

Análisis de fragmentos y dímeros de anticuerpos monoclonales mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Durante las etapas de desarrollo, almacenamiento, transporte o entrega de fármacos pueden formarse fragmentos de bajo peso molecular (BPM) y dímeros y agregados de alto peso molecular (APM) a partir de las proteínas bioterapéuticas. Estas variantes de tamaño son un atributo de calidad crítico (CQA) que debe caracterizarse correctamente para evitar una respuesta inmunogénica, así como diferencias de farmacocinética y potencia del fármaco. La separación por tamaño mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una técnica estándar que se utiliza para analizar variantes de tamaño y monitorizar el nivel de pureza de productos bioterapéuticos tales como los anticuerpos monoclonales. La SEC se basa exclusivamente en la permeabilidad de las proteínas a través de los poros de la fase estacionaria de la columna, sin ningún tipo de interacción con dicha fase. Por consiguiente, las proteínas globulares y los péptidos se separan según el radio hidrodinámico (tamaño), de tal forma que las proteínas y los agregados de mayor tamaño eluyen primero, seguidos por los fragmentos y los péptidos pequeños.

Factores críticos que influyen en la separación y la resolución de los fragmentos y agregados de anticuerpos monoclonales

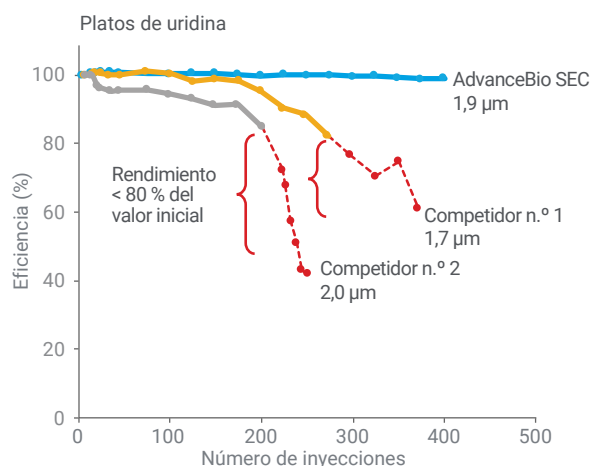
El tamaño de partícula y las características de los poros son importantes factores que mejoran la forma de los picos, la respuesta de pico y la resolución. Se requiere un tamaño de poro adecuado para conseguir una separación eficaz de los agregados o fragmentos de tamaño similar. Los poros grandes consiguen una permeación más eficiente de las biomoléculas en su interior e incrementan la separación de los tiempos de elución entre compuestos. Por otra parte, el volumen de los poros reduce la resistencia del material de relleno, haciéndolo más frágil. Encontrar un equilibrio apropiado entre la resolución y la resistencia mecánica resulta crucial para conseguir la separación deseada con las columnas para SEC.

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. A la hora de seleccionar una columna para SEC, resulta esencial elegir partículas que minimicen las interacciones secundarias.



Motivos para usar columnas AdvanceBio SEC 200 Å de 1,9 µm de Agilent para la separación de fragmentos y agregados de anticuerpos monoclonales

- Las partículas monodispersas de sílice AdvanceBio de 1,9 µm están patentadas y diseñadas para ofrecer la mayor robustez mecánica de su categoría. Esto hace que sean compatibles con los instrumentos de UHPLC y HPLC, y que las columnas tengan una vida útil excelente¹.
- Las características de los poros de las columnas AdvanceBio SEC con partículas de 1,9 µm hacen que sean idóneas para la separación rápida y de alta resolución de fragmentos de proteínas de bajo peso molecular y agregados y dímeros de anticuerpos monoclonales con una única columna².
- La exclusiva fase estacionaria patentada de enlace hidrófilo proporciona una superficie inerte que minimiza la interacción hidrófoba secundaria con ADC y anticuerpos monoclonales.



Columna: 4,6 x 300 mm
Fase móvil: Fosfato de sodio 150 mM, pH = 7,0
Flujo: 0,35 ml/min
Temperatura: Ambiente
Detector: 220 nm
Muestra: Mezcla de proteínas Bio-Rad y uridina (con detención del flujo cada 50 inyecciones)

Figura 1. Las columnas AdvanceBio SEC 200 Å de 1,9 µm mostraron una caída de menos del 2 % en el número de platos tras 400 inyecciones, lo que confirma su excelente estabilidad mecánica.

Condiciones iniciales recomendadas³

Parámetro	Valor
Columna	AdvanceBio SEC 200 Å, 4,6 x 300 mm, 1,9 µm (ref. PL1580-5201)
Instrumento	Sistema LC bioinerte Agilent 1260 Infinity II
Flujo	0,35 ml/min
Fase móvil	Fosfato de sodio 150 mM, pH = 7,0
Longitud de onda	280 nm
Temperatura de la columna	25 °C
Muestra	Anticuerpo monoclonal sometido a condiciones agresivas (1 µg, inyectado en la columna); muestra de anticuerpo monoclonal sometida a condiciones agresivas en bicarbonato de sodio 100 mM (pH = 9,0) e incubada durante la noche a 40 °C

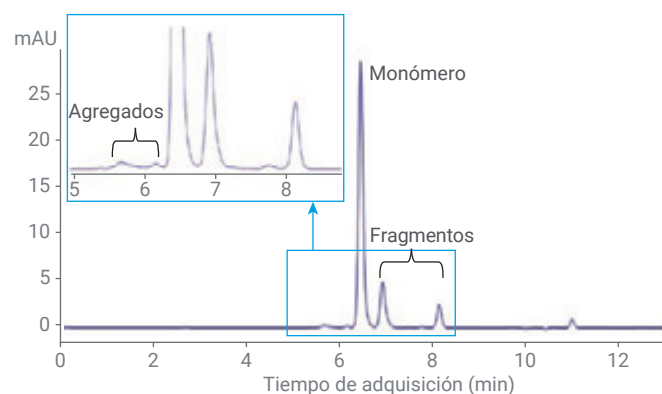


Figura 2. Separación de agregados y fragmentos de una muestra de anticuerpo monoclonal sometida a condiciones agresivas con una columna AdvanceBio SEC 200 Å de 4,6 x 300 mm y 1,9 µm en las condiciones iniciales recomendadas.

Cómo optimizar las condiciones cromatográficas

Considere el ajuste de los siguientes parámetros con el fin de mejorar la separación o mantener la solubilidad de las proteínas después de visualizar el cromatograma inicial:

Fuerza iónica de la fase móvil: los tampones que se suelen utilizar para los protocolos requieren usar sales adicionales; por ejemplo:

- Cloruro sódico 100-150 mM en fosfato sódico 50 mM, pH = 7,0.
- Sulfato sódico 100-150 mM en fosfato sódico 50 mM, pH = 7,0.
- Urea 50-100 mM en fosfato sódico 50 mM, pH = 7,0. También pueden utilizarse otras sales similares (como KCl) y clorhidrato de guanidina.

pH: ajústelo en incrementos de ±0,2 unidades. El rango de estabilidad de las columnas AdvanceBio SEC abarca valores de pH entre 2,0 y 8,5.

Temperatura: las separaciones por SEC suelen realizarse entre 10 y 30 °C. Puede ser necesario aplicar temperaturas más elevadas para mejorar la resolución y la recuperación de los péptidos hidrófobos. La SEC puede realizarse en una sala fría para conservar la máxima actividad biológica de las proteínas sensibles a la temperatura. Para realizar separaciones a temperaturas más bajas, monitorice la presión para evitar las sobrepresiones y ajuste el flujo según sea necesario. La temperatura operativa máxima de las columnas AdvanceBio SEC de Agilent es de 80 °C.

Nota: Las temperaturas más elevadas pueden desnaturar las proteínas.

Disolventes orgánicos como aditivos

- Añadir etanol al 5-10 % (u otros disolventes similares, como metanol o CH₃CN) en fosfato sódico 50 mM (pH = 7,0) puede resultar beneficioso para las proteínas muy hidrófobas.
- También se puede agregar DMSO al 5 % en fosfato de sodio 50 mM (pH = 7,0) para proteínas con un elevado contenido de residuos de cisteína que sean propensas a la oxidación/agregación.

Nota: Podría ser necesario reducir el flujo para evitar alcanzar la presión operativa máxima si se utilizan fases móviles de mayor viscosidad.

Referencias

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](#)

Primeros pasos con las columnas AdvanceBio SEC 200 Å de Agilent: Consejos para garantizar un rendimiento y una separación óptimos

Consideraciones sobre la muestra

- 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 apretadas 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 banda⁴.
- Maximice la resolución usando el mínimo volumen de inyección posible. 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.

Factores para la selección de columnas

Seleccione la columna adecuada para su muestra aplicando los criterios siguientes:

- Las columnas de mayor longitud ofrecen mayor resolución, lo que resulta ideal para la separación entre monómeros y dímeros o entre monómeros y fragmentos.
- Las columnas de diámetro más estrecho:
 - requieren volúmenes de inyección más pequeños, lo que resulta ideal si existen limitaciones en cuanto a la disponibilidad de muestra;
 - requieren flujos más reducidos, lo que resulta ideal para conseguir una desolvatación/ionización eficiente para la MS nativa³.
- Las columnas revestidas con PEEK pueden mejorar la forma del pico gracias a la minimización de las interacciones secundarias de la muestra con superficies metálicas, lo que también hace que estas columnas resulten idóneas cuando se usen fases móviles volátiles tamponadas⁵.
- Si su actividad se centra en el análisis de agregados de orden superior, las columnas [AdvanceBio SEC 300 Å de 2,7 µm](#) proporcionan una cuantificación rápida y exacta de agregados, dímeros y monómeros de anticuerpos monoclonales con un rendimiento y una fiabilidad idénticos⁶.

Funcionamiento y limpieza de las columnas

- Los flujos deben estar en relación con el diámetro interno de la columna³: 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 operativo³:
 - 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 alargarán 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.
- 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.

Almacenamiento de la columna

- Almacenamiento a corto plazo (menos de dos semanas): almacene la columna en la fase móvil utilizada para el análisis.
- Almacenamiento prolongado (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 de la columna 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.

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 consumibles para 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, 4 × 25 µl	5191-5745
Patrón de calibración para columnas AdvanceBio SEC 300 Å	5190-9417
Mi lista de columnas AdvanceBio SEC	
AdvanceBio SEC 200 Å, precolumna de 1,9 µm, 4,6 × 30 mm (recomendada)	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 × 300 mm (recomendada)	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 × 150 mm	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å, precolumna de 1,9 µm, 2,1 × 50 mm, acero inoxidable revestido con PEEK	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 2,1 × 150 mm, acero inoxidable revestido con PEEK	PL1980-3201PK
Mi lista de conexiones y conectores de columna	
Conector de conexión rápida Agilent InfinityLab (para la conexión de entrada de la columna)	5067-5965
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

Descripción	Referencia
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 consumibles 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 de 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 para el 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.

Para conocer soluciones adicionales de columnas para SEC para el análisis de agregados y fragmentos, visite:

www.agilent.com/chem/aggregates

DE44462.411099537

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Impreso en EE. UU., 11 de octubre de 2021
5994-3947ES