was not associated with RTX
321 trough concentrations, as previously founded in patients with RA (15,23,32,33) or
322 antibody associated vasculitis (36). Conversely, Mazilu et al. (22) showed that RA
323 patients retreated with RTX after a first relapse with detectable RTX trough
324 concentration exhibited a better clinical response than patients with undetectable
325 RTX concentrations. Contrary to what we show, this study and others conducted in
326 patients with primary membranous nephropathy (37,38) suggest thus that a link
327 concentration-efficacy does exist for RTX.

328 Concerning TCZ, we did not find any association between TCZ trough
329 concentration and clinical response evaluated at week 24. This finding agree with

330 the study of Sigaux et al. (35), but disagree with several other studies (19–21,39).
331 Arad et al. demonstrated, for example, an association between TCZ
332 concentrations and clinical response (assessed by the evolution of the Clinical
333 Disease Activity Index score between week 1 and 12) which remained significant
334 after adjustment on several potential confounding factors (BMI, sex, methotrexate,
335 seropositivity for anti-CCP antibodies or rheumatoid factor, CRP and baseline
336 score). These conflicting results for both RTX and TCZ could be related to
337 differences between studies in terms of study population (baseline activity disease
338 and previous treatments by DMARD and mAbs), various times of mAb
339 quantification (at week 24 in our study versus at week 12 in others) (19,20,35) and
340 also the order of magnitude of TCZ/RTX concentrations. Here, the median TCZ
341 concentration was $5.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, while TCZ concentrations reported in others
342 studies were largely higher ranging from $10.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (19) to $41.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (20).
343 Such differences could be related to different dosing schedules (taking into
344 account the weight (here and (19)) or not (20) for TCZ), but also to various
345 analytical methods used to quantify mAbs. Here, we used an highly specific LC-
346 MS/MS method, adapted from our previously published method (27,29), while
347 others studies used various ELISA methods (19,20,35,39) whose analytical limits
348 were well described (25,28,40,41). Mazilu et al. used, for example, the
349 Promonitor[®] assay for which an important bias was found compared to our LC-
350 MS/MS method (mean underestimation of 69% RTX concentration) or the Lisa-
351 tracker[®] kit (29). Besides, the frequency of undetectable concentration was high
352 for both TCZ (27.3% in this study) and RTX (50% in this study and 36% in Mazilu
353 et al. (22)), which may have compromised chances of highlighting any association
354 between mAb concentration and clinical response. Hence, additional studies are

355 needed to investigate the relationship concentration-effect on samples handled
356 earlier after the injection (15), especially in patients with no or moderate response
357 for which variability of mAb concentration seems particularly high.

358 We acknowledge that the limited sample size is a limitation of our study.
359 Moreover, the presence of ADA was not investigated while ADA may impact mAbs
360 clearance and clinical response, notably for RTX (42). However, frequency of ADA
361 for both TCZ and RTX seems relatively low (15,35) compared to others mAbs, so
362 it is unlikely that presence/absence of ADA could compromise our results.

363 **E. Conclusion**

364 In conclusion, this study demonstrated that RTX and TCZ serum trough
365 concentrations measured by LC-MS/MS at 24 weeks are highly variable in RA
366 patients treated in second-line. Except the cotreatment by methotrexate which is
367 associated with reduced RTX concentrations, no factors were identified as
368 involved in these variability. Finally, TCZ and RTX concentrations were not
369 associated with clinical response, but further studies performed in larger cohorts
370 with samples handled earlier could be useful to confirm this finding.

371

372 **Acknowledgements**

373 The authors thank Karine Scalabrino for her excellent technical assistance.

374 **Conflict of interest**

375 The authors report no conflicts of interest related to this work.

376 **References**

- 377 1. van der Woude D, van der Helm-van Mil AHM. Update on the epidemiology,
378 risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. *Best Practice &*
379 *Research Clinical Rheumatology*. 2018 Apr 1;32(2):174–87.
- 380 2. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2010 Sep
381 25;376(9746):1094–108.
- 382 3. Medina F, Plasencia C, Goupille P, Ternant D, Balsa A, Mulleman D. Current
383 Practice for Therapeutic Drug Monitoring of Biopharmaceuticals in
384 Rheumatoid Arthritis. *Ther Drug Monit*. 2017;39(4):364–9.
- 385 4. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for
386 treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007 Dec 1;370(9602):1861–74.
- 387 5. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis.
388 *Lancet*. 2017 10;389(10086):2338–48.
- 389 6. Gottenberg J-E, Brocq O, Perdriger A, Lassoued S, Berthelot J-M, Wendling
390 D, et al. Non-TNF-Targeted Biologic vs a Second Anti-TNF Drug to Treat
391 Rheumatoid Arthritis in Patients With Insufficient Response to a First Anti-
392 TNF Drug: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Sep 20;316(11):1172–
393 80.
- 394 7. Biggioggero M, Crotti C, Becciolini A, Favalli EG. Tocilizumab in the treatment
395 of rheumatoid arthritis: an evidence-based review and patient selection. *Drug*
396 *Des Devel Ther*. 2018 Dec 19;13:57–70.
- 397 8. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K,
398 Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of
399 rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying
400 antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jun;76(6):960–77.
- 401 9. Selmi C, Kon E, De Santis M, Favalli EG, Cimaz R, Generali E, et al. How
402 advances in personalized medicine will change rheumatology. *Per Med*.
403 2018;15(2):75–8.
- 404 10. European Medicines Agency. Summary of product characteristics : rituximab.
405 1998.
- 406 11. Cohen MD, Keystone E. Rituximab for Rheumatoid Arthritis. *Rheumatol Ther*.
407 2015 Dec 1;2(2):99–111.
- 408 12. European Medicines Agency. Summary of product characteristics :
409 tocilizumab. 2015.
- 410 13. Scott LJ. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*. 2017
411 Nov;77(17):1865–79.

- 412 14. Ternant D, Bejan-Angoulvant T, Passot C, Mulleman D, Paintaud G. Clinical
413 Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies
414 Approved to Treat Rheumatoid Arthritis. *Clin Pharmacokinet.* 2015
415 Nov;54(11):1107–23.
- 416 15. Thurlings RM, Teng O, Vos K, Gerlag DM, Aarden L, Stapel SO, et al. Clinical
417 response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric
418 antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients
419 with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2009 Jul
420 12;69(2):409–12.
- 421 16. Iannone F, Lopalco G, Rigante D, Orlando I, Cantarini L, Lapadula G. Impact
422 of obesity on the clinical outcome of rheumatologic patients in biotherapy.
423 *Autoimmun Rev.* 2016 May;15(5):447–50.
- 424 17. Mulleman D, Méric J-C, Paintaud G, Ducourau E, Magdelaine-Beuzelin C,
425 Valat J-P, et al. Infliximab concentration monitoring improves the control of
426 disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(6):R178.
- 427 18. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden
428 L, et al. Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab
429 antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis.
430 *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2007 Jul 1;66(7):921–6.
- 431 19. Kneepkens EL, van den Oever I, Plasencia CH, Pascual-Salcedo D, de Vries
432 A, Hart M, et al. Serum tocilizumab trough concentration can be used to
433 monitor systemic IL-6 receptor blockade in patients with rheumatoid arthritis:
434 a prospective observational cohort study. *Scand J Rheumatol.* 2017
435 Mar;46(2):87–94.
- 436 20. Arad U, Elkayam O. Association of Serum Tocilizumab Trough
437 Concentrations with Clinical Disease Activity Index Scores in Adult Patients
438 with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 2019 Dec;46(12):1577–81.
- 439 21. Levi M, Grange S, Frey N. Exposure-Exposure Relationship of Tocilizumab,
440 an Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody, in a Large Population of Patients
441 With Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Clinical Pharmacology.*
442 2013;53(2):151–9.
- 443 22. Mazilu D, Opreș D, Gainaru C, Iliuta M, Apetrei N, Luca G, et al. Monitoring
444 drug and antidrug levels: a rational approach in rheumatoid arthritis patients
445 treated with biologic agents who experience inadequate response while being
446 on a stable biologic treatment. *Biomed Res Int.* 2014;2014:702701.
- 447 23. Breedveld F, Agarwal S, Yin M, Ren S, Li NF, Shaw TM, et al. Rituximab
448 pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not
449 correlate with clinical response. *J Clin Pharmacol.* 2007 Sep;47(9):1119–28.
- 450 24. Bertin D, Serrero M, Grimaud JC, Desjeux A, Desplat-Jégo S. Monitoring of
451 infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel
452 diseases: A comparison of three commercially available ELISA kits. *Cytokine.*
453 2020 Feb 1;126:154859.

- 454 25. Steenholdt C, Ainsworth MA, Tovey M, Klausen TW, Thomsen OO, Brynskov
455 J, et al. Comparison of techniques for monitoring infliximab and antibodies
456 against infliximab in Crohn's disease. *Ther Drug Monit.* 2013 Aug;35(4):530–
457 8.
- 458 26. Dreesen E, Bossuyt P, Mulleman D, Gils A, Pascual-Salcedo D. Practical
459 recommendations for the use of therapeutic drug monitoring of
460 biopharmaceuticals in inflammatory diseases. *Clinical Pharmacology :*
461 *Advances and Applications.* 2017;9:101–11.
- 462 27. Willeman T, Jourdil J-F, Gautier-Veyret E, Bonaz B, Stanke-Labesque F. A
463 multiplex liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the
464 quantification of seven therapeutic monoclonal antibodies: Application for
465 adalimumab therapeutic drug monitoring in patients with Crohn's disease.
466 *Anal Chim Acta.* 2019 Aug 27;1067:63–70.
- 467 28. Mills JR, Cornec D, Dasari S, Ladwig PM, Hummel AM, Cheu M, et al. Using
468 Mass Spectrometry to Quantify Rituximab and Perform Individualized
469 Immunoglobulin Phenotyping in ANCA-Associated Vasculitis. *Anal Chem.*
470 2016 Jun 21;88(12):6317–25.
- 471 29. Truffot A, Jourdil J-F, Seitz-Polski B, Malvezzi P, Brglez V, Stanke F, et al.
472 Simultaneous quantification of rituximab and eculizumab in human plasma by
473 liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with
474 rituximab ELISA kits. Submitted. 2020 Jun;
- 475 30. Prof. Jacques-Eric GOTTENBERG. ROC "Biotherapy rotation or change after
476 first anti-TFN treatment failure for rheumatoid arthritis" - Clinical trial. 2009.
- 477 31. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation - Guidance for
478 Industry. 2018.
- 479 32. Díaz-Torné C, Ortiz MÀ, Sarmiento M, Díaz-López C, Corominas H,
480 Casademont J, et al. Rituximab levels are associated with the B cell
481 homeostasis but not with the clinical response in patients with rheumatoid
482 arthritis. *Eur J Rheumatol.* 2019;6(2):81–4.
- 483 33. Boumans M, Teng O, Thurlings R, Bijlsma J, Gerlag D, Huizinga T, et al.
484 Progression of structural damage is not related to rituximab serum levels in
485 rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford).* 2013 Aug;52(8):1462–
486 6.
- 487 34. Abdallah H, Hsu JC, Lu P, Fettner S, Zhang X, Douglass W, et al.
488 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis of Subcutaneous
489 Tocilizumab in Patients With Rheumatoid Arthritis From 2 Randomized,
490 Controlled Trials: SUMMACTA and BREVACTA. *J Clin Pharmacol.*
491 2017;57(4):459–68.
- 492 35. Sigaux J, Hamze M, Daien C, Morel J, Krzysiek R, Pallardy M, et al.
493 Immunogenicity of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone*
494 *Spine.* 2017 Jan;84(1):39–45.

- 495 36. Cornec D, Kabat BF, Mills JR, Cheu M, Hummel AM, Schroeder DR, et al.
496 Pharmacokinetics of rituximab and clinical outcomes in patients with anti-
497 neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis. *Rheumatology*
498 (Oxford). 2018 Apr 1;57(4):639–50.
- 499 37. Boyer-Suavet S, Andreani M, Cremoni M, Brglez V, Benzaken S, Bernard G,
500 et al. Rituximab bioavailability in primary membranous nephropathy. *Nephrol*
501 *Dial Transplant*. 2019 Aug 1;34(8):1423–5.
- 502 38. Seitz-Polski B, Dahan K, Debiec H, Rousseau A, Andreani M, Zaghrini C, et
503 al. High-Dose Rituximab and Early Remission in PLA2R1-Related
504 Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019 Aug 7;14(8):1173–
505 82.
- 506 39. Benucci M, Meacci F, Grossi V, Infantino M, Manfredi M, Bellio E, et al.
507 Correlations between immunogenicity, drug levels, and disease activity in an
508 Italian cohort of rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab.
509 *Biologics*. 2016;10:53–8.
- 510 40. Jourdil J-F, Lebert D, Gautier-Veyret E, Lemaitre F, Bonaz B, Picard G, et al.
511 Infliximab quantitation in human plasma by liquid chromatography-tandem
512 mass spectrometry: towards a standardization of the methods? *Anal Bioanal*
513 *Chem*. 2017 Feb;409(5):1195–205.
- 514 41. Schmitz EMH, van de Kerkhof D, Hamann D, van Dongen JLJ, Kuijper PHM,
515 Brunsveld L, et al. Therapeutic drug monitoring of infliximab: performance
516 evaluation of three commercial ELISA kits. *Clin Chem Lab Med*. 2016 Jul
517 1;54(7):1211–9.
- 518 42. Derksen VFAM, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies
519 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*.
520 2017;39(4):437–46.

521 **Supplemental Table 4.** Mass spectrometry settings and prototypic peptides: Position of the peptide in the antibody (H: heavy
 522 chain, L: light chain), MRM transitions, voltage setting declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE),
 523 and collision cell exit potential (CXP) for each analyte. Dwell times were set automatically by the Scheduled MRM mode of the
 524 software. Scheduled MRM detection was set to 30 s and the target scan time fixed at 0.5 s. Underlined ions were used as
 525 quantifiers and the second ions were used for confirmation. The trypsin miss-cleavage is represented in bold.

Analyte	Signature peptide	Position in the antibody	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Rituximab	Q[PGQ]VQLQQPGAELV K PGASVK.+2y6	H-FR1 aa. 1-19	<u>980.5</u>	<u>558.3</u>	75	10	55	15
	Q[PGQ]IVLSQSPAILSASPGEK.+2y11	L-FR1 aa. 1-18	904.5	1069.6	75	10	37	12
SIL-Rituximab	[¹³ C ₆ - ¹⁵ N ₂] Q[PGQ]VQLQQPGAELV K PGASVK.+2y6	H-FR1 aa. 1-19	988.6	566.3	75	10	55	15
Tocilizumab	LLIYYTSR +2y4	L- aa. 46-53	<u>514.8</u>	<u>526.3</u>	100	10	25	11
			514.8	689.3	100	10	25	11
SIL-Adalimumab	[¹³ C ₆ - ¹⁵ N ₂] APYTFGQG T K +2y7	L-CDR3 aa. 94-103	539.3	746.4	100	10	28.3	15

526 Q[PGQ]: N-terminal glutamine cyclized in pyroglutamate = N-terminal pyroglutamine

527 **Supplemental Table 2.** Within- and between-day precision (expressed as coefficients of variation) and accuracy (expressed as
 528 bias) of the LC-MS/MS method used to quantify RTX and TCZ.

Analyte	IQC concentration (µg.mL ⁻¹)	Within-day precision and accuracy (n=6)			Between-day precision and accuracy (n=6)		
		Mean concentration (µg.mL ⁻¹)	CV (%)	Bias (%)	Mean concentration (µg.mL ⁻¹)	CV (%)	Bias (%)
RTX	5.6	6.2	8.9	11.4	5.6	13.5	0.4
	45.0	47.2	5.0	4.9	48.3	6.1	7.3
	150.0	139.3	3.5	-7.1	149.2	8.1	-0.5
TCZ	5.6	6.3	10.8	12.0	5.0	8.1	-10.5
	45.0	38.6	6.9	-14.1	44.9	12.4	-0.1
	150.0	164.7	9.4	9.8	133.2	11.2	-11.2

529 RTX: rituximab, TCZ: tocilizumab, IQC: internal quality control, CV: coefficient of variation.

DISCUSSION

Le dosage de mAbs dans les échantillons humains est à ce jour réalisé le plus souvent via des méthodes ELISA, du fait notamment de leur réalisation relativement simple. Cependant, le manque de spécificité et le temps nécessaire au développement de ces méthodes (73) a poussé de nombreux laboratoires de Pharmacologie à développer des méthodes de dosage alternatives par CL-SM/SM (60,61,68). De nombreuses études ont montré des discordances importantes entre les méthodes CL-SM/SM et ELISA pour la quantification des médicaments, en particulier des mAbs (15,17,32,74). En accord avec ces travaux, nous avons mis en évidence un biais important entre notre méthode CL-SM/SM et le kit ELISA Promonitor[®], avec une sous-estimation moyenne des concentrations en RTX de 69% en ELISA (70). A l'inverse, les concentrations de RTX mesurées par CL-SM/SM étaient comparables à celles obtenues à l'aide du kit Lisa-Tracker[®], soulignant l'hétérogénéité des différentes méthodes ELISA.

Les discordances CL-SM/SM versus ELISA semblent multifactorielles mais pourraient être liées au moins en partie à la présence d'ADA dans les échantillons humains. En effet, ces derniers peuvent influencer de manière différentielle les différentes méthodes de dosages des mAbs par la création de complexes immuns mAbs-ADA et aboutir à des résultats discordants (64,75). En outre, le manque de spécificité des tests ELISA et la liaison de protéines interférentes peuvent aussi être incriminés. Cette variabilité analytique des différentes techniques de dosages des mAbs rappelle l'importance de l'obligation légale de préciser la technique utilisée pour tout examen de biologie médicale, en particulier le dosage de mAb ; et

a pour conséquence la nécessité d'utiliser toujours la même méthode analytique pour un même patient. A l'heure où de nombreux laboratoires développent leur méthode « maison » de dosage des mAbs par CL-SM/SM, des études supplémentaires comparant ces différentes techniques chromatographiques entre elles seraient utiles, afin d'évaluer le caractère potentiellement interchangeable de ces méthodes.

La méthode de dosage multiplex des mAbs par CL-SM/SM qui avait au préalable été développée au sein du laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogénétique et Toxicologie du CHU Grenoble Alpes (20) permettait la quantification de 7 mAbs (RTX, TCZ et adalimumab, infliximab, cetuximab, secukinumab, trastuzumab) sur des gammes de concentrations allant de 1.0 à 100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, excepté pour le RTX pour lequel la limite basse de quantification était de 5.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dans la mesure où une concentration en RTX supérieure à 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a été proposée comme seuil associé à une réponse clinique à long terme au cours de la GEM (21,56), cette limite de quantification du RTX à 5.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ semblait insuffisante pour envisager le STP du RTX dans cette indication. Aussi, l'utilisation d'un peptide comprenant une pyroglutamine en N-terminal (75) et une zone de non-coupe par la trypsine nous a permis d'améliorer la sensibilité de la méthode et de valider une nouvelle limite de quantification du RTX à 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (69) ; permettant ainsi d'envisager l'utilisation en routine clinique de cette méthode pour le STP du RTX. En outre, l'utilisation du RTX isotypiquement marqué comme standard interne (70) a permis de s'affranchir de nombreux problèmes analytiques liés à l'étape de purification de l'échantillon, aux variations de rendement de la trypsine (68), ou encore aux variations d'ionisation du peptide suivi (17).

Cette méthode de dosage des mAbs ainsi améliorée a ensuite été mise à profit d'une étude bioclinique qui a démontré l'importante variabilité des concentrations sériques de RTX et du TCZ dans une cohorte de patients atteints de PR, en seconde ligne de traitement (70). La variabilité pharmacocinétique des mAbs est classiquement expliquée par de multiples facteurs comme la charge antigénique, l'indice de masse corporelle (39), les comédications (76) ou encore la présence d'ADA (64,77). Dans notre étude, aucun de ces facteurs n'a été identifié, excepté le cotraitement par méthotrexate qui était associé à des concentrations en RTX significativement plus basses (70), conformément à l'étude de Boumans M et al. (76). Le second objectif de cette étude était d'évaluer la relation concentration-efficacité clinique pour le RTX et le TCZ, en se basant sur le Δ DAS28-ESR et le score EULAR après 24 semaines de traitement. Aucun lien concentration-effet n'a été montré pour le RTX (70). Ce résultat est en accord avec la majorité des études réalisées dans le domaine de la rhumatologie, que ce soit dans le cadre du traitement de la PR (36,37,76,78) ou des vascularites (79). Seule l'étude de Mazilu et al. (23) a montré que les patients atteints de PR ayant des concentrations en RTX détectables présentaient une meilleure réponse clinique. En ce qui concerne le TCZ, aucune association concentration-réponse clinique n'a été démontrée. Ces résultats sont en accord avec certaines études (80), mais en désaccord avec d'autres (39,54,55,81). Ces discordances peuvent s'expliquer, entre autres, par des populations d'études et moments de prélèvements différents ou encore des techniques analytiques variables entre les études. En outre, la fréquence de concentrations en RTX/TCZ indétectables dans notre étude était élevée (27.3% pour le TCZ et 50% pour le RTX), ce qui a pu compromettre les chances de mettre en évidence un quelconque lien concentration-effet. Ceci s'explique en partie par

une prélèvement tardif après l'introduction du RTX (24 semaines après la première injection) à la différence des autres études où le dosage du RTX était réalisée à 12 semaines (39,55,80).

Au total, ce travail aura permis d'améliorer la méthode de dosage multiplex des mAbs en CL-SM/SM préalablement développée au sein du laboratoire de Pharmacologie du CHU Grenoble Alpes (abaissement de la limite de quantification du RTX, utilisation d'un standard interne spécifique du RTX et intégration de l'ECU) et de souligner les enjeux du choix de la technique analytique utilisée pour la quantification des mAbs (comparaison CL-SM/SM versus ELISA). La méthode CL-SM/SM a ensuite pu être mise en œuvre au cours d'une étude bioclinique, qui a conclu à une forte variabilité des concentrations sériques de RTX et de TCZ chez les patients atteints de PR traités en seconde ligne. A l'exception d'un cotraitement par méthotrexate qui était associé à des concentrations plus faibles en RTX, aucun autre facteur n'était associé à cette variabilité. De plus, les concentrations en RTX ou en TCZ n'étaient pas associées à la réponse clinique, possiblement du fait d'un effectif insuffisant. Des études supplémentaires réalisées sur de plus grandes cohortes et avec des prélèvements réalisés plus précocement après l'injection sont nécessaires.

CONCLUSION

THÈSE SOUTENUE PAR : Aurélie TRUFFOT

TITRE : Suivi thérapeutique pharmacologique des anticorps monoclonaux thérapeutiques : de l'analytique à l'évaluation de la variabilité pharmacocinétique du rituximab et du tocilizumab.

CONCLUSION :

Le développement des anticorps monoclonaux thérapeutiques (mAbs), au cours des vingt dernières années a révolutionné la prise en charge de nombreuses pathologies chroniques. En dépit de ces progrès thérapeutiques, la réponse clinique à de nombreux mAbs est variable et pourrait être reliée à leur importante variabilité pharmacocinétique justifiant l'intérêt du Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP). Si cette variabilité pharmacocinétique a bien été documentée pour les mAbs dirigés contre le TNF α (tumor necrosis factor α), peu de données existent pour d'autres mAbs tels que le rituximab (RTX, anti-CD20) ou le tocilizumab (TCZ, anti-IL6). En outre, l'évaluation de la variabilité pharmacocinétique d'un médicament, tout comme la réalisation de son STP requiert une méthode de dosage sensible et spécifique. La faible spécificité des méthodes d'immunoanalyse de type ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay), encore largement utilisé à ce jour, a conduit au développement de nouvelles méthodes de dosage des mAbs par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM).

L'objectif premier de ce travail était d'améliorer la méthode de dosage des mAbs par CL-SM/SM préalablement développée au sein du Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogénétique et Toxicologie du CHU Grenoble Alpes (CHUGA), permettant de doser simultanément le RTX, le TCZ et l'ECU (éculizumab).

Grâce au suivi d'un nouveau peptide protéotypique du RTX, puis à l'utilisation de RTX isotypiquement marqué comme standard interne, la limite de quantification du RTX a pu être abaissée à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, permettant d'envisager le STP du RTX, y compris chez les patients atteints de glomérulonéphrite extra-membraneuse. Les concentrations en RTX obtenues par notre méthode CL-SM/SM étaient bien corrélées avec celles mesurées par deux kits ELISA (Lisa Tracker[®] et Promonitor[®]), mais un biais a été mis en évidence avec le kit Promonitor[®] (sous-estimation des concentrations de 69% par rapport à la CL-SM/SM).

Le second objectif de ce travail de thèse était d'évaluer la variabilité des concentrations sériques de RTX et de TCZ chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). Les concentrations de RTX et TCZ étaient très variables avec des coefficients de variation respectifs de 171.3% et de 132.6%. Excepté le traitement par méthotrexate qui était associé à des concentrations en RTX diminuées, aucun autre déterminant des concentrations de RTX et TCZ n'a pu être identifié. De plus, la réponse au traitement n'était pas associée aux concentrations en RTX ou en TCZ.

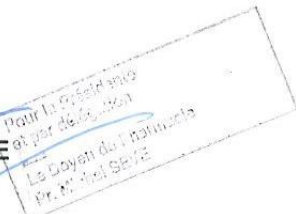
Au final, ce travail a permis d'améliorer la méthode de dosage des mAbs en CL-SM/SM et de confirmer l'importante variabilité pharmacocinétique du RTX et du TCZ dans une cohorte de patients atteints de PR. Si la relation concentration-effet de ces deux mAbs n'a pu être mise en évidence, d'autres études réalisées sur de plus grandes cohortes semblent nécessaires.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 15/09/20

LE DOYEN

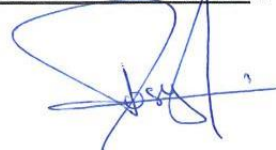
Michel SEVE



LE DIRECTEUR DE THESE :

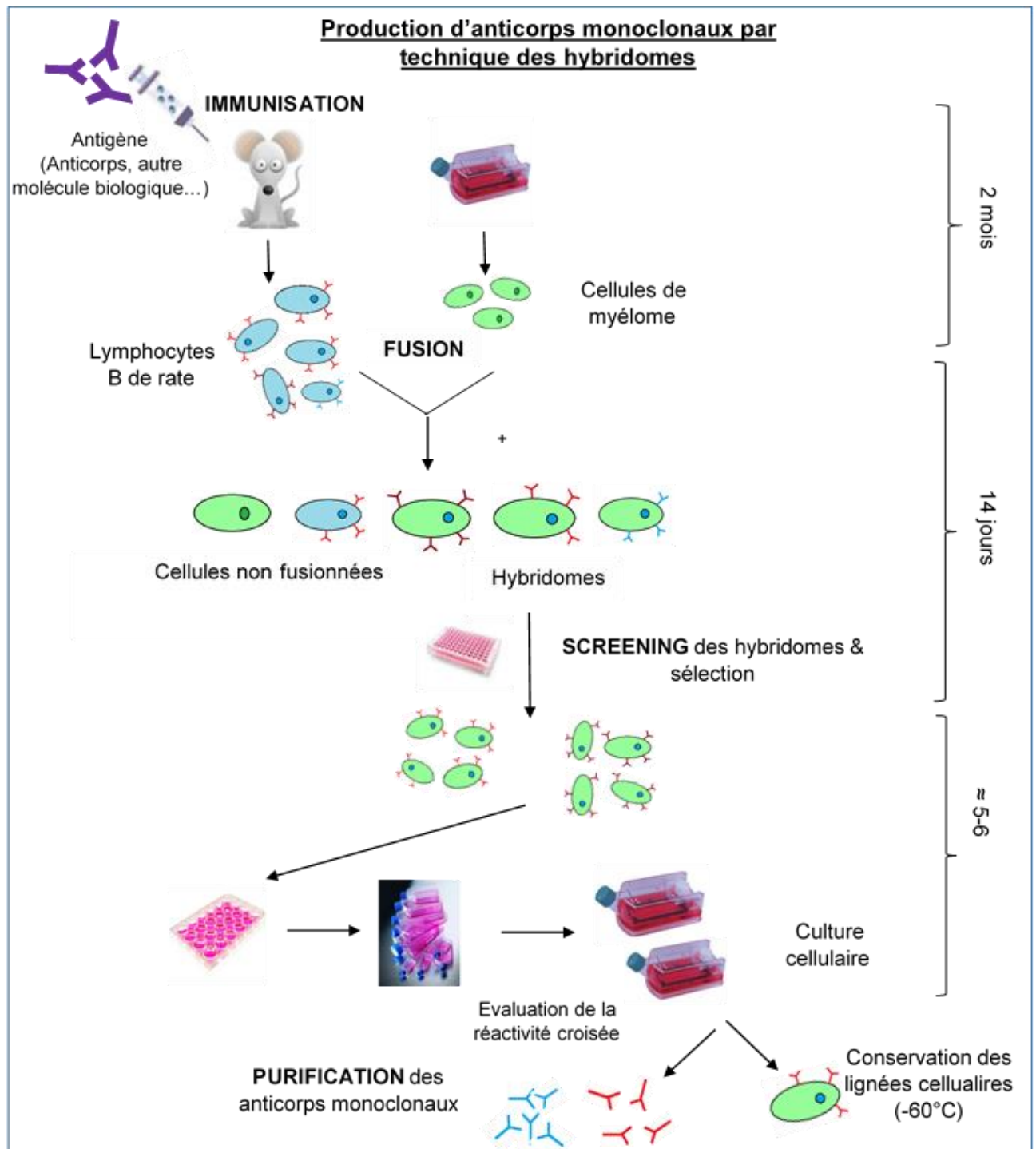


LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :



ANNEXES

Annexe 1 : Principe de production des anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes (28).



BIBLIOGRAPHIE

1. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. *MAbs*. 2019 Dec 26;12(1):1703531.
2. 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. *Journal of Biomedical Science*. 2020 Jan 2;27(1):1.
3. Tsumoto K, Isozaki Y, Yagami H, Tomita M. Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy*. 2019;11(2):119–27.
4. Paintaud G, Lejarre F, Ternant D, Goupille P, Watier H. Les anticorps monoclonaux : une avancée thérapeutique récente et majeure. *Thérapies*. 2009 Jan 1;64(1):1–7.
5. Mould DR, Green B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development. *BioDrugs*. 2010 Feb 1;24(1):23–39.
6. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, Wang B, Schaible T, Kavanaugh A, et al. The relationship of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2002 Jun;46(6):1451–9.
7. Wolbink GJ, Voskuyl AE, Lems WF, de Groot E, Nurmohamed MT, Tak PP, et al. Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005 May;64(5):704–7.
8. Dreesen E, Bossuyt P, Mulleman D, Gils A, Pascual-Salcedo D. Practical recommendations for the use of therapeutic drug monitoring of biopharmaceuticals in inflammatory diseases. *Clin Pharmacol*. 2017 Oct 3;9:101–11.
9. Dreesen E, Gils A. Pharmacodynamic Monitoring of Biological Therapies in Chronic Inflammatory Diseases. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2019 Apr;41(2):131–141.
10. European Medicines Agency. Summary of product characteristics : rituximab. 1998.
11. European Medicines Agency. Summary of product characteristics : tocilizumab. 2015.
12. Widmer N, Csajka C, Grouzmann E. Suivi thérapeutique des médicaments (I) les principes. *Revue Médicale Suisse*. 2008;1644–8.

13. Schmitz EMH, van de Kerkhof D, Hamann D, van Dongen JLJ, Kuijper PHM, Brunsveld L, et al. Therapeutic drug monitoring of infliximab: performance evaluation of three commercial ELISA kits. *Clin Chem Lab Med*. 2016 Jul 1;54(7):1211–9.
14. Van Stappen T, Billiet T, Vande Castele N, Compernelle G, Brouwers E, Vermeire S, et al. An Optimized Anti-infliximab Bridging Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Harmonization of Anti-infliximab Antibody Titers in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Sep;21(9):2172–7.
15. Steenholdt C, Ainsworth MA, Tovey M, Klausen TW, Thomsen OO, Brynskov J, et al. Comparison of techniques for monitoring infliximab and antibodies against infliximab in Crohn's disease. *Ther Drug Monit*. 2013 Aug;35(4):530–8.
16. Lee MWM, Connor S, Ng W, Toong CM-L. Comparison of infliximab drug measurement across three commercially available ELISA kits. *Pathology*. 2016 Oct 1;48(6):608–12.
17. Jourdil J-F, Lebert D, Gautier-Veyret E, Lemaitre F, Bonaz B, Picard G, et al. Infliximab quantitation in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: towards a standardization of the methods? *Anal Bioanal Chem*. 2017 Feb;409(5):1195–205.
18. El Amrani M, Bosman SM, Egas AC, Hack CE, Huitema ADR, van Maarseveen EM. Simultaneous Quantification of Free Adalimumab and Infliximab in Human Plasma Using a Target-Based Sample Purification and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit*. 2019;41(5):640–7.
19. Iwamoto N, Takanashi M, Yokoyama K, Yonezawa A, Denda M, Hashimoto M, et al. Multiplexed monitoring of therapeutic antibodies for inflammatory diseases using Fab-selective proteolysis nSMOL coupled with LC-MS. *J Immunol Methods*. 2019 Sep;472:44–54.
20. 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. *Anal Chim Acta*. 2019 Aug 27;1067:63–70.
21. Boyer-Suavet S, Andreani M, Cremoni M, Brglez V, Benzaken S, Bernard G, et al. Rituximab bioavailability in primary membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2019 Aug 1;34(8):1423–5.
22. Ternant D, Bejan-Angoulvant T, Passot C, Mulleman D, Paintaud G. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies Approved to Treat Rheumatoid Arthritis. *Clin Pharmacokinet*. 2015 Nov;54(11):1107–23.

23. Mazilu D, Opreș D, Gainaru C, Iliuta M, Apetrei N, Luca G, et al. Monitoring drug and antidrug levels: a rational approach in rheumatoid arthritis patients treated with biologic agents who experience inadequate response while being on a stable biologic treatment. *Biomed Res Int*. 2014;2014:702701.
24. Gottenberg J-E, Brocq O, Perdriger A, Lassoued S, Berthelot J-M, Wendling D, et al. Non-TNF-Targeted Biologic vs a Second Anti-TNF Drug to Treat Rheumatoid Arthritis in Patients With Insufficient Response to a First Anti-TNF Drug: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Sep 20;316(11):1172–80.
25. Edelman GM. Antibody structure and molecular immunology. *Scand J Immunol*. 1991 Jul;34(1):1–22.
26. Roitt IM, Brostoff J. *Immunologie*. De Boeck Université. Vol. 1. 1994.
27. von Behring E, Kitasato S. The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. *Mol Immunol*. 1991 Dec;28(12):1317, 1319–20.
28. Galfrè G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Meth Enzymol*. 1981;73(Pt B):3–46.
29. Abramowicz D, Schandene L, Goldman M. Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 1989 Apr 1;4(47):606–8.
30. European Medicines Agency. Summary of product characteristics : eculizumab. 2007.
31. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJT. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010 Apr;9(4):325–38.
32. Bertin D, Serrero M, Grimaud JC, Desjeux A, Desplat-Jégo S. Monitoring of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel diseases: A comparison of three commercially available ELISA kits. *Cytokine*. 2020 Feb 1;126:154859.
33. Ovacik M, Lin K. Tutorial on Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Its Considerations in Early Development. *Clin Transl Sci*. 2018 Nov;11(6):540–52.
34. Dostalek M, Gardner I, Gurbaxani BM, Rose RH, Chetty M. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet*. 2013 Feb;52(2):83–124.
35. Ternant D, Paintaud G. Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther*. 2005 Sep;5 Suppl 1:S37-47.

36. Thurlings RM, Teng O, Vos K, Gerlag DM, Aarden L, Stapel SO, et al. Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009 Jul 12;69(2):409–12.
37. Breedveld F, Agarwal S, Yin M, Ren S, Li NF, Shaw TM, et al. Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response. *J Clin Pharmacol*. 2007 Sep;47(9):1119–28.
38. Moots RJ, Xavier RM, Mok CC, Rahman MU, Tsai W-C, Al-Maini MH, et al. The impact of anti-drug antibodies on drug concentrations and clinical outcomes in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: Results from a multinational, real-world clinical practice, non-interventional study. *PLoS ONE*. 2017;12(4):e0175207.
39. Arad U, Elkayam O. Association of Serum Tocilizumab Trough Concentrations with Clinical Disease Activity Index Scores in Adult Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2019 Dec;46(12):1577–81.
40. Reddy V, Croca S, Gerona D, De La Torre I, Isenberg D, McDonald V, et al. Serum rituximab levels and efficiency of B cell depletion: differences between patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 May;52(5):951–2.
41. Cartron G, Trappe RU, Solal-Céligny P, Hallek M. Interindividual Variability of Response to Rituximab: From Biological Origins to Individualized Therapies. *Clin Cancer Res*. 2011 Jan 1;17(1):19–30.
42. Gatault P, Brachet G, Ternant D, Degenne D, Récipon G, Barbet C, et al. Therapeutic drug monitoring of eculizumab: Rationale for an individualized dosing schedule. *MAbs*. 2015 Sep 4;7(6):1205–11.
43. Spector R, Park GD, Johnson GF, Vesell ES. Therapeutic drug monitoring. *Clin Pharmacol Ther*. 1988 Apr;43(4):345–53.
44. Ensom MH, Davis GA, Cropp CD, Ensom RJ. Clinical pharmacokinetics in the 21st century. Does the evidence support definitive outcomes? *Clin Pharmacokinet*. 1998 Apr;34(4):265–79.
45. Pierre Marquet. Suivi thérapeutique pharmacologique. Pour l'adaptation de posologie des médicaments. *Option Bio*. Vol. 1. Elsevier; 2004. 19–33 p.
46. Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol*. 1998 Aug;46(2):95–9.
47. Ota R, Hirata A, Noto K, Yokoyama S, Hosomi K, Takada M, et al. Relationship between the blood concentrations of tacrolimus and voriconazole in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2019 Nov;57(11):561–6.

48. Collège National de Pharmacologie Médicale. Pharmacomedicale [Internet]. <https://pharmacomedicale.org/>. 2019. Available from: <https://pharmacomedicale.org/>
49. Gründer G. Editorial to Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology. *Pharmacopsychiatry*. 2018;51(1–02):5–6.
50. Société Française de Pharmacologie et Toxicologie. Éléments de l'interprétation et du dialogue clinico-biologique pour quelques paramètres usuels de pharmacologie-toxicologie. *Science direct*. 2016 Sep 15;71(4):405–34.
51. Touw DJ, Neef C, Thomson AH, Vinks AA, Cost-Effectiveness of Therapeutic Drug Monitoring Committee of the International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: a systematic review. *Ther Drug Monit*. 2005 Feb;27(1):10–7.
52. Guidi L, Pugliese D, Tonucci TP, Berrino A, Tolusso B, Basile M, et al. Therapeutic Drug Monitoring is More Cost-Effective than a Clinically Based Approach in the Management of Loss of Response to Infliximab in Inflammatory Bowel Disease: An Observational Multicentre Study. *J Crohns Colitis*. 2018 Aug 29;12(9):1079–88.
53. Hoseyni H, Xu Y, Zhou H. Therapeutic Drug Monitoring of Biologics for Inflammatory Bowel Disease: An Answer to Optimized Treatment? *J Clin Pharmacol*. 2018;58(7):864–76.
54. Levi M, Grange S, Frey N. Exposure-Exposure Relationship of Tocilizumab, an Anti-IL-6 Receptor Monoclonal Antibody, in a Large Population of Patients With Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2013;53(2):151–9.
55. Kneepkens EL, van den Oever I, Plasencia CH, Pascual-Salcedo D, de Vries A, Hart M, et al. Serum tocilizumab trough concentration can be used to monitor systemic IL-6 receptor blockade in patients with rheumatoid arthritis: a prospective observational cohort study. *Scand J Rheumatol*. 2017 Mar;46(2):87–94.
56. Seitz-Polski B, Dahan K, Debiec H, Rousseau A, Andreani M, Zaghrini C, et al. High-Dose Rituximab and Early Remission in PLA2R1-Related Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019 Aug 7;14(8):1173–82.
57. Darrouzain F, Bian S, Desvignes C, Bris C, Watier H, Paintaud G, et al. Immunoassays for Measuring Serum Concentrations of Monoclonal Antibodies and Anti-biopharmaceutical Antibodies in Patients. *Ther Drug Monit*. 2017;39(4):316–21.
58. Van Stappen T, Bollen L, Vande Castele N, Papamichael K, Van Assche G, Ferrante M, et al. Rapid Test for Infliximab Drug Concentration Allows Immediate Dose Adaptation. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016 Dec;7(12):e206.

59. Bian S, Lu J, Delport F, Vermeire S, Spasic D, Lammertyn J, et al. Development and validation of an optical biosensor for rapid monitoring of adalimumab in serum of patients with Crohn's disease. *Drug Test Anal.* 2018 Mar;10(3):592–6.
60. Mills JR, Cornec D, Dasari S, Ladwig PM, Hummel AM, Cheu M, et al. Using Mass Spectrometry to Quantify Rituximab and Perform Individualized Immunoglobulin Phenotyping in ANCA-Associated Vasculitis. *Anal Chem.* 2016 21;88(12):6317–25.
61. Willrich MAV, Murray DL, Barnidge DR, Ladwig PM, Snyder MR. Quantitation of infliximab using clonotypic peptides and selective reaction monitoring by LC–MS/MS. *International Immunopharmacology.* 2015 Sep 1;28(1):513–20.
62. Bults P, Merbel NC van de, Bischoff R. Quantification of biopharmaceuticals and biomarkers in complex biological matrices: a comparison of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and ligand binding assays. *Expert Review of Proteomics.* 2015 Jul 4;12(4):355–74.
63. Grifols. *Protocole Promonitor RTX - 1DV.* 2019.
64. Van Stappen T, Brouwers E, Vermeire S, Gils A. Validation of a sample pretreatment protocol to convert a drug-sensitive into a drug-tolerant anti-infliximab antibody immunoassay. *Drug Test Anal.* 2017 Feb;9(2):243–7.
65. El Amrani M, Donners AAM, Hack CE, Huitema ADR, van Maarseveen EM. Six-step workflow for the quantification of therapeutic monoclonal antibodies in biological matrices with liquid chromatography mass spectrometry – A tutorial. *Analytica Chimica Acta.* 2019 Nov 8;1080:22–34.
66. Millet A, Lebert D, Picard G, You B, Ceruse P, Guitton J. Determination of Cetuximab in Plasma by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry Orbitrap With a Stable Labeled ¹³C,¹⁵N-Cetuximab Internal Standard. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2019 Aug;41(4):467–475.
67. El Amrani M, van den Broek MPH, Göbel C, van Maarseveen EM. Quantification of active infliximab in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a tumor necrosis factor alpha -based pre-analytical sample purification and a stable isotopic labeled infliximab bio-similar as internal standard: A target-based, sensitive and cost-effective method. *J Chromatogr A.* 2016 Jul 8;1454:42–8.
68. Rodriguez J, Gupta N, Smith RD, Pevzner PA. Does trypsin cut before proline? *J Proteome Res.* 2008 Jan;7(1):300–5.
69. Truffot A, Jourdil J-F, Seitz-Polski B, Malvezzi P, Brglez V, Stanke F, et al. Simultaneous quantification of rituximab and eculizumab in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with rituximab ELISA kits. Submitted. 2020 Jun;

70. Truffot A, Gautier-Veyret E, Baillet A, Jourdil J-F, Stanke-Labesque F, Gottenberg J-E. Variability of rituximab and tocilizumab trough concentrations in patients with rheumatoid arthritis. Submission in process. 2020;
71. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry. 2018.
72. Ezan E, Bitsch F. Critical comparison of MS and immunoassays for the bioanalysis of therapeutic antibodies. *Bioanalysis*. 2009 Nov;1(8):1375–88.
73. van Bezooijen JS, Koch BCP, van Doorn MBA, Prens EP, van Gelder T, Schreurs MWJ. Comparison of Three Assays to Quantify Infliximab, Adalimumab, and Etanercept Serum Concentrations. *Ther Drug Monit*. 2016;38(4):432–8.
74. Dreesen E, Bossuyt P, Mulleman D, Gils A, Pascual-Salcedo D. Practical recommendations for the use of therapeutic drug monitoring of biopharmaceuticals in inflammatory diseases. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2017;9:101–11.
75. Liu YD, Goetze AM, Bass RB, Flynn GC. N-terminal glutamate to pyroglutamate conversion in vivo for human IgG2 antibodies. *J Biol Chem*. 2011 Apr 1;286(13):11211–7.
76. Boumans M, Teng O, Thurlings R, Bijlsma J, Gerlag D, Huizinga T, et al. Progression of structural damage is not related to rituximab serum levels in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Aug;52(8):1462–6.
77. Van den Berghe N, Truffot A, Peeters M, Compennolle G, Brouwers E, Soenen R, et al. Development and validation of immunoassays for monitoring of guselkumab and anti-guselkumab antibodies in patients with moderate-to-severe psoriasis. *J Pharm Biomed Anal*. 2020 Jun 18;189:113433.
78. Díaz-Torné C, Ortiz MÀ, Sarmiento M, Díaz-López C, Corominas H, Casademont J, et al. Rituximab levels are associated with the B cell homeostasis but not with the clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Rheumatol*. 2019;6(2):81–4.
79. Cornec D, Kabat BF, Mills JR, Cheu M, Hummel AM, Schroeder DR, et al. Pharmacokinetics of rituximab and clinical outcomes in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Apr 1;57(4):639–50.
80. Sigaux J, Hamze M, Daien C, Morel J, Krzysiek R, Pallardy M, et al. Immunogenicity of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2017 Jan;84(1):39–45.
81. Benucci M, Meacci F, Grossi V, Infantino M, Manfredi M, Bellio E, et al. Correlations between immunogenicity, drug levels, and disease activity in an Italian cohort of rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab. *Biologics*. 2016;10:53–8.

SERMENT

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES: FROM ANALYTIC TO THE EVALUATION OF THE PHARMACOKINETIC VARIABILITY OF RITUXIMAB AND TOCILIZUMAB

SUMMARY:

Medical care of chronic disease has been revolutionized by the use of monoclonal therapeutic antibodies (mAbs). Despite these advances, the clinical response of these drugs is eminently variable and could be linked to their important pharmacokinetic variability. That is why therapeutic drug monitoring (TDM) of mAbs was proposed.

Immunoassays like Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), the most currently used methods for mAbs quantification are limited by a lack of specificity. Thus, the pharmacology lab of the University Hospital of Grenoble Alpes has developed a highly-specific method by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to quantify mAbs.

Monitoring of a new proteotypic peptide of rituximab (RTX) and the use of stable isotope-labeled RTX as internal standard enable a lowering of the limit of quantification at $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, allowing TDM of RTX. RTX concentrations measured with this LC-MS/MS method were correlated to those obtained by ELISA, but an important bias existed for the Promonitor[®] kit. This improved LC-MS/MS method was then used in a bioclinical study that showed very variable RTX and tocilizumab (TCZ) serum concentrations in patients with rheumatoid arthritis, without evidence of any concentration-clinical response link.

Finally, this thesis allowed to improve the LC-MS/MS method of mAbs quantification and to confirm the important pharmacokinetic variability of RTX and TCZ. Further studies are necessary to investigate the concentration-effect link of these mAbs and evaluated the interest of their TDM.

KEYWORDS: therapeutic monoclonal antibodies, tandem mass spectrometry, therapeutic drug monitoring, rituximab, tocilizumab

SUBSIDIARY: Medical biology

Aurélie TRUFFOT

**SUIVI THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE DES ANTICORPS
MONOCLONAUX THÉRAPEUTIQUES : DE L'ANALYTIQUE À L'ÉVALUATION
DE LA VARIABILITÉ PHARMACOCINÉTIQUE DU RITUXIMAB ET DU
TOCILIZUMAB**

RÉSUMÉ :

L'arrivée des anticorps monoclonaux thérapeutiques (mAbs) a révolutionné la prise en charge de nombreuses pathologies chroniques. Malgré ces progrès, la réponse clinique à ces médicaments est éminemment variable et pourrait être liée à leur importante variabilité pharmacocinétique, justifiant le recours au Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP).

Alors que les techniques d'immunoanalyse de type ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) restent les méthodes les plus utilisées pour la quantification des mAbs, le laboratoire de Pharmacologie du CHU Grenoble Alpes a développé une méthode de dosage des mAbs très spécifique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM).

Grâce au suivi d'un nouveau peptide protéotypique du rituximab (RTX), puis à l'utilisation du RTX isotypiquement marqué comme standard interne, sa limite de quantification fût abaissée à $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, permettant d'envisager son STP. Les concentrations en RTX mesurées avec cette méthode CL-SM/SM étaient bien corrélées à celles obtenues en ELISA, mais un biais important existait pour le kit Promonitor[®]. Cette méthode CL-SM/SM a ensuite été mise à profit d'une étude bioclinique, montrant des concentrations sériques de RTX et de tocilizumab (TCZ) très variables chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, sans pour autant que le lien concentration-effet n'ait été mise en évidence.

Au final, ce travail a permis d'améliorer la méthode de dosage des mAbs en CL-SM/SM et de confirmer l'importante variabilité pharmacocinétique du RTX et du TCZ. Des études supplémentaires sont nécessaires pour investiguer le lien concentration-effet de ces mAbs et évaluer l'utilité de leur STP.

MOTS CLÉS : anticorps monoclonaux thérapeutiques, spectrométrie de masse en tandem, suivi thérapeutique pharmacologique, rituximab, tocilizumab.

FILIÈRE : Biologie médicale