

## Analisi di anticorpi monoclonali (mAb) e agenti terapeutici derivati da mAb mediante SEC-MS nativa



La quantificazione degli aggregati è di particolare interesse per le terapie a base di proteine, visto il loro effetto potenziale sull'efficacia e l'immunogenicità. La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) combinata con rivelazione UV è l'approccio standard per misurare l'aggregazione di proteine bioterapeutiche. I ricercatori, però, stanno integrando sempre di più la SEC con la spettrometria di massa nativa (Native-MS), una tecnica di MS ad alta risoluzione, per la determinazione della massa accurata.<sup>1</sup> Per alcuni obiettivi sperimentali, la MS è una tecnica di rivelazione più adatta dell'UV. Oltre a confermare il peso molecolare, la rivelazione Native-MS misura anche i rapporti farmaco/anticorpo (DAR) di coniugati farmaco-anticorpo (ADC) e fornisce informazioni sulle modificazioni post-traduzionali (PTM).

Anche se le separazioni a fase inversa sono comunemente abbinate alla MS, vi sono limitazioni quando si analizzano gli mAb. Il solvente organico a basso pH usato nella cromatografia a fase inversa denatura gli mAb e dissocia strutture fragili non covalenti o sensibili agli acidi, come quelle presenti negli ADC legati a cisteina o lisina. La SEC offre benefici unici rispetto alle tecniche a fase inversa. Poiché è eseguita con fasi mobili tamponate a pH neutro, mantiene intatta la struttura delle proteine e i fragili legami covalenti o non covalenti e permette la misura di massa di un mAb nel suo stato nativo. La SEC preserva anche le strutture degli ADC legati a cisteina, che sono particolarmente fragili, permettendo il calcolo DAR dai dati MS.<sup>2,3</sup>

### I problemi associati alla SEC-MS includono:

- Ottenimento di una separazione SEC ad alta risoluzione di monomeri di mAb da impurezze ad alto peso molecolare (HMW) e a basso peso molecolare (LMW).
- Identificazione di una colonna e di condizioni SEC compatibili con la rivelazione MS tali che:
  - Il legame alla superficie della fase stazionaria sia stabile e non causi spurgo della colonna.
  - Il flusso che supporta una desolvatazione efficiente degli analiti nella MS non causi aggregazione del campione.
  - La fase mobile sia abbastanza volatile e a bassa concentrazione salina per rivelare accuratamente la massa.

## Perché usare le colonne Agilent AdvanceBio SEC per l'analisi SEC-MS?

- Le dimensioni delle particelle e le caratteristiche dei pori sono fattori importanti che migliorano la forma dei picchi, la sensibilità e la risoluzione. Le colonne AdvanceBio SEC con particelle da 1,9 µm hanno una dimensione dei pori e un volume ottimizzati per la separazione ad alta risoluzione.
- Le interazioni secondarie con la superficie della resina SEC possono impedire il libero passaggio attraverso i pori e interferire con la separazione in base alle dimensioni. L'esclusiva chimica di legame idrofila brevettata offre una superficie inerte, riducendo al minimo l'interazione idrofobica secondaria con gli ADC e gli mAb.
- Le particelle ibride di AdvanceBio SEC presentano le migliori proprietà della silice e delle tecnologie polimeriche, fornendo la robustezza meccanica migliore della categoria, che non spurga, e che le rende ideali per l'uso con rivelatore a selezione di massa.
- La colonna AdvanceBio SEC da 1,9 µm lavora sia con condizioni denaturanti della fase mobile (come acetonitrile/acqua/TFA) che con condizioni native compatibili con la MS (come acetato di ammonio 80 mM), il che la rende la scelta ideale per proteine intatte (>2.000 m/z).
- Le colonne con piccolo diametro interno, di 2,1 e 4,6 mm, sono compatibili con i bassi flussi necessari per la desolvatazione/ionizzazione efficiente degli analiti. Questo è necessario per ridurre al minimo la formazione di addotti che interferiscono con la misura in massa accurata.
- La struttura della colonna in acciaio inossidabile rivestito in PEEK elimina la presenza di metalli dal percorso del campione. Ciò rende più facile l'uso di tamponi della fase mobile meno concentrati, riducendo la formazione di addotti che interferiscono con la misura in massa accurata.

### Criteria per la scelta della colonna

La scelta della dimensione corretta dei pori per un esperimento di SEC dipende dalla dimensione dell'analita di interesse e dagli obiettivi dell'esperimento. La scelta della dimensione dei pori si basa sul peso molecolare delle proteine, con proteine a peso molecolare maggiore che richiedono pori di dimensioni maggiori (vedere la Figura 1). Le colonne AdvanceBio SEC da 1,9 µm sono disponibili con due dimensioni dei pori. Quando si esegue un esperimento di desalinizzazione il cui obiettivo è separare la proteina da una piccola molecola o da componenti di una soluzione tampone, una minore dimensione dei pori massimizza la separazione. In questo caso, è utile escludere la proteina scegliendo una colonna il cui limite superiore di dimensione sia inferiore al peso molecolare della proteina.

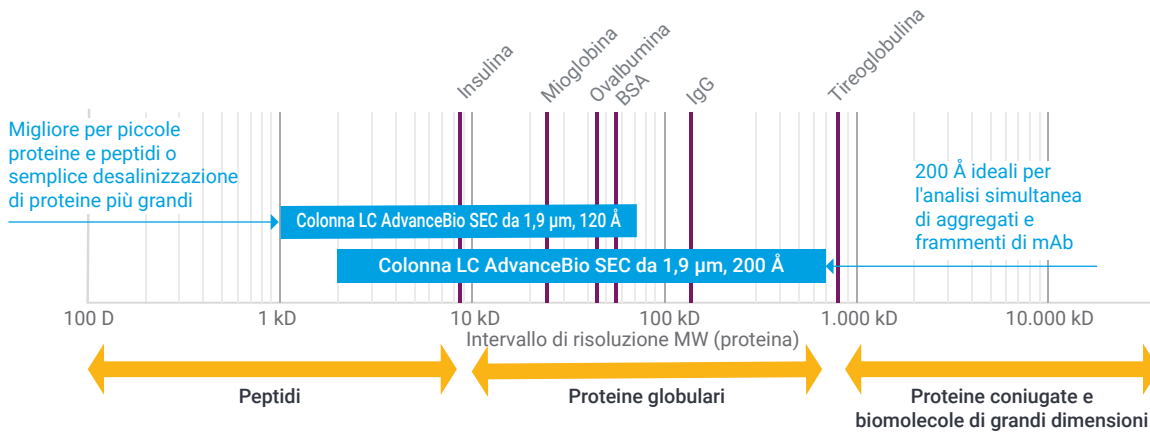
Scegli una colonna SEC le cui dimensioni ti aiutino a raggiungere l'obiettivo del tuo esperimento di SEC-MS e che sia compatibile con i vincoli del tuo campione.

- Colonne più corte, di 30 o 50 mm di lunghezza, potrebbero essere sufficienti per i semplici esperimenti di desalinizzazione.<sup>1</sup>
- Colonne più lunghe determinano una risoluzione maggiore e permettono di separare monomeri da dimeri o monomeri da frammenti.
- Diametri delle colonne più piccoli richiedono volumi di iniezione inferiori e sono utili quando la disponibilità di campione è limitata.
- Colonne con diametri inferiori richiedono anche flussi inferiori per una separazione SEC ottimale e sono più compatibili con flussi e condizioni della sorgente MS ottimali per la desolvatazione e la ionizzazione efficiente in Native-MS.
- Le colonne rivestite in PEEK riducono al minimo il contatto del campione con le superfici metalliche, il che può migliorare la forma dei picchi riducendo al minimo le interazioni secondarie e permettere l'uso di una fase mobile volatile relativamente diluita.<sup>2</sup>

## Guida introduttiva alle colonne Agilent AdvanceBio SEC: suggerimenti per assicurarti prestazioni e separazioni ottimali

### Utilizzo e pulizia delle colonne

- Allineare i flussi con il diametro interno della colonna<sup>4</sup>: diametri interni più piccoli richiedono flussi inferiori per una separazione SEC ottimale per evitare di sottoporre la colonna a pressioni eccessive. Le colonne con diametro interno più piccolo, 2,1 e 4,6 mm, sono ideali per la Native-MS, che richiede una desolvatazione/ionizzazione efficiente del campione.
  - Flusso operativo<sup>5</sup>:
    - 4,6 × 150 mm, da 0,1 a 0,7 mL/min.
    - 4,6 × 300 mm, da 0,1 a 0,5 mL/min.
    - colonne con d.i. 2,1 mm, da 0,05 a 0,10 mL/min.
- Ridurre la rampa del flusso dal valore predefinito a 1 mL/min<sup>2</sup> o meno. L'aumento graduale del flusso prolungherà la durata della colonna. Nel software Agilent questa impostazione si trova nella sezione Avanzata dei comandi della pompa LC.
- Impostare il limite massimo di pressione nel metodo LC in modo che corrisponda a quello della colonna (620 bar per le colonne AdvanceBio SEC da 1,9 µm). Questo è fondamentale per tutte le situazioni in cui le capacità in termini di pressione massima del sistema LC superino quelle della colonna.



**Figura 1.** La dimensione dell'analita determina la dimensione dei pori della SEC da usare. Le proteine più grandi richiedono pori più grandi.

- Non sottoporre le colonne a lavaggio in controflusso. Lavare sempre la colonna nella direzione della freccia e regolare il flusso in modo da mantenere la pressione al di sotto di 400 bar.
- Sciacquare con almeno cinque volumi della colonna di acqua ultra pura prima e dopo il lavaggio con almeno 20 volumi della colonna di soluzione detergente.
- Verificare le prestazioni del sistema con uno standard SEC idoneo a intervalli regolari.

### Ottimizzazione della cromatografia

- Filtrare i campioni per rimuovere eventuale particolato.
- Usare precolonne e/o un filtro in linea per prolungare la durata della colonna, specialmente quando lavori con campioni complessi o "sporchi".
- Assicurarsi che le connessioni delle colonne siano sicure e prive di perdite.
- Massimizzare la risoluzione delle particelle SEC inferiori a 2 µm riducendo al minimo il volume morto del sistema. Sui sistemi LC modello 1290 può essere installato un [kit a dispersione ultra-bassa](#) per ridurre ulteriormente il volume del sistema ed evitare l'allargamento della banda.<sup>6</sup>
- Massimizzare la risoluzione cromatografica riducendo al minimo il volume di iniezione del campione. È consigliato un volume di iniezione del campione di 1-5 µL con un volume massimo di iniezione pari all'1% del volume della colonna.

### Manutenzione e ottimizzazione della MS

- Deviare il flusso LC allo scarico al di fuori del tempo di ritenzione di interesse, specialmente intorno al punto di permeazione totale in cui quantità elevate di sale possono eluire per mantenere la sorgente MS più pulita.
- Usare solventi di grado HPLC o superiore.

- Usare un tampone volatile come acetato di ammonio e ottimizzare la fase mobile della SEC a concentrazioni del tampone basse che mantengano la risoluzione cromatografica e preservino la struttura proteica. Questo mantiene la sorgente MS più pulita e riduce al minimo gli addotti che interferiscono con la misura di massa.
- Pulire la sorgente MS con un panno senza lanugine, possibilmente tutti i giorni. Assicurarsi che la sorgente non sia troppo calda da toccare!

### Conservazione della colonna

- Conservazione a breve termine (meno di due settimane): conservare la colonna nella fase mobile usata per l'analisi.
- Conservazione prolungata (oltre due settimane): conservare la colonna in fosfato di sodio 100 mM, pH ≤7,0, filtrato, con o senza NaN<sub>3</sub> allo 0,02% o metanolo al 20% in acqua. Lavare la colonna con almeno 10 volumi della colonna. Il lavaggio con acqua è sempre raccomandato prima dell'introduzione di metanolo o etanolo. Quando si passa da 0 a metanolo al 20%, il lavaggio deve essere effettuato a un flusso basso per evitare di sottoporre la colonna a pressione eccessiva a causa dell'elevata viscosità. Iniziare con un flusso più basso, lavare a non più di 0,1 mL/min per le colonne da 4,6 mm e a non più di 0,05 mL/min per le colonne da 2,1 mm. Prestare attenzione a mantenere la pressione al di sotto di 400 bar. Conservare le colonne a temperatura ambiente.

### Bibliografia

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](#)

## Semplicità di scelta e informazioni per gli ordini

Per ordinare gli articoli elencati nelle tabelle seguenti dall'Agilent Online Store, aggiungi gli articoli all'elenco dei Prodotti preferiti facendo clic sui collegamenti "Il mio elenco" nell'interfaccia. Inserisci quindi le quantità dei prodotti di cui hai bisogno, aggiungi al carrello e procedi all'ordine. L'elenco rimarrà tra i Prodotti preferiti in modo che tu possa disporne per gli ordini futuri.

Se è la prima volta che usi Prodotti preferiti, ti verrà chiesto di inserire il tuo indirizzo e-mail per la verifica dell'account. Se sei titolare di un account Agilent esistente, potrai eseguire l'accesso. Se ancora non disponi di un account Agilent registrato, dovrai registrarne uno. Questa funzione è disponibile soltanto nelle regioni in cui è abilitato l'e-commerce. Tutti gli articoli possono anche essere ordinati online facendo clic sui singoli codici o attraverso i canali di vendita e distribuzione abituali.

Descrizione	Codice
<a href="#">Il mio elenco per la preparazione del campione</a>	
Siringa monouso Captiva, 5 mL, 100/conf.	9301-6476
Filtro per siringa Captiva Premium, PES, 15 mm, 0,2 µm, 100/conf.	5190-5096
<a href="#">Il mio elenco di standard</a>	
Agilent-NISTmAb, 25 µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 x 25 µL	5191-5745
Standard di calibrazione AdvanceBio SEC da 300 Å	5190-9417
<a href="#">Il mio elenco di colonne AdvanceBio SEC</a>	
<a href="#">Colonne da 120 Å</a>	
AdvanceBio SEC da 120 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, acciaio inossidabile rivestito in PEEK (consigliato)	PL1980-3250PK
Precolonna AdvanceBio SEC da 120 Å, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm, acciaio inossidabile rivestito in PEEK (consigliato)	PL1980-1250PK
AdvanceBio SEC da 120 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm	PL1580-5250
AdvanceBio SEC da 120 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3250
Precolonna AdvanceBio SEC da 120 Å, 1,9 µm, 4,6 x 30 mm	PL1580-1250
<a href="#">Colonne da 200 Å</a>	
Precolonna AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm, acciaio inossidabile rivestito in PEEK (consigliato)	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, acciaio inossidabile rivestito in PEEK (consigliato)	PL1980-3201PK
Precolonna AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 30 mm	PL1580-1201
AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm	PL1580-5201
AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3201
<a href="#">Il mio elenco di raccordi e connettori per colonne</a>	
Raccordo Quick Connect Agilent InfinityLab (per la connessione all'ingresso della colonna)	5067-5965
Capillare Quick Connect Agilent InfinityLab MP35N, 0,12 x 105 mm (per raccordo Quick Connect)	5500-1578

Descrizione	Codice
Raccordo Quick Turn Agilent InfinityLab (per la connessione all'uscita della colonna)	5067-5966
Capillare Quick Turn MP35N, 0,12 x 280 mm (per raccordo Quick Turn)	5500-1596
Utensile di montaggio per raccordi Quick Turn	5043-0915
Capillare MP35N, 0,17 x 100 mm SL/SL ps/ps (per la connessione di precolonna e colonna)	5500-1278
<a href="#">Il mio elenco di kit a dispersione ultra-bassa</a>	
Kit di tubi a dispersione ultra-bassa per LC Agilent 1290 Infinity II	5067-5963
Kit di tubi a dispersione ultra-bassa per Agilent 1290 Infinity II Bio*	5004-0007
<a href="#">Il mio elenco di contenitori per campioni</a>	
Vial con tappo a vite A-Line, 2 mL, 12 x 32 mm (tappo da 12 mm) ambrato, con etichetta, 100/conf.	5190-9590
Tappo a vite, 12 mm, legato, blu, setti in PTFE/silicone bianco, 100/conf.	5190-7021
Inserto per vial, 250 µL, 5,6 x 30 mm, vetro disattivato con supporto polimerico, 100/conf.	5181-8872
Piastra a pozzetti InfinityLab 96/0,5 mL, 30/conf.	5043-9310
Coperchio di chiusura per piastra a pozzetti InfinityLab, 50/conf.	5042-1389
<a href="#">Il mio elenco di solventi e additivi</a>	
Acqua ultra pura per LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4498
MeOH ultra puro per LC/MS InfinityLab, 1 L (per la conservazione delle colonne)	5191-4497
Acido formico, 5 mL	G2453-85060
<a href="#">Il mio elenco di prodotti di consumo per la filtrazione del solvente‡</a>	
Gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab	5191-6776
Matraccio di filtrazione del solvente InfinityLab, vetro, 2 L	5191-6781
Membrana del filtro, nylon 47 mm, dimensione dei pori 0,2 µm, 100/conf.	5191-4341
Membrana del filtro, cellulosa rigenerata 47 mm, dimensione dei pori 0,2 µm, 100/conf.	5191-4340
Filtro in vetro per bottiglia di solvente, ingresso del solvente, 20 µm	5041-2168
<a href="#">Il mio elenco di prodotti di consumo per la manipolazione del solvente</a>	
Kit di avvio tappo Stay Safe InfinityLab	5043-1222
Bottiglia di solvente InfinityLab, trasparente, 1 L	9301-6524
Bottiglia di solvente InfinityLab, ambrata, 1 L	9301-6526
Bottiglia di solvente, trasparente, 2 L	9301-6342
Bottiglia di solvente, ambrata, 2 L	9301-6341
Bottiglia di spurgo Stay Safe InfinityLab, 1 L	5043-1339
Contenitore di scarico InfinityLab, GL45, 6 L con tappo Stay Safe (filtro a carbone 5043-1193 non incluso)	5043-1221
Filtro a carbone InfinityLab con striscia time strip, 58 g (da usare con 5043-1221)	5043-1193

\* Consigliato per il sistema 1290 Infinity II Bio.

‡ Se si usano solventi diversi da quelli elencati in questa tabella, utilizzare il gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab prima dell'analisi.

DE44462.6107060185

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
Stampato negli Stati Uniti il 12 ottobre 2021  
5994-4200ITE