

Analyse von Fragmenten und Dimeren von monoklonalen Antikörpern (mAbs) durch Größenausschlusschromatographie (SEC)



Aus biotherapeutischen Proteinen können sich während der Entwicklung, der Lagerung, dem Versand und der Auslieferung von Arzneimitteln Fragmente mit niedrigem Molekulargewicht (low molecular weight, LMW) sowie Dimere und Aggregate mit hohem Molekulargewicht (high molecular weight, HMW) bilden. Diese Größenvarianten sind ein kritisches Qualitätsmerkmal (critical quality attribute, CQA), das genau charakterisiert werden muss, um eine immunogene Reaktion und Unterschiede in der Pharmakokinetik oder der Wirkstärke des Arzneimittels zu vermeiden. Die größenspezifische Trennung durch Größenausschlusschromatographie (SEC) ist eine Standardtechnik zur Analyse von Größenvarianten und zur Überwachung des Reinheitsgrades von Biotherapeutika wie monoklonalen Antikörpern (mAbs). Die SEC nutzt ausschließlich die Durchlässigkeit von Proteinen durch die Poren der stationären Phase der Säule und keinerlei andere Arten von Interaktionen mit der Phase. Daher werden globuläre Proteine und Peptide auf Grundlage des hydrodynamischen Radius (Größe) getrennt, wobei größere Proteine und Aggregate zuerst eluieren, gefolgt von Fragmenten und kleinen Peptiden.

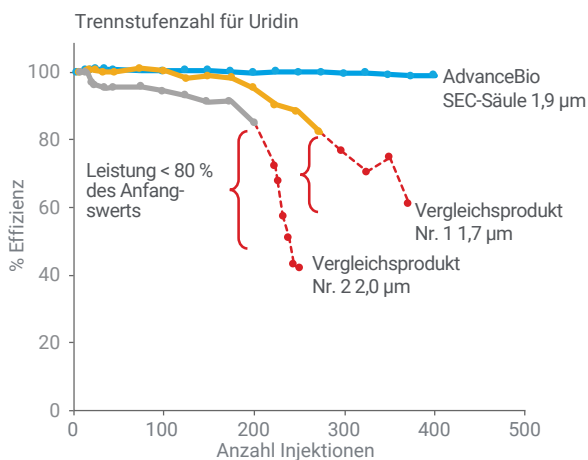
Kritische Faktoren, die die Trennung und Auflösung von mAb-Fragmenten und -Aggregaten beeinflussen

Die **Partikelgröße und die Poreneigenschaften** sind wichtige Faktoren im Hinblick auf die Verbesserung der Peakform, der Peakempfindlichkeit und der Auflösung. Für eine effektive Trennung von Aggregaten oder Fragmenten mit sehr ähnlichen Größen ist die richtige Porengröße erforderlich. Größere Poren ermöglichen eine effizientere Permeation der Biomoleküle in die Poren und verstärken die Unterschiede bezüglich der Elutionszeit zwischen den einzelnen Verbindungen. Andererseits verringert das Porenvolumen die Stärke des Packungsmaterials und macht es fragiler. Das richtige Gleichgewicht zwischen Auflösung und mechanischer Stärke ist entscheidend für das Erzielen der gewünschten Trennung mit SEC-Säulen.

Sekundäre Wechselwirkungen mit der Oberfläche des SEC-Harzes können das freie Passieren durch die Poren und damit eine größenbasierte Trennung stören. Bei der Auswahl einer SEC-Säule sind Partikel, die sekundäre Wechselwirkungen minimieren, von entscheidender Bedeutung.

Warum sollten Sie Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1,9 µm Säulen für die mAb-Fragment- und -Aggregattrennung verwenden?

- Die proprietären monodispersen AdvanceBio 1,9-µm-Kieselgelpartikel wurden für erstklassige mechanische Robustheit entwickelt. Daher eignen sie sich sowohl für UHPLC- als auch für HPLC-Instrumente und bieten eine hervorragende Lebensdauer der Säule.¹
- Die 1,9 µm Partikel der AdvanceBio SEC-Säulen haben Poreneigenschaften, die für die hochaufgelöste und schnelle Trennung von Proteinfragmenten mit geringerem Molekulargewicht sowie von mAb-Aggregaten und -Dimeren mit einer einzigen Säule ideal geeignet ist.²
- Die einzigartige proprietäre hydrophile Bindungschemie der Säule bietet eine inerte Oberfläche zur Minimierung sekundärer hydrophober Wechselwirkungen mit ADCs und mAbs.



Säule: 4,6 x 300 mm
Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0
Flussrate: 0,35 ml/min
Temperatur: Umgebungstemperatur
Detektor: 220 nm
Probe: Bio-Rad Proteingemisch und Uridin
 (Durchfluss-Stopp alle 50 Injektionen)

Abbildung 1. AdvanceBio SEC 200 Å 1,9 µm Säulen zeigten über 400 Injektionen einen Rückgang der Trennstufenzahl von weniger als 2 %, was die hervorragende mechanische Stabilität bestätigt.

Empfohlene Startbedingungen³

Parameter	Wert
Säule	AdvanceBio SEC-Säule 200 Å 4,6 x 300 mm, 1,9 µm (Best.-Nr. PL1580-5201)
Gerät	Agilent 1260 Infinity II bioinertes LC-System
Flussrate	0,35 ml/min
Mobile Phase	150 mM Natriumphosphat, pH 7,0
Wellenlänge	280 nm
Säulentemperatur	25 °C
Probe	Vorbehandelter mAb (1 µg in die Säule injiziert). mAb-Probe in 100 mM Natriumbicarbonat pH 9,0 behandelt und über Nacht bei 40 °C inkubiert

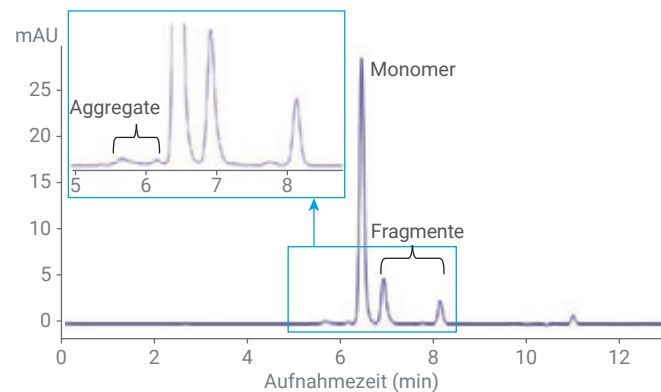


Abbildung 2. Trennung von Aggregaten und Fragmenten in einer vorbehandelten mAb-Probe auf einer AdvanceBio SEC 200 Å 4,6 x 300 mm, 1,9 µm Säule unter den empfohlenen Ausgangsbedingungen.

Optimieren der Chromatographiebedingungen

Überlegen Sie, ob Sie nach der Betrachtung des ersten Chromatogramms folgende Parameter anpassen möchten, und die Trennung zu verbessern oder die Proteinlöslichkeit zu erhalten:

Ionenstärke der mobilen Phase – Die Puffer, die in der Regel für Protokolle verwendet werden, die zusätzliches Salz erfordern, sind u. a.:

- 100 bis 150 mM Natriumchlorid in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0.
- 100 bis 150 mM Natriumsulfat in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0.
- 50 bis 100 mM Harnstoff in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0. Andere ähnliche Salze (z. B. KCl) und Guanidinhydrochlorid können ebenfalls verwendet werden.

pH-Wert – einstellen in Schritten von ± 0,2 Einheiten. Der Stabilitätsbereich von AdvanceBio SEC-Säulen liegt zwischen pH 2,0 und 8,5.

Temperatur – SEC-Trennungen werden in der Regel bei 10 bis 30 °C durchgeführt. Höhere Temperaturen werden u. U. benötigt, um die Auflösung und die Wiederfindung von hydrophoben Peptiden zu verbessern. Die SEC kann in einem Kühlraum durchgeführt werden, um bei temperaturempfindlichen Proteinen die maximale biologische Aktivität zu erhalten. Werden Trennungen bei kälteren Temperaturen vorgenommen, sollte der Druck überwacht und die Flussrate nach Bedarf angepasst werden, um eine Drucküberlastung zu vermeiden. Die maximale Betriebstemperatur von Agilent AdvanceBio SEC-Säulen beträgt 80 °C.

Hinweis: Höhere Temperaturen können zur Denaturierung von Proteinen führen.

Zugabe organischer Lösemittel

- 5 bis 10 % EtOH (oder andere, ähnliche Lösemittel wie Methanol oder CH₃CN) in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0, können bei stark hydrophoben Proteinen sinnvoll sein.
- 5 % DMSO in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0, kann bei Proteinen zugesetzt werden, die einen hohen Gehalt an Cysteinresten aufweisen und zur Oxidation/Aggregation neigen.

Hinweis: Eine Verringerung der Flussrate kann nötig sein, um bei Verwendung von mobilen Phasen mit höherer Viskosität unterhalb des maximalen Betriebsdrucks zu bleiben.

Literaturhinweise

1. Fast Separations for Aggregates and Fragments with AdvanceBio SEC columns - [5994-0873EN](#)
2. Size Exclusion Chromatography Analysis of a Monoclonal Antibody and Antibody Drug Conjugate - [5994-0827EN](#)
3. Agilent AdvanceBio SEC 1.9 µm Column user guide - [5994-0739EN](#)
4. Elevate Your mAb Aggregate Analysis - [5994-2709EN](#)
5. Analysis of Antibody Fragment-Drug Conjugates Using an Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm PEEK-Lined Column - [5994-3045EN](#)
6. Fast, High-Resolution Size Exclusion Chromatography of Aggregates in Biotherapeutics - [5991-6458EN](#)

Erste Schritte mit den Agilent AdvanceBio SEC 200 Å Säulen: Tipps zur Sicherstellung einer optimalen Leistung und Trennung

Überlegungen zu den Proben

- Filtrieren 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 leckagefrei 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.⁴
- Maximieren Sie die Auflösung durch Verwendung des kleinstmöglichen Injektionsvolumens. Empfehlenswert ist ein Probenaufgabevolumen von 1 bis 5 µl, das nicht mehr als 1 % des Säulenvolumens ausmachen sollte.

Faktoren bei der Säulenauswahl

Wählen Sie die richtige Säule für Ihre Proben anhand der folgenden Kriterien:

- Längere Säulen ergeben eine höhere Auflösung – ideal zur Trennung von Monomer und Dimer oder von Monomer und Fragmenten.
- Engere Säulendurchmesser:
 - erfordern kleinere Injektionsvolumina – ideal bei begrenzter Verfügbarkeit der Probe.
 - erfordern niedrigere Flussraten – ideal für effiziente Desolvatation/Ionisierung bei der nativen MS.³
- PEEK-beschichtete Säulen können die Peakform verbessern, indem sie sekundäre Wechselwirkungen der Probe mit Metalloberflächen minimieren – weshalb diese Säulen auch bei Verwendung flüchtiger Puffer für die mobile Phase ideal geeignet sind.⁵
- Liegt der Schwerpunkt auf der Analyse von Aggregaten höherer Ordnung, ermöglichen [AdvanceBio SEC 300 Å, 2,7 µm](#) Säulen eine schnelle und präzise Quantifizierung von mAb-Aggregaten, -Dimeren und -Monomeren mit derselben zuverlässigen Leistung.⁶

Betrieb und Reinigung der Säule

- Passen Sie die Flussrate an den Säuleninnendurchmesser an.³ 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.
 - Arbeitsflussrate³:
 - 4,6 × 150 mm: 0,1 bis 0,7 ml/min.
 - 4,6 × 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/min² 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 µm)). 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.
- 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.

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 % NaN₃ 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 die Säule 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.

Informationen für eine einfache Auswahl und Bestellung

Zum Bestellen der Artikel, die in den nachstehenden 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.
MeineListe Zubehör für die Probenvorbereitung	
Captiva Einwegspritze, 5 ml, 100 St.	9301-6476
Captiva Premium-Spritzenfilter, PES, 15 mm, 0,2 µm, 100 St.	5190-5096
MeineListe Standards	
Agilent NIST-mAb, 4 x 25 µl	5191-5745
Kalibrierungsstandard für 300 Å AdvanceBio SEC-Säule	5190-9417
MeineListe AdvanceBio SEC-Säulen	
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm Vorsäule, 4,6 x 30 mm (empfohlen)	PL1580-1201
AdvanceBio SEC-Säule 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm (empfohlen)	PL1580-5201
AdvanceBio SEC-Säule 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm Vorsäule, 2,1 x 50 mm, PEEK-beschichteter Edelstahl	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC-Säule 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, PEEK-beschichteter Edelstahl	PL1980-3201PK
MeineListe Säulensanschlussfittings und -Anschlüsse	
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
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

Beschreibung	Best.-Nr.
MeineListe Kits für ultraniedrige Dispersion*	
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
MeineListe Probenbehältnisse und Zubehör	
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
MeineListe Lösemittel und Zusätze	
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
MeineListe Zubehör für die Lösemittelfiltration†	
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
MeineListe Zubehör für die Lösemittelhandhabung	
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.

Weitere SEC-Säulen-Lösungen für die Aggregat- und Fragmentanalyse finden Sie hier:

www.agilent.com/chem/aggregates

DE44462.411099537

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Gedruckt in den USA, 11. Oktober 2021
5994-3947DEE