

Analyse de fragments de mAb monoclonaux (mAb) et de dimères à l'aide de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les fragments de faible masse moléculaire (LMW) et les dimères et agrégats de haute masse moléculaire (HMW) peuvent se former à partir de protéines biothérapeutiques durant le développement de médicaments, le stockage, l'expédition ou la livraison de médicaments. Ces variations de masse constituent un attribut qualité critique (CQA) qui doit être bien caractérisé afin de prévenir une réponse immunitaire et des différences de pharmacocinétique ou d'efficacité du médicament. La séparation par taille à l'aide de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique standard utilisée pour analyser les variantes de taille et pour suivre le niveau de pureté des produits biothérapeutiques telles que les anticorps monoclonaux (mAb). La SEC est basée uniquement sur la perméabilité des protéines à travers les pores de la phase stationnaire de la colonne et non sur une quelconque interaction avec la phase. Ainsi, les protéines globulaires et les peptides se séparent sur la base du rayon hydrodynamique (taille), les protéines et les agrégats les plus grands étant élués en premier, suivis des fragments et des petits peptides.

Éléments fondamentaux qui influencent la séparation et la résolution de fragments de mAb et d'agrégats

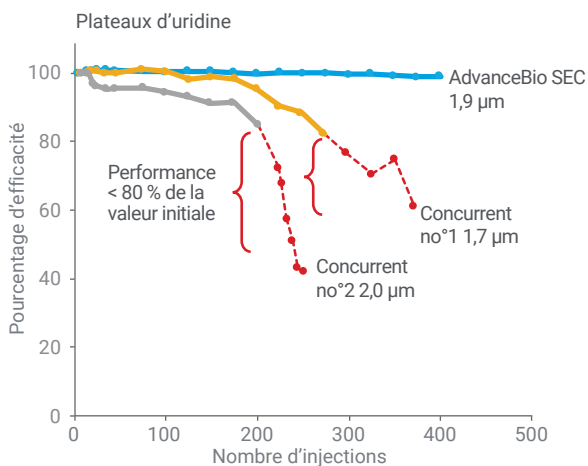
La granulométrie et les caractéristiques des pores sont des facteurs importants qui améliorent la forme de pic, sa sensibilité et la résolution. Une porosité adéquate est nécessaire pour une séparation efficace d'agrégats ou de fragments dont les tailles sont proches. Une porosité plus importante entraîne une perméation plus efficace des biomolécules à l'intérieur des pores et augmente l'étalement du temps d'éluion entre les composés. D'un autre côté, le volume des pores diminue la résistance du matériau de remplissage, ce qui le rend plus fragile. Il est essentiel de trouver le bon équilibre entre la résolution et la résistance mécanique afin d'obtenir la séparation désirée avec les colonnes SEC.

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. Au moment de la sélection d'une colonne SEC, il est essentiel d'avoir une particule qui minimise les interactions secondaires.



Pourquoi utiliser les colonnes AdvanceBio SEC 200 Å 1,9 µm Agilent pour la séparation des fragments de mAb et des agrégats ?

- Les colonnes AdvanceBio 1,9 µm exclusives à particules de silice monodispersées sont conçues pour offrir la meilleure robustesse mécanique de leur catégorie. Elles peuvent donc être utilisées à la fois avec des instruments UHPLC et HPLC, avec une excellente durée de vie de la colonne.¹
- Les colonnes AdvanceBio SEC à particules de 1,9 µm présentent des caractéristiques de pores idéales pour une séparation à haute résolution de fragments de protéine de faible masse moléculaire, d'agrégats de mAb et de dimères avec une seule colonne.²
- La chimie de greffage hydrophile exclusive génère une surface inerte réduisant les interactions hydrophobes secondaires avec les ADC et les mAb.



Colonne : 4,6 x 300 mm
Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0
Débit : 0,35 mL/min
Température : ambiante
Détecteur : 220 nm
Échantillon : mélange de protéines et uridine Bio-Rad (arrêt du débit toutes les 50 injections)

Figure 1. Les colonnes AdvanceBio SEC 200 Å 1,9 µm présentaient moins de 2 % de diminution du nombre de plateaux sur 400 injections, confirmant leur excellente stabilité mécanique.

Recommandation pour les paramètres au démarrage ³

Paramètre	Valeur
Colonne	AdvanceBio SEC 200 Å 4,6 x 300 mm, 1,9 µm (réf. PL1580-5201)
Instrument	LC Agilent 1260 Infinity II bio-inerte
Débit	0,35 mL/min
Phase mobile	phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0
Longueur d'onde	280 nm
Température de colonne	25 °C
Échantillon	Un mAb sous contrainte (1 µg, injecté sur la colonne). Un échantillon de mAb sous contrainte dans du bicarbonate de sodium 100 mM, pH 9,0 et incubé pendant la nuit à 40 °C

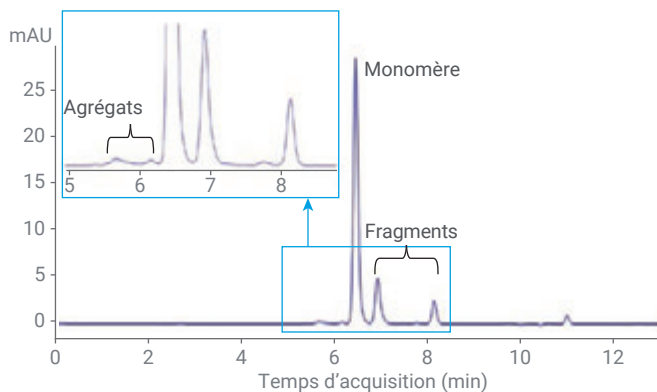


Figure 2. Séparation des agrégats et des fragments dans un échantillon de mAb sous contrainte sur une colonne AdvanceBio SEC 200 Å 4,6 x 300 mm, 1,9 µm selon les recommandations pour les paramètres au démarrage.

Comment optimiser vos conditions chromatographiques

Pensez à ajuster les éléments suivants afin d'améliorer la séparation ou le maintien de la solubilité des protéines après avoir vu le chromatogramme initial :

Force ionique de la phase mobile - Les tampons utilisés couramment pour les protocoles nécessitant un ajout de sel comprennent :

- Chlorure de sodium 100 à 150 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0.
- Sulfate de sodium 100 à 150 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0.
- Urée 50 à 100 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0. D'autres sels similaires (p. ex. KCl) et du chlorhydrate de guanidine peuvent également être utilisés.

pH - ajustement par incréments de ± 0,2 unité. Les colonnes AdvanceBio SEC sont stables dans une gamme de pH allant de 2,0 à 8,5.

Température - Les séparations SEC sont couramment réalisées entre 10 et 30 °C. Des températures plus élevées peuvent être nécessaires afin d'améliorer la résolution et le rendement des peptides hydrophobes. La SEC peut être exécutée dans une chambre froide afin de préserver l'activité biologique maximale des protéines sensibles à la température. Lors de séparations à plus faible température, surveillez la pression afin d'éviter une surpression et ajustez le débit selon les besoins. La température de fonctionnement maximale pour les colonnes Agilent AdvanceBio SEC est de 80 °C.

Remarque : des températures plus élevées peuvent dénaturer les protéines.

Additifs au solvant organique

- 5 à 10 % d'éthanol (ou tout autre solvant similaire comme le méthanol ou le CH₃CN) dans 50 mM de phosphate de sodium, à pH 7,0 peuvent être un atout pour les protéines hautement hydrophobes.
- 5 % de diméthyl sulfoxyde dans 50 mM de phosphate de sodium, à pH 7,0 peuvent être ajoutés pour les protéines ayant une teneur en cystéine élevée et susceptible de s'oxyder/s'agréger.

Remarque : il peut être nécessaire de réduire le débit afin de rester sous la pression maximale de fonctionnement lors de l'utilisation de phases mobiles de viscosité plus élevée.

Références

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](#)

Débuter avec les nouvelles colonnes 200 Å Agilent AdvanceBio SEC : astuces pour obtenir des performances optimales et les meilleures séparations

Considérations relatives aux échantillons

- 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.⁴
- Maximisez la résolution avec un volume d'injection le plus petit possible. 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.

Facteurs de sélection de colonnes

Sélectionner la colonne adéquate pour votre échantillon à l'aide des critères suivants :

- Les colonnes plus longues offrent une résolution plus élevée ; elles sont idéales pour séparer le dimère du monomère ou le monomère des fragments.
- Diamètres de la colonne plus petits :
 - nécessitent des volumes d'injection plus petits, idéal quand la disponibilité des échantillons est limitée ;
 - nécessitent des débits plus faibles, idéal pour une désolvatation/ionisation efficace en MS native.³
- Les colonnes revêtues de PEEK peuvent améliorer la forme de pic en minimisant les interactions secondaires de l'échantillon avec les surfaces métalliques, ce qui rend également ces colonnes idéales lors de l'utilisation de tampons dans une phase mobile volatile.⁵
- Lorsque l'on se concentre sur l'analyse des agrégats d'ordre supérieur, les colonnes [AdvanceBio SEC 300 Å, 2,7 µm](#) offrent une quantification des agrégats de mAb, des dimères et des monomères avec la même performance fiable.⁶

Fonctionnement et nettoyage de la colonne

- Harmonisez les débits avec le diamètre de la colonne³ – 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 opérationnel³ :
 - 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/min² 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.
- 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.

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 NaN₃, 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 de la colonne 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.

Sélection simplifiée et informations pour commander

Pour commander les produits figurant 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
Ma Liste de consommables de préparation d'échantillons	
Seringue jetable Captiva, 5 mL, 100/pqt	9301-6476
Filtre-seringue Agilent Captiva Premium, polyéthersulfone, 15 mm, 0,2 µm, 100/pqt	5190-5096
Ma Liste d'étalons	
Agilent NISTmAb, 4 x 25 µL	5191-5745
Mélange étalon pour AdvanceBio SEC 300 Å	5190-9417
Ma Liste de colonnes AdvanceBio SEC	
Colonne de garde AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 30 mm (recommandé)	PL1580-1201
Colonne AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm (recommandé)	PL1580-5201
Colonne AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3201
Colonne de garde AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm, inox revêtu de PEEK	PL1980-1201PK
Colonne AdvanceBio SEC 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, inox revêtu de PEEK	PL1980-3201PK
Ma Liste de raccords et de connecteurs pour colonnes	
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
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

Description	Référence
Ma Liste de kits ultra-faible dispersion*	
Tube pour kit ultra-faible dispersion pour système LC 1290 Infinity II Agilent	5067-5963
Tube pour kit ultra-faible dispersion pour système LC 1290 Infinity II Bio Agilent	5004-0007
Ma Liste de consommables pour contenants	
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
Ma Liste de solvants et additifs	
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
Ma Liste de consommables de filtration de solvants†	
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
Ma Liste de consommables de manipulation de solvants	
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.

Pour d'autres solutions de colonnes SEC pour l'analyse d'agrégats et de fragments, visitez le site :

www.agilent.com/chem/aggregates

DE44462.411099537

Ces informations sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Imprimé aux États-Unis, le 11 octobre 2021
5994-3947FR