

# Analyse monoklonaler Antikörper (mAbs) und davon abgeleiteter Therapeutika mithilfe der nativen SEC-MS



Die Quantifizierung von Aggregaten in proteinbasierten Therapien ist angesichts ihrer möglichen Auswirkungen auf die Wirksamkeit und Immunogenität von besonderer Bedeutung. Der Goldstandard für die Messung der Aggregation biotherapeutischer Proteine ist die Größenausschlusschromatographie (SEC) in Kombination mit UV-Detektion. Jedoch wird in der Forschung die SEC zunehmend mit nativer Massenspektrometrie (Native-MS) kombiniert, einer hochauflösenden Massenspektrometrie-Technik zur Bestimmung der akkuraten Masse.<sup>1</sup> Für einige experimentellen Ziele ist die MS ein geeigneteres Detektionsverfahren als UV. Mit der nativen MS ist nicht nur eine Bestätigung des Molekulargewichts möglich, sondern auch die Messung des Arzneimittel-Antikörper-Verhältnisses (DAR) von Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten (ADCs). Zudem liefert die Methode Informationen über posttranslationale Modifikationen (PTMs).

Umkehrphasentrennungen werden zwar häufig mit MS kombiniert, bei der Analyse von mAbs gibt es jedoch Grenzen. Der niedrige pH-Wert und die organischen Lösemittel, die bei der Umkehrphasen-Chromatographie eingesetzt werden, führen zur Denaturierung von mAbs und zur Dissoziation von säurelabilen Strukturen, wie sie in Cystein- oder Lysin-verknüpften ADCs gefunden werden. Die SEC bietet gegenüber Umkehrphasentechniken eindeutige Vorteile. Da SEC mit gepufferten mobilen Phasen bei neutralem pH-Wert durchgeführt wird, werden die intakte Proteinstruktur sowie empfindliche kovalente oder nicht-kovalente Bindungen erhalten, was die Massenbestimmung eines mAb im nativen Zustand erlaubt. Bei der SEC bleiben sogar die über Cystein verknüpften ADC-Strukturen, die besonders fragil sind, erhalten, sodass DAR-Berechnungen anhand der MS-Daten möglich sind.<sup>2,3</sup>

## Herausforderungen im Zusammenhang mit der SEC-MS:

- Erzielen einer hochauflösenden SEC-Trennung der mAb-Monomere von Verunreinigungen mit hohem Molekulargewicht (HMW) und niedrigem Molekulargewicht (LMW).
- Auswahl einer SEC-Säule sowie von Bedingungen, die mit der MS-Detektion kompatibel sind, damit:
  - Die Oberflächenbindung der stationären Phase stabil bleibt und es nicht zu Säulenbluten kommt.
  - Die Flussrate, die eine effiziente Desolvation des Analyten bei der MS ermöglicht, nicht zur Probenaggregation führt.
  - Die mobile Phase ausreichende Volatilität und eine niedrige Salzkonzentration aufweist, sodass eine Bestimmung der akkuraten Masse erfolgen kann.

## Warum sollten Sie Agilent AdvanceBio SEC-Säulen für SEC-MS-Analysen verwenden?

- Die Partikelgröße und die Poreneigenschaften sind wichtige Faktoren im Hinblick auf die Verbesserung der Peakform, der Peakempfindlichkeit und der Auflösung. Bei den AdvanceBio SEC-Säulen mit 1,9- $\mu\text{m}$ -Partikeln sind die Porengröße und das Volumen für eine hochaufgelöste Trennung optimiert.
- Sekundäre Wechselwirkungen mit der Oberfläche des SEC-Harzes können das freie Passieren durch die Poren und damit die größenbasierte Trennung stören. Die einzigartige proprietäre hydrophile Bindungschemie bietet eine inerte Oberfläche zur Minimierung sekundärer hydrophober Wechselwirkungen mit ADCs und mAbs.
- Die Hybridpartikel der AdvanceBio SEC-Säule vereinen die besten Eigenschaften von Silica- und Polymertechnologien, weisen eine erstklassige mechanische Robustheit ohne Säulenbluten auf. Daher sind sie für den Einsatz mit zusammen MS-Detektoren optimal geeignet.
- AdvanceBio 1,9  $\mu\text{m}$  SEC-Säulen funktionieren sowohl bei Bedingungen der denaturierenden mobilen Phase (wie Acetonitril/Wasser/Trifluoressigsäure) als auch bei MS-kompatiblen nativen Bedingungen (wie 80 mM Ammoniumacetat) und sind damit die beste Wahl für die Analyse intakter Proteine (> 2000 m/z).
- Die schlanken Säulen mit 2,1 und 4,6 mm ID sind kompatibel mit den niedrigen Flussraten, die für die effiziente Desolvatation und Ionisierung des Analyten benötigt werden. Auf diese Weise wird Bildung von Addukten, die die exakte Massenbestimmung stören, auf ein Minimum begrenzt.
- Dank der PEEK-beschichteten Säulen-Hardware ist der Probenflussweg frei von Metallen, was die Verwendung von Puffern für die mobile Phase mit niedrigeren Konzentrationen erleichtert. Diese reduzieren die Bildung von Addukten, die die exakte Massenbestimmung stören.

### Kriterien für die Säulenauswahl

Die Auswahl der geeigneten Porengröße für ein SEC-Experiment hängt von der Größe des interessierenden Analyten und den Zielen des Experiments ab. Die auszuwählende Porengröße richtet sich nach dem Molekulargewicht der Proteine, wobei Proteine mit höherem Molekulargewicht größere Porengrößen erfordern (siehe Abbildung 1). AdvanceBio SEC-Säulen (1,9  $\mu\text{m}$ ) sind mit zwei Porengrößen erhältlich. Bei der Entsalzung, durch die das Protein von einer niedermolekularen Verbindung oder Komponenten der Pufferlösung getrennt werden soll, führt eine kleinere Porengröße zu maximaler Trennung. In diesem Fall ist es von Vorteil, eine Säule zu verwenden, bei der das Molekulargewicht des Proteins größer ist als der obere Größengrenzwert der Säule, sodass das Protein ausgeschlossen wird.

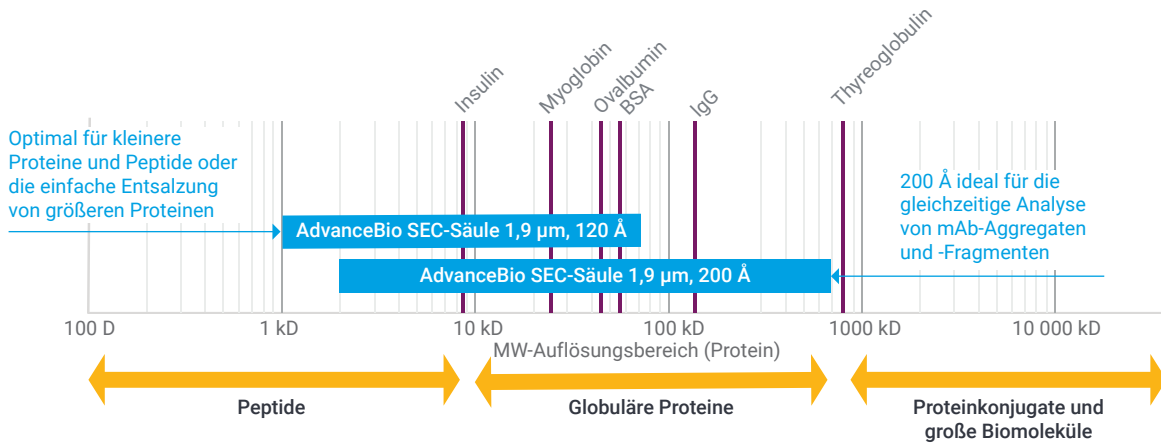
Wählen Sie eine SEC-Säule mit geeigneten Abmessungen, die Sie dabei unterstützt, das Ziel Ihres SEC-MS-Experiments zu erreichen, und die mit den Einschränkungen durch Ihre Probe kompatibel ist.

- Kürzere Säulen mit 30 oder 50 mm Länge sind für die einfache Entsalzung möglicherweise ausreichend.<sup>1</sup>
- Längere Säulen bieten eine höhere Auflösung, die die Trennung von Monomer und Dimer oder von Monomer und Fragmenten ermöglicht.
- Engere Säulendurchmesser bedingen kleinere Injektionsvolumina und sind nützlich bei begrenzter Probenverfügbarkeit.
- Engere Säulen erfordern für eine optimale SEC-Trennung darüber hinaus langsamere Flussraten und sind besser kompatibel mit den optimalen Flussraten und MS-Ionenquellenbedingungen, die die Voraussetzung für eine effiziente Desolvatation und Ionisierung bei der nativen MS sind.
- PEEK-beschichtete Säulen begrenzen den Kontakt der Probe mit Metalloberflächen auf ein Mindestmaß. Dies kann die Peakform verbessern, da sekundäre Wechselwirkungen minimiert werden und die Verwendung einer vergleichsweise verdünnten und flüchtigen mobilen Phase möglich ist.<sup>2</sup>

## Erste Schritte mit den neuen Agilent AdvanceBio SEC-Säulen: Tipps zur Sicherstellung der besten Leistung und Trennung

### Betrieb und Reinigung der Säule

- Passen Sie die Flussrate an den Säulendurchmesser an<sup>4</sup> – Säulen mit kleinerem ID erfordern für eine optimale SEC-Trennung niedrigere Flussraten, damit eine Drucküberlastung der Säule vermieden wird. Die schmalen Säulen mit 2,1 und 4,6 mm ID sind für die native MS, die eine effiziente Desolvatation und Ionisierung der Probe voraussetzt, ideal geeignet.
  - Arbeitsflussrate<sup>5</sup>:
    - 4,6  $\times$  150 mm: 0,1 bis 0,7 ml/min.
    - 4,6  $\times$  300 mm: 0,1 bis 0,5 ml/min.
    - Säulen mit 2,1 mm ID, 0,05 bis 0,10 ml/min.
- Verringern Sie die Anstiegsrate der Flussrate vom Standardwert auf 1 ml/min<sup>2</sup> oder weniger. Allmähliches Erhöhen der Flussrate verlängert die Lebensdauer der Säule. In der Agilent Software können Sie diese Einstellung im Abschnitt Advanced für die LC-Pumpensteuerung vornehmen.
- Stellen Sie den maximalen Grenzwert für den Druck für die LC-Methode so ein, dass er dem Säulendruck entspricht (620 bar für AdvanceBio SEC-Säulen (1,9  $\mu\text{m}$ )). Dies ist entscheidend in allen Situationen, in denen die maximale Druck-Kapazität des LC-Geräts die der Säule übersteigt.
- Führen Sie keine Rückspülung der Säulen durch. Spülen Sie die Säule stets in Richtung des Pfeils und stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Druck unter 400 bar bleibt.



**Abbildung 1.** Die Größe des Analyten bestimmt die zu verwendende SEC-Porengröße. Größere Proteine erfordern größere Poren.

- Vor und nach dem Spülen mit mindestens 20 Säulenvolumina an Reinigungslösung sollten Sie mit mindestens fünf Säulenvolumina an Reinstwasser nachspülen.
- Verifizieren Sie die Systemleistung in regelmäßigen Abständen mit einem geeigneten SEC-Standard.

### Optimieren der Chromatographie

- Filtern Sie die Proben, um Partikel zu entfernen.
- Verwenden Sie Vorsäulen und/oder Inline-Filter, um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, insbesondere, wenn Sie mit komplexen oder „schmutzigen“ Proben arbeiten.
- Stellen Sie sicher, dass die Säulenanschlüsse sicher und leakagefrei sind.
- Maximieren Sie die Auflösung der SEC-Partikel unter 2 µm, indem Sie das Totvolumen des Systems möglichst klein halten. An LCs der Modellreihe 1290 kann ein [Kit für ultraniedrige Dispersion](#) installiert werden, um das Systemvolumen noch weiter zu reduzieren und eine Verbreiterung der Banden zu vermeiden.<sup>6</sup>
- Maximieren Sie die chromatographische Auflösung durch Minimieren der Probenaufgabevolumens. Empfehlenswert ist ein Probenaufgabevolumen von 1 bis 5 µl, das nicht mehr als 1 % des Säulenvolumens ausmachen sollte.

### Pflege und Optimierung des MS

- Leiten Sie den LC-Strom außerhalb der interessierenden Retentionszeit(en) in den Abfall um, insbesondere um die Gesamtpermeationsgrenze herum, wo hohe Salzkonzentrationen auftreten können, um die MS-Quelle leichter sauber zu halten.
- Verwenden Sie Lösemittel von HPLC-Qualität oder einem höheren Reinheitsgrad.

- Verwenden Sie einen flüchtigen Puffer wie Ammoniumacetat und optimieren Sie die mobile Phase der SEC, indem Sie die niedrigste Konzentration des Puffers verwenden, bei der die chromatographische Auflösung und die Proteinstruktur erhalten bleiben. Dies hält die MS-Quelle sauberer und reduziert Addukte, die die Massenbestimmung stören, auf ein Minimum.
- Wischen Sie die MS-Quelle möglichst jeden Tag mit einem fusselfreien Tuch ab. Achten Sie darauf, dass die Quelle nicht zu heiß zum Berühren ist!

### Lagerung von Säulen

- Kurzfristige Lagerung (weniger als zwei Wochen) – Bewahren Sie die Säule in der mobilen Phase auf, die für die Analyse verwendet wird.
- Längere Lagerung (mehr als zwei Wochen): Bewahren Sie die Säule in filtriertem 100 mM Natriumphosphat, pH 7,0, mit oder ohne 0,02 % NaN<sub>3</sub> oder in 20 % Methanol in Wasser auf. Spülen Sie die Säule mit mindestens 10 Säulenvolumina. Es ist empfehlenswert, vor der Anwendung von Methanol oder Ethanol zunächst mit Wasser zu spülen. Beim Wechsel von oder zu 20 % Methanol muss bei niedrigen Flussraten gespült werden, um eine Drucküberlastung der Säule durch hohe Viskosität zu vermeiden. Beginnen Sie mit einer niedrigeren Flussrate und spülen Sie 4,6-mm-Säulen bei höchstens 0,1 ml/min und 2,1-mm-Säulen bei höchstens 0,05 ml/min. Achten Sie darauf, dass der Druck unter 400 bar bleibt. Lagern Sie die Säulen bei Raumtemperatur.

### Literaturhinweise

1. Sensitive Native Mass Spectrometry of Macromolecules using Standard Flow LC/MS (agilent.com) – [5994-1739EN](#)
2. Analysis of Antibody Fragment-Drug Conjugates Using an Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm PEEK-Lined Column – [5994-3045EN](#)
3. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q TOF – [5994-2155EN](#)
4. Agilent AdvanceBio SEC 1.9 µm Column User Guide – [5994-0739EN](#)
5. Analysis of Nanobodies Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm and AdvanceBio HIC Columns – [5994-1869EN](#)
6. Elevate Your mAb Aggregate Analysis – [5994-2709EN](#)

## Informationen für eine einfache Auswahl und Bestellung

Zum Bestellen der Artikel, die in den folgenden Tabellen des Agilent Online Stores aufgeführt sind, fügen Sie die Artikel zu Ihrer Liste von Produktfavoriten hinzu, indem Sie auf die MeineListe-Links in der Überschrift klicken. Geben Sie dann die Menge der Produkte ein, die Sie benötigen, legen Sie sie in den Warenkorb und gehen Sie zur Kasse. Ihre Liste bleibt unter „Produktfavoriten“ für Sie zur Verwendung bei künftigen Bestellungen erhalten.

Wenn Sie „Produktfavoriten“ zum ersten Mal benutzen, werden Sie aufgefordert, zur Verifizierung des Kontos Ihre E-Mail-Adresse einzugeben. Wenn Sie bereits über ein Agilent Konto verfügen, können Sie sich einfach anmelden. Wenn Sie noch kein Agilent Konto eingerichtet haben, müssen Sie sich für eines registrieren. Diese Funktion ist nur in Regionen verfügbar, in denen E-Commerce möglich ist. Alle Artikel können auch online bestellt werden, indem Sie auf die einzelnen Bestellnummern klicken, oder über Ihre üblichen Verkaufs- und Vertriebskanäle.

Beschreibung	Best.-Nr.
<b>MeineListe Probenvorbereitung</b>	
Captiva Einwegspritze, 5 ml, 100 St.	9301-6476
Captiva Premium-Spritzenfilter, PES, 15 mm, 0,2 µm, 100 St.	5190-5096
<b>MeineListe Standards</b>	
Agilent NIST-mAb, 25 µl	5191-5744
Agilent NIST-mAb, 4 x 25 µl	5191-5745
Kalibrierungsstandard für 300 Å AdvanceBio SEC-Säule	5190-9417
<b>MeineListe AdvanceBio SEC-Säulen</b>	
<b>120- Å-Säulen</b>	
AdvanceBio SEC-Säule 120 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, PEEK-beschichtete Edelstahl-Hardware (empfohlen)	PL1980-3250PK
AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm Vorsäule, 2,1 x 50 mm, PEEK-beschichtete Edelstahl-Hardware (empfohlen)	PL1980-1250PK
AdvanceBio SEC-Säule 120 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm	PL1580-5250
AdvanceBio SEC-Säule 120 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3250
AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm Vorsäule, 4,6 x 30 mm	PL1580-1250
<b>200- Å-Säulen</b>	
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm Vorsäule, 2,1 x 50 mm, PEEK-beschichteter Edelstahl (empfohlen)	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC-Säule 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, PEEK-beschichteter Edelstahl (empfohlen)	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm Vorsäule, 4,6 x 30 mm	PL1580-1201
AdvanceBio SEC-Säule 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm	PL1580-5201
AdvanceBio SEC-Säule 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3201
<b>MeineListe Säulenanschlussfittings und -Anschlüsse</b>	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting (zum Anschließen am Säuleneinlass)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect Kapillare MP35N, 0,12 x 105 mm (für Quick Connect Fitting)	5500-1578
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting (zum Anschließen am Säulenauslass)	5067-5966

Beschreibung	Best.-Nr.
Quick Turn Kapillare MP35N, 0,12 x 280 mm (für Quick Turn Fitting)	5500-1596
Montagewerkzeug für Quick Turn Fittings	5043-0915
Kapillare MP35N, 0,17 x 100 mm SL/SL vormontiert/vormontiert (zum Verbinden von Vorsäule und Säule)	5500-1278
<b>MeineListe Kits für ultraniedrige Dispersion</b>	
Leitungs-Kit für ultraniedrige Dispersion für Agilent 1290 Infinity II LC	5067-5963
Leitungs-Kit für ultraniedrige Dispersion für Agilent 1290 Infinity II Bio*	5004-0007
<b>MeineListe Probenbehältnisse</b>	
A-Line Schraubverschluss-Probenflasche, 2 ml, 12 x 32 mm (12-mm-Deckel), braun mit Beschriftungsfeld, 100 St.	5190-9590
Schraubverschluss, 12 mm, gebunden, blau, Septum aus PTFE/weißem Silikon, 100 St.	5190-7021
Probenflascheneinsatz, 250 µl, 5,6 x 30 mm, deaktiviertes Glas mit Polymerfüßen, 100 St.	5181-8872
InfinityLab Wellplate 96/0,5 ml, 30 St.	5043-9310
InfinityLab Wellplate Dichtungsmatte, 50 St.	5042-1389
<b>MeineListe Lösemittel und Zusätze</b>	
InfinityLab Reinstwasser für LC/MS, 1 Liter	5191-4498
InfinityLab Methanol, ultrarein, für LC/MS, 1 Liter (zur Lagerung von Säulen)	5191-4497
Ameisensäure, 5 ml	G2453-85060
<b>MeineListe Zubehör für die Lösemittelfiltration‡</b>	
InfinityLab Lösemittelfiltrationseinheit	5191-6776
InfinityLab Lösemittel-Filtrationsflasche, Glas, 2 Liter	5191-6781
Filtermembran, Nylon 47 mm, Porengröße 0,2 µm, 100 St.	5191-4341
Filtermembran, regenerierte Cellulose 47 mm, Porengröße 0,2 µm, 100 St.	5191-4340
Glasfilter für Lösemittelflasche, Lösemittleinlass, 20 µm	5041-2168
<b>MeineListe Zubehör für die Lösemittelhandhabung</b>	
InfinityLab Stay Safe Verschlusskappe, Starter-Kit	5043-1222
InfinityLab Lösemittelflasche, klar, 1 Liter	9301-6524
InfinityLab Lösemittelflasche, braun, 1 Liter	9301-6526
Lösemittelflasche, klar, 2 Liter	9301-6342
Lösemittelflasche, braun, 2 Liter	9301-6341
InfinityLab Stay Safe Spülflasche, 1 Liter	5043-1339
InfinityLab Abfallbehälter, GL45, 6 Liter, mit Stay Safe Verschlusskappe (Aktivkohlefilter 5043-1193 nicht inbegriffen)	5043-1221
InfinityLab Aktivkohlefilter mit Zeitstreifen, 58 g (zur Verwendung mit 5043-1221)	5043-1193

\* Empfohlen für das 1290 Infinity II Bio System.

‡ Wenn andere als die in dieser Tabelle aufgeführten Lösemittel verwendet werden, filtrieren Sie diese vor der Analyse mit der InfinityLab Lösemittelfiltrationseinheit.

DE44462.6107060185

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
Gedruckt in den USA, 12. Oktober 2021  
5994-4200DEE