

## Analyse d'anticorps monoclonaux (mAb) et de produits biothérapeutiques dérivés de mAb à l'aide de la SEC-MS native



La quantification des agrégats est une problématique majeure pour les thérapies à base de protéines, étant donné leur effet potentiel sur l'efficacité et l'immunogénicité. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) combinée à la détection UV constitue l'approche de référence pour la mesure de l'agrégation des protéines thérapeutiques. Cependant, les chercheurs intègrent de plus en plus la SEC avec la spectrométrie de masse native (MS native), une technique de MS à haute résolution, pour obtenir une détermination de masse exacte.<sup>1</sup> Pour certains objectifs expérimentaux, la MS est un détecteur plus pertinent que l'UV. Outre la confirmation de la masse moléculaire, la détection par MS native mesure également les rapports médicament/anticorps (DAR) des conjugués anticorps-médicament (ADC) et fournit des informations sur les modifications post-traductionnelles (MPT).

Alors que les séparations en phase inversée sont communément associées à la MS, elles présentent des limites lors de l'analyse des mAb. Le solvant organique à faible pH utilisé en chromatographie en phase inverse dénature les mAb et dissocie les structures non covalentes labiles dans l'acide, telles que celles présentes dans les ADC liés à la cystéine ou à la lysine. La SEC offre des avantages spécifiques par rapport aux techniques en phase inverse. Comme elle est réalisée dans des phases mobiles tamponnées à pH neutre, elle préserve la structure intacte de la protéine et les liaisons covalentes et non covalentes fragiles et permet de mesurer la masse des mAb dans leur état natif. La SEC préserve même les structures ADC liées à la cystéine particulièrement fragiles, ce qui permet des calculs du rapport DAR à partir des données de MS.<sup>2,3</sup>

### Les défis associés à la SEC-MS comprennent :

- L'obtention d'une séparation SEC haute résolution des mAb monomères de haute masse moléculaire (HMW) et des impuretés de faible masse moléculaire (LMW).
- L'identification d'une colonne SEC et des paramètres compatibles avec la détection MS de façon à ce que :
  - les liaisons de surface de la phase stationnaire soient stables et ne provoquent pas de ressuage de la colonne ;
  - le débit qui supporte la désolvation du composé dans le MS ne provoque pas d'agrégation de l'échantillon ;
  - la phase mobile soit suffisamment volatile et sa concentration en sel assez faible pour détecter exactement la masse.

## Pourquoi utiliser les colonnes Agilent AdvanceBio SEC pour l'analyse par SEC-MS ?

- La granulométrie et les caractéristiques des pores sont des facteurs importants pour l'amélioration de la forme de pic, de sa sensibilité et de la résolution. Les colonnes AdvanceBio SEC à particules de 1,9 µm présentent des porosités et des volumes optimisés pour une séparation à haute résolution.
- Les interactions secondaires avec la surface de la résine SEC peuvent empêcher le libre passage à travers les pores et interférer avec la séparation par taille. La chimie de greffage hydrophile exclusive génère une surface inerte réduisant les interactions hydrophobes secondaires avec les ADC et les mAb.
- Les particules hybrides de l'AdvanceBio SEC intègrent les meilleures propriétés des technologies de la silice et des polymères, offrant la meilleure robustesse mécanique de sa catégorie sans ressuage, ce qui les rend idéales pour les détecteurs de masse (MSD).
- Les colonnes SEC AdvanceBio de 1,9 µm fonctionnent aussi bien avec des phases mobiles dénaturantes (telles que l'acétonitrile/l'eau/le TFA), ainsi que dans des conditions compatibles avec la MS native (telles que de l'acétate d'ammonium 80 mM), ce qui en fait un choix idéal pour les protéines intactes (>2 000 m/z).
- Les colonnes étroites de 2,1 et 4,6 mm de d.i. sont compatibles avec les bas débits nécessaires pour une désolvatation/ionisation efficace du composé. Ceci est nécessaire pour minimiser la formation de produits qui interfèrent avec la mesure de la masse précise.
- Le matériau de la colonne en acier inoxydable revêtu de PEEK élimine la présence de métal dans le circuit. Il est ainsi plus facile d'utiliser des tampons de phase mobile à faible concentration qui diminuent la formation de produits interférant avec la mesure de la masse précise.

### Critères de sélection de colonnes

La sélection de la porosité pour une expérience SEC dépend de la taille du composé étudié et des objectifs de l'expérience. La sélection de la porosité repose sur la masse moléculaire des protéines, les protéines de masse moléculaire les plus élevées nécessitant les porosités les plus grandes (voir figure 1). Les colonnes SEC AdvanceBio 1,9 µm sont disponibles dans deux porosités. Lors d'une expérience de dessalage où le but est de séparer la protéine d'une petite molécule ou des composants de la solution tampon, une porosité plus petite maximisera la séparation. Dans ce cas, il est avantageux d'exclure la protéine en sélectionnant une colonne où la masse moléculaire de la protéine est supérieure à la limite de taille supérieure de la colonne.

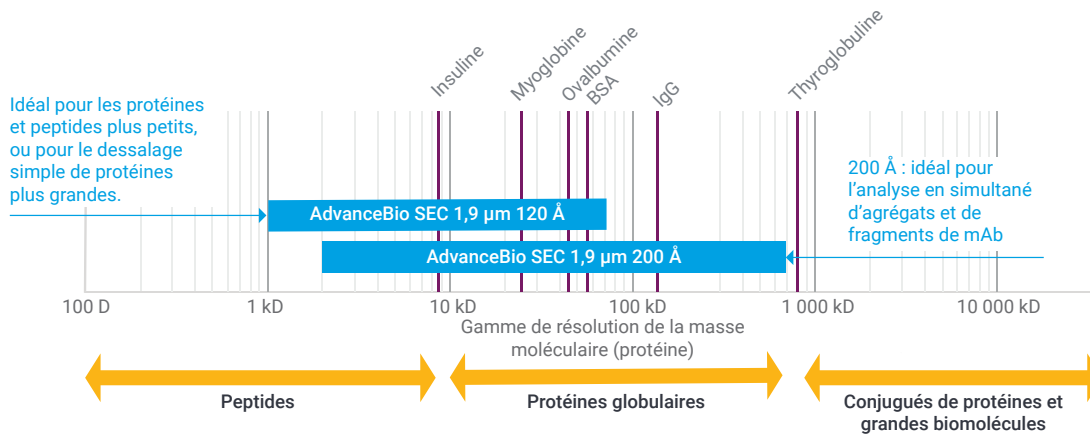
Choisissez une colonne SEC dont les dimensions vous aideront à atteindre l'objectif de votre expérience SEC-MS et qui est compatible avec les contraintes de votre échantillon.

- Des colonnes plus courtes, de 30 ou 50 mm de long, peuvent être suffisantes pour des expériences simples de dessalage.<sup>1</sup>
- Les colonnes plus longues offrent une résolution plus élevée, vous permettant de séparer le monomère du dimère ou le monomère du fragment.
- Les diamètres de la colonne plus étroits nécessitent des volumes d'injection plus petits et sont utiles lorsque la disponibilité des échantillons est limitée.
- Les colonnes plus étroites nécessitent également des débits plus faibles pour une séparation SEC optimale, et sont plus compatibles avec les débits optimaux et les paramètres de la source MS pour une désolvatation et une ionisation efficaces pour la MS native.
- Les colonnes revêtues de PEEK minimisent le contact de l'échantillon avec les surfaces métalliques, ce qui peut améliorer la forme de pic en minimisant les interactions secondaires et permettre l'utilisation d'une phase mobile volatile relativement diluée.<sup>2</sup>

## Débuter avec les nouvelles colonnes Agilent AdvanceBio SEC : astuces pour obtenir des performances optimales et les meilleures séparations

### Fonctionnement et nettoyage de la colonne

- Harmonisez les débits avec le diamètre de la colonne<sup>4</sup> – les colonnes de petit diamètre nécessitent des débits plus faibles pour une séparation SEC optimale, afin d'éviter une pression excessive sur la colonne. Les colonnes plus étroites de 2,1 et 4,6 mm de d. i. sont idéales pour la MS native, qui nécessite une désolvatation/ionisation efficace de l'échantillon.
  - Débit opérationnel<sup>5</sup> :
    - 4,6 × 150 mm, 0,1 à 0,7 mL/min.
    - 4,6 × 300 mm, 0,1 à 0,5 mL/min.
    - Colonnes de 2,1 mm de d. i., 0,05 à 0,10 mL/min.
- Réduisez le taux de montée du débit de la valeur par défaut à 1 mL/min<sup>2</sup> ou moins. L'augmentation graduelle du débit prolongera la durée de vie de la colonne. Dans le logiciel Agilent, ce réglage est disponible dans la section « Avancé » des contrôles de la pompe LC.
- Établissez la limite de pression maximale dans la méthode LC afin qu'elle corresponde à celle de la colonne (620 bars pour les colonnes SEC AdvanceBio 1,9 µm). Ceci est essentiel dans tous les cas où la capacité de pression maximale en LC dépasse celle de la colonne.
- Ne rétrobalayez pas les colonnes. Balayez toujours les colonnes dans la direction de la flèche et ajustez le débit afin de maintenir la pression sous 400 bars.



**Figure 1.** La taille du composé détermine la porosité SEC à utiliser. Les protéines plus grandes requièrent des pores plus grands.

- Rincez avec au moins cinq volumes de colonne d'eau ultrapure avant et après le rinçage, avec au moins 20 volumes de colonne de solution de nettoyage.
- Vérifiez la performance du système avec un étalon SEC approprié à intervalle régulier.

### Optimisation de la chromatographie

- Filtrez les échantillons afin d'enlever toutes les particules.
- Utilisez les colonnes de garde et/ou les filtres en ligne pour augmenter la durée de vie de la colonne, en particulier lorsque vous travaillez avec des échantillons complexes ou « sales ».
- Assurez-vous que les raccords de colonne sont solidement établis et ne fuient pas.
- Maximisez la résolution pour les particules SEC inférieures à 2 µm en minimisant le volume mort du système. Un [Kit ultra-faible dispersion](#) peut être installé sur les modèles de LC 1290 afin de réduire davantage le volume du système et d'éviter l'élargissement de la bande.<sup>6</sup>
- Maximisez la résolution chromatographique en minimisant le volume d'injection de l'échantillon. Un volume d'injection de l'échantillon de 1 à 5 µL est recommandé avec un volume d'injection maximum de 1 % du volume de la colonne.

### Optimisation et entretien du MS

- Déviez le flux LC vers les déchets en dehors du/des temps de rétention d'intérêt, en particulier autour du point de perméation totale où de grandes quantités de sel peuvent être éluées afin de garder la source MS plus propre.
- Utilisez des solvants de qualité HPLC ou supérieure.

- Utilisez un tampon volatil tel que l'acétate d'ammonium et optimisez la phase mobile de la SEC pour obtenir la plus faible concentration du tampon qui conserve la résolution chromatographique et préserve la structure de la protéine. Cela permet de garder la source MS plus propre et de minimiser les produits dérivés qui interfèrent avec la mesure de la masse.
- Essayez la source MS avec un chiffon non pelucheux, tous les jours si possible. Assurez-vous que la source n'est pas brûlante !

### Stockage de la colonne

- Stockage à court terme (moins de deux semaines) : conservez la colonne dans la phase mobile utilisée pour l'analyse.
- Stockage prolongé (plus de deux semaines) : conservez la colonne dans du phosphate de sodium 100 mM filtré, pH ≤ 7,0, avec ou sans 0,02 % de NaN<sub>3</sub>, ou 20 % de méthanol dans l'eau. Balayez la colonne avec un minimum de 10 volumes de colonne. Le rinçage avec de l'eau est toujours recommandé avant l'introduction de méthanol ou d'éthanol. Lorsque l'on passe à 20 % de méthanol ou que l'on en vient, le rinçage doit être effectué à bas débits pour éviter de surpresser la colonne en raison de la viscosité élevée. Commencez avec un débit plus faible, en ne dépassant pas 0,1 mL/min pour les colonnes de 4,6 mm et 0,05 mL/min pour les colonnes de 2,1 mm. Veillez à ce que la pression reste inférieure à 400 bars. Conservez les colonnes à température ambiante.

### Références

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](#)

## Sélection simplifiée et informations pour commander

Pour commander les produits dans les tableaux ci-dessous depuis la boutique en ligne d'Agilent, ajoutez les produits à votre liste de produits favoris en cliquant sur les liens Ma Liste dans l'en-tête. Puis entrez les quantités de produit dont vous avez besoin, ajoutez-les au panier et procédez au paiement. Votre liste d'articles sera disponible dans la rubrique « Produits favoris » pour faciliter vos futures commandes.

Si vous utilisez les « Produits favoris » pour la première fois, vous serez invité à entrer votre adresse e-mail pour vérifier votre compte. Si vous possédez déjà un compte Agilent, vous pourrez vous y connecter. Dans le cas contraire, vous devrez vous inscrire pour en créer un. Cette fonctionnalité n'est valide que dans les régions où le commerce en ligne est disponible. Tous les produits peuvent être également commandés en ligne en cliquant sur les références ou par vos canaux de distribution ou de vente habituels.

Description	Référence
<a href="#">Ma Liste de préparation d'échantillons</a>	
Seringue jetable Captiva, 5 mL, 100/pqt	9301-6476
Filtre-seringue Agilent Captiva Premium, polyéthersulfone, 15 mm, 0,2 µm, 100/pqt	5190-5096
<a href="#">Ma Liste d'étalons</a>	
Agilent NIST mAb, 25 µL	5191-5744
Agilent NISTmAb, 4 x 25 µL	5191-5745
Mélange étalon pour AdvanceBio SEC 300 Å	5190-9417
<a href="#">Ma Liste de colonnes AdvanceBio SEC</a>	
<a href="#">Colonnes 120 Å</a>	
Colonne AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm	PL1980-3250PK
Matériau en inox revêtu de PEEK (recommandé)	
Colonne AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm, dispositif de protection, matériau en inox revêtu de PEEK (recommandé)	PL1980-1250PK
Colonne AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm	PL1580-5250
Colonne AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3250
Colonne de garde AdvanceBio SEC 120 Å, 1,9 µm, 4,6 x 30 mm	PL1580-1250
<a href="#">Colonnes 200 Å</a>	
Colonne de garde AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm, inox revêtu de PEEK (recommandé)	PL1980-1201PK
Colonne AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, inox revêtu de PEEK (recommandé)	PL1980-3201PK
Colonne de garde AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 30 mm	PL1580-1201
Colonne AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm	PL1580-5201
Colonne AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3201
<a href="#">Ma Liste de raccords et de connecteurs pour colonnes</a>	
Raccord rapide Quick Connect Agilent InfinityLab (pour le raccord sur la tête de colonne)	5067-5965
Capillaire Quick Connect Agilent InfinityLab MP35N 0,12 x 105 mm (pour raccord Quick Connect)	5500-1578

Description	Référence
Raccord rapide Quick Turn Agilent InfinityLab (pour le raccord sur la sortie de colonne)	5067-5966
Capillaire Quick Turn MP35N 0,12 x 280 mm (pour raccord Quick Turn)	5500-1596
Outil de montage pour raccords Quick Turn	5043-0915
Capillaire MP35N 0,17 x 100 mm SL/SL ps/ps (pour raccorder la colonne de garde et la colonne)	5500-1278
<a href="#">Ma Liste de kits ultra-faible dispersion</a>	
Tube pour kit ultra-faible dispersion pour système LC Agilent 1290 Infinity II	5067-5963
Tube pour kit ultra-faible dispersion pour système LC Agilent 1290 Infinity II Bio*	5004-0007
<a href="#">Ma Liste de contenants</a>	
Flacon à visser A-Line, 2 mL 12 x 32 mm (capsule de 12 mm), ambré, plage d'écriture, 100/pqt	5190-9590
Capsule à visser, 12 mm, bleue, septum solidaire en silicone blanc/PTFE, 100/pqt	5190-7021
Insert de flacon, 250 µL, 5,6 x 30 mm, en verre désactivé avec pieds en polymère, 100/pqt	5181-8872
Plaque à 96 puits InfinityLab, 0,5 mL, 30/pqt	5043-9310
Tapis de fermeture pour plaque à puits InfinityLab, 50/pqt	5042-1389
<a href="#">Ma Liste de solvants et additifs</a>	
Eau ultrapure pour LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4498
Méthanol LC/MS ultrapur InfinityLab, 1 L (pour stockage de colonne)	5191-4497
Acide formique, 5 mL	G2453-85060
<a href="#">Ma Liste de consommables de filtration de solvants‡</a>	
Ensemble de filtration de solvants InfinityLab	5191-6776
Flacon de filtration de solvants InfinityLab, verre, 2 L	5191-6781
Membrane des filtres, nylon, 47 mm, porosité de 0,2 µm, 100/pqt	5191-4341
Membrane des filtres, cellulose régénérée 47 mm, porosité de 0,2 µm, 100/pqt	5191-4340
Filtre en verre pour flacon de solvant, aspiration de solvant, 20 µm	5041-2168
<a href="#">Ma Liste de consommables de manipulation de solvants</a>	
Kit de démarrage, bouchons Stay Safe InfinityLab	5043-1222
Flacon de solvant InfinityLab, transparent, 1 L	9301-6524
Flacon de solvant InfinityLab, ambré, 1 L	9301-6526
Flacon de solvant, transparent, 2 L	9301-6342
Flacon de solvant, ambré, 2 L	9301-6341
Flacon de purge Stay Safe InfinityLab, 1 L	5043-1339
Bidon de collecte de déchet InfinityLab, GL45, 6 L avec bouchon Stay Safe (filtre à charbon 5043-1193 non fourni)	5043-1221
Filtre à charbon InfinityLab avec indicateur de date, 58 g (à utiliser avec la référence 5043-1221)	5043-1193

\* Recommandé pour le système Bio 1290 Infinity II.

‡ Si vous utilisez des solvants autres que ceux figurant dans ce tableau, utilisez l'ensemble de filtration de solvants InfinityLab avant l'analyse.

DE44462.6107060185

Ces informations sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
Imprimé aux États-Unis, le 12 octobre 2021  
5994-4200FR