

Análisis de anticuerpos monoclonales y fármacos derivados de anticuerpos monoclonales mediante SEC-MS nativa



La cuantificación de agregados resulta especialmente importante para las proteínas terapéuticas debido a sus posibles efectos sobre la eficacia y la inmunogenicidad. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) combinada con la detección UV es el enfoque de referencia para determinar la agregación de proteínas terapéuticas. Sin embargo, los investigadores están integrando cada vez más la SEC con la espectrometría de masas nativa (MS nativa), una técnica de MS de alta resolución, para determinar la masa con exactitud¹. Para ciertos objetivos experimentales, un instrumento de MS resulta más adecuado que un detector UV. Además de confirmar el peso molecular, la detección por MS nativa también determina las relaciones fármaco-anticuerpo (DAR) de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) y proporciona información sobre las modificaciones postranscripcionales (MPT).

A pesar de que las separaciones en fase inversa se suelen combinar con la MS, existen limitaciones a la hora de analizar anticuerpos monoclonales. El bajo pH y el disolvente orgánico utilizados en la cromatografía de fase inversa desnaturalizan los anticuerpos monoclonales y disocian las frágiles estructuras no covalentes o inestables en presencia de ácidos, como las existentes en los ADC unidos a través de restos de cisteína o lisina. La SEC ofrece exclusivas ventajas frente a las técnicas de fase inversa. Dado que se lleva a cabo con fases móviles tamponadas a pH neutro, mantiene intacta la estructura de las proteínas y los frágiles enlaces covalentes o no covalentes; además, permite determinar la masa de un anticuerpo monoclonal en su estado nativo. La SEC incluso preserva las estructuras de ADC unidos a través de restos de cisteína, que son especialmente frágiles, lo que permite calcular la DAR a partir de los datos de MS^{2,3}.

Entre los desafíos asociados a la SEC-MS se incluyen los siguientes:

- Obtención de una separación de alta resolución por SEC entre los monómeros de anticuerpos monoclonales y las impurezas de alto peso molecular (APM) y bajo peso molecular (BPM).
- Identificación de una columna para SEC y unas condiciones que sean compatibles con la detección por MS, de tal forma que:
 - La unión superficial de la fase estacionaria sea estable y no provoque sangrado de la columna.
 - El flujo que permita una desolvatación eficiente del analito en el sistema de MS no provoque agregación de la muestra.
 - La fase móvil sea lo suficientemente volátil y con una concentración baja en sales como para detectar la masa con exactitud.

Razones para usar las columnas AdvanceBio SEC de Agilent para el análisis por SEC-MS

- El tamaño de partícula y las características de los poros son importantes factores que mejoran la forma de los picos, la respuesta de pico y la resolución. Las columnas AdvanceBio SEC con partículas de 1,9 µm tienen un tamaño de poro y un volumen optimizados para conseguir una separación de alta resolución.
- Las interacciones secundarias con la superficie de la resina de SEC pueden evitar el paso libre a través de los poros e interferir con la separación por tamaño. La exclusiva fase estacionaria patentada de enlace hidrófilo proporciona una superficie inerte que minimiza la interacción hidrófoba secundaria con los ADC y los anticuerpos monoclonales.
- Las partículas híbridas AdvanceBio SEC incorporan las mejores propiedades de las tecnologías de sílice y poliméricas y ofrecen la mayor resistencia mecánica de su categoría, lo que evita el sangrado y hace que sean idóneas para su uso con detectores de MS.
- La columna AdvanceBio SEC de 1,9 µm funciona tanto en condiciones con una fase móvil desnaturalizante (como acetonitrilo/agua/TFA) como en condiciones nativas compatibles con la MS (por ejemplo, acetato de amonio 80 mM), lo que hace que sea una opción perfecta para proteínas intactas ($m/z > 2.000$).
- Las columnas estrechas de 2,1 y 4,6 mm de d.i. son compatibles con los flujos reducidos que se necesitan para conseguir una desolvatación/ionización eficiente del analito. Esto se requiere para minimizar la formación de aductos que interfieran con la determinación de la masa con exactitud.
- La columna de acero inoxidable revestido con PEEK elimina el metal del recorrido de la muestra. Esto facilita el uso de menores concentraciones de tampón en la fase móvil, lo que reduce la formación de aductos que interfieran con la determinación de la masa con exactitud.

Criterios para la selección de columnas

La selección del tamaño de poro correcto para un experimento de SEC depende del tamaño del analito de interés y de los objetivos del experimento. La selección del tamaño de poro se basa en el peso molecular de las proteínas, de tal modo que las proteínas de mayor peso molecular requieren tamaños de poro más grandes (consulte la Figura 1). Las columnas AdvanceBio SEC de 1,9 µm están disponibles con dos tamaños de poro. A la hora de llevar a cabo un experimento de desalinización en el que el objetivo sea separar la proteína de una molécula pequeña o de los componentes de una disolución de tampón, un tamaño de poro más pequeño mejorará la separación. En ese caso, resulta ventajoso excluir la proteína mediante la selección de una columna cuyo límite superior del rango de tamaños sea menor que el peso molecular de la proteína.

Elija una columna para SEC con unas dimensiones que le ayuden a cumplir el objetivo de su experimento de SEC-MS y que sea compatible con las limitaciones asociadas a la muestra.

- El uso de columnas más cortas, de 30 o 50 mm de longitud, puede bastar para los experimentos de desalinización sencillos¹.
- Las columnas de mayor longitud ofrecen mayor resolución, lo que le permitirá separar los monómeros de los dímeros o fragmentos.
- Las columnas de diámetro más estrecho requieren volúmenes de inyección más pequeños y resultan útiles cuando existen limitaciones en cuanto a la disponibilidad de la muestra.
- Además, las columnas más estrechas exigen usar flujos más bajos para conseguir una separación óptima por SEC y ofrecen mayor compatibilidad con flujos y condiciones de la fuente de MS óptimos para conseguir que la desolvatación y la ionización sean eficientes para la MS nativa.
- Las columnas revestidas con PEEK minimizan el contacto de la muestra con superficies metálicas, lo que puede mejorar la forma del pico gracias a la minimización de las interacciones secundarias y posibilitar el uso de una fase móvil volátil relativamente diluida².

Primeros pasos con las columnas AdvanceBio SEC de Agilent: Consejos para garantizar un rendimiento y una separación óptimos

Funcionamiento y limpieza de las columnas

- Los flujos deben estar en relación con el diámetro interno de la columna⁴: las columnas de menor diámetro interno requieren flujos más reducidos para conseguir una separación óptima por SEC y evitar sobrepresiones en la columna. Las columnas más estrechas, de 2,1 y 4,6 mm de d.i., son idóneas para la MS nativa, que requiere una desolvatación/ionización eficiente de la muestra.
 - Flujo operativo⁵:
 - 4,6 × 150 mm: 0,1-0,7 ml/min.
 - 4,6 × 300 mm: 0,1-0,5 ml/min.
 - Columnas de 2,1 mm de d.i.: 0,05-0,10 ml/min.
- Reduzca la rampa de flujo del valor predeterminado a 1 ml/min² o un valor inferior. El incremento progresivo del flujo alargará la vida útil de la columna. En el software de Agilent, puede encontrar este parámetro en la sección de ajustes avanzados de los controles de la bomba para LC.
- Ajuste el límite máximo de presión del método de LC para que sea idéntico al de la columna (620 bar para las columnas AdvanceBio SEC de 1,9 µm). Esto resulta fundamental en aquellos casos en los que la capacidad de presión máxima del sistema de LC sea superior a la de la columna.

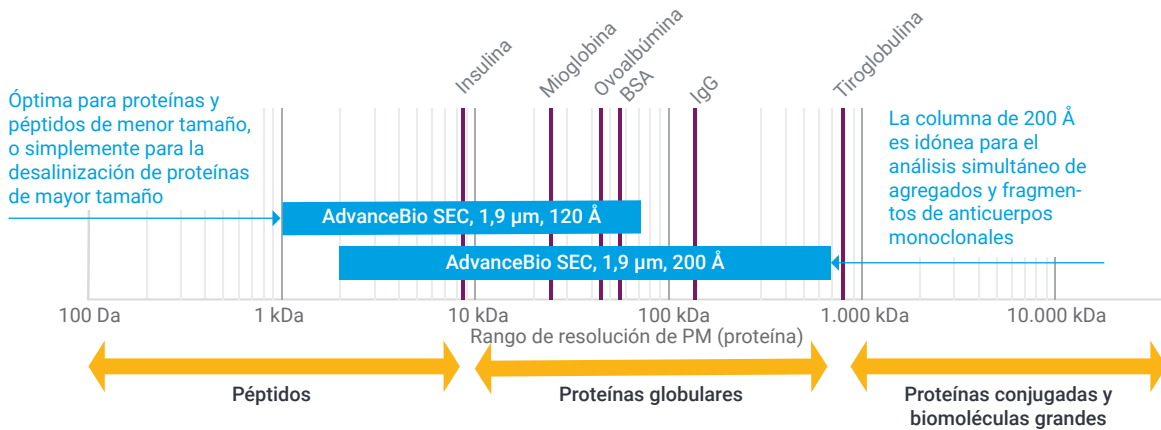


Figura 1. El tamaño del analito determina el tamaño de poro que debe utilizarse para la SEC. Las proteínas de mayor tamaño requieren poros más grandes.

- No lave las columnas en dirección contraria. Lave siempre la columna siguiendo la dirección de la flecha y ajuste el flujo para mantener la presión por debajo de 400 bar.
- Haga el aclarado con una cantidad de agua ultrapura igual, como mínimo, a cinco volúmenes de columna; después, lávela con una cantidad de solución de limpieza de, como mínimo, veinte volúmenes de columna.
- Compruebe el rendimiento del sistema con un patrón adecuado para SEC a intervalos regulares.

Optimización de la cromatografía

- Filtre las muestras para eliminar las partículas presentes.
- Utilice precolumnas y/o un filtro en línea para alargar la vida útil de la columna, sobre todo si trabaja con muestras complejas o "sucias".
- Asegúrese de que las conexiones de la columna estén bien sujetas y no presenten fugas.
- Para maximizar la resolución de las partículas de menos de 2 µm para SEC, minimice el volumen muerto del sistema. Puede instalar un [kit de dispersión ultrabaja](#) en los sistemas de LC 1290 para reducir aún más el volumen del sistema y evitar el ensanchamiento de la banda⁶.
- Minimice el volumen de inyección de muestra para maximizar la resolución cromatográfica. Se recomienda usar un volumen de inyección de muestra de 1 a 5 µl, con un volumen máximo de inyección igual al 1 % del volumen de la columna.

Cuidado y optimización del sistema de MS

- Desvíe la corriente del sistema de LC al contenedor de residuos fuera de los tiempos de retención de interés, sobre todo alrededor del punto de permeación total, donde puede producirse la elución de cantidades importantes de sales, para mantener limpia la fuente de MS.
- Utilice disolventes de calidad para HPLC o superior.

- Utilice un tampón volátil, como acetato de amonio, y optimice la fase móvil de SEC a la concentración mínima de tampón que mantenga la resolución cromatográfica y preserve la estructura de las proteínas. Esto mantendrá más limpia la fuente de MS y minimizará los aductos que interfieren con la determinación de la masa.
- Limpie la fuente de MS con un paño que no deje pelusa (si es posible, a diario). ¡Asegúrese de que la fuente no esté a una temperatura excesivamente alta al tacto!

Almacenamiento de la columna

- Almacenamiento a corto plazo (menos de dos semanas): almacene la columna en la fase móvil utilizada para el análisis.
- Almacenamiento a largo plazo (más de dos semanas): almacene la columna en fosfato de sodio 100 mM filtrado (pH ≤ 7,0), con o sin NaN₃ al 0,02 % o metanol al 20 % en agua. Para el lavado de la columna, utilice al menos 10 volúmenes de columna. Se recomienda lavarla siempre con agua antes de introducir metanol o etanol. Justo antes o después de usar metanol al 20 %, haga el lavado con un flujo bajo para evitar sobrepresiones en la columna causadas por la alta viscosidad. Comience con un flujo bajo, no superior a 0,1 ml/min para las columnas de 4,6 mm ni superior a 0,05 ml/min para las columnas de 2,1 mm. Asegúrese de mantener la presión por debajo de 400 bar. Almacene las columnas a temperatura ambiente.

Referencias

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](#)

Selección sencilla e información para pedidos

Para pedir los artículos incluidos en las tablas siguientes a través de la tienda en línea de Agilent, añada los artículos a su lista "Productos favoritos" haciendo clic en los enlaces "Mi lista" ubicados en los encabezados. A continuación, introduzca las cantidades de los productos que necesite, añádalas a la cesta y proceda al pago. Su lista permanecerá guardada en "Productos favoritos" para que pueda usarla para futuros pedidos.

Si es la primera vez que utiliza la función "Productos favoritos", se le pedirá que introduzca su dirección de correo electrónico para verificar la cuenta. Si ya tiene cuenta de Agilent, podrá iniciar sesión. Sin embargo, si no tiene una cuenta registrada de Agilent, deberá registrarse para solicitar una. Esta función solo es válida en las regiones que tengan habilitado el comercio electrónico. Todos los artículos se pueden pedir también en línea, haciendo clic en las referencias correspondientes, o a través de sus canales habituales de venta y distribución.

| Descripción | Referencia |
|--|---------------|
| Mi lista de preparación de muestras | |
| Jeringa desechable Captiva, 5 ml, 100/paq. | 9301-6476 |
| Filtro de jeringa Captiva Premium, PES, 15 mm, 0,2 µm, 100/paq. | 5190-5096 |
| Mi lista de patrones | |
| Agilent-NISTmAb, 25 µl | 5191-5744 |
| Agilent-NISTmAb, 4 × 25 µl | 5191-5745 |
| Patrón de calibración para columnas AdvanceBio SEC 300 Å | 5190-9417 |
| Mi lista de columnas AdvanceBio SEC | |
| Columnas de 120 Å | |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 2,1 × 150 mm, acero inoxidable revestido con PEEK (recomendada) | PL1980-3250PK |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 2,1 × 50 mm, precolumna, acero inoxidable revestido con PEEK (recomendada) | PL1980-1250PK |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 4,6 × 300 mm | PL1580-5250 |
| AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 4,6 × 150 mm | PL1580-3250 |
| AdvanceBio SEC 120 Å, precolumna de 1,9 µm, 4,6 × 30 mm | PL1580-1250 |
| Columnas de 200 Å | |
| AdvanceBio SEC 200 Å, precolumna de 1,9 µm, 2,1 × 50 mm, acero inoxidable revestido con PEEK (recomendada) | PL1980-1201PK |
| AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 2,1 × 150 mm, acero inoxidable revestido con PEEK (recomendada) | PL1980-3201PK |
| AdvanceBio SEC 200 Å, precolumna de 1,9 µm, 4,6 × 30 mm | PL1580-1201 |
| AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 × 300 mm | PL1580-5201 |
| AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 × 150 mm | PL1580-3201 |
| Mi lista de conexiones y conectores de columna | |
| Conector de conexión rápida Agilent InfinityLab (para la conexión de entrada de la columna) | 5067-5965 |

| Descripción | Referencia |
|--|-------------|
| Capilar de conexión rápida Agilent InfinityLab, MP35N, 0,12 × 105 mm (para conector de conexión rápida) | 5500-1578 |
| Conector de giro rápido Agilent InfinityLab (para la conexión de salida de la columna) | 5067-5966 |
| Capilar de giro rápido, MP35N, 0,12 × 280 mm (para conector de giro rápido) | 5500-1596 |
| Herramienta de montaje para conectores de giro rápido | 5043-0915 |
| Capilar, MP35N, 0,17 × 100 mm, SL/SL, ps/ps (para la conexión de la precolumna y la columna) | 5500-1278 |
| Mi lista de kits de dispersión ultrabaja | |
| Kit de tubos de dispersión ultrabaja para sistemas de LC Agilent 1290 Infinity II | 5067-5963 |
| Kit de tubos de dispersión ultrabaja para el sistema de LC bioinerte Agilent 1290 Infinity II* | 5004-0007 |
| Mi lista de recipientes para muestras | |
| Vial de rosca A-Line, 2 ml, 12 × 32 mm (tapón de 12 mm), ámbar, con zona de escritura, 100/paq. | 5190-9590 |
| Tapón de rosca, 12 mm, pegado, azul, séptum de PTFE/silicona blanca, 100/paq. | 5190-7021 |
| Inserto de vial, 250 µl, 5,6 × 30 mm, vidrio desactivado con pies de polímero, 100/paq. | 5181-8872 |
| Placa de pocillos InfinityLab, 96/0,5 ml, 30/paq. | 5043-9310 |
| Almohadilla de sellado para placas de pocillos InfinityLab, 50/paq. | 5042-1389 |
| Mi lista de disolventes y aditivos | |
| Agua ultrapura InfinityLab para LC/MS, 1 l | 5191-4498 |
| Metanol ultrapuro InfinityLab para LC/MS, 1 l (para el almacenamiento de columnas) | 5191-4497 |
| Ácido fórmico, 5 ml | G2453-85060 |
| Mi lista de consumibles para filtración de disolventes‡ | |
| Conjunto de filtración de disolventes InfinityLab | 5191-6776 |
| Matraz de filtración de disolventes InfinityLab, vidrio, 2 l | 5191-6781 |
| Membrana de filtro, 47 mm, nylon, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq. | 5191-4341 |
| Membrana de filtro, 47 mm, celulosa regenerada, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq. | 5191-4340 |
| Filtro de vidrio para botella de disolvente, entrada de disolvente, 20 µm | 5041-2168 |
| Mi lista de consumibles de manejo de disolventes | |
| Kit de inicio de tapas InfinityLab Stay Safe | 5043-1222 |
| Botella de disolvente InfinityLab, transparente, 1 l | 9301-6524 |
| Botella de disolvente InfinityLab, ámbar, 1 l | 9301-6526 |
| Botella de disolvente, transparente, 2 l | 9301-6342 |
| Botella de disolvente, ámbar, 2 l | 9301-6341 |
| Botella de purga InfinityLab Stay Safe, 1 l | 5043-1339 |
| Depósito de residuos InfinityLab, GL45, 6 l, con tapa Stay Safe (filtro de carbón 5043-1193 no incluido) | 5043-1221 |
| Filtro de carbón InfinityLab con etiqueta indicadora de tiempo, 58 g (para la ref. 5043-1221) | 5043-1193 |

* Recomendado para el sistema de LC bioinerte 1290 Infinity II.

‡ Si usa disolventes distintos a los indicados en esta tabla, utilice el conjunto de filtración de disolventes InfinityLab antes del análisis.

DE44462.6107060185

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Impreso en EE. UU., 12 de octubre de 2021
5994-4200ES