

Analisi di frammenti e dimeri di anticorpi monoclonali (mAb) tramite cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC)

Frammenti a basso peso molecolare (LMW) e dimeri e aggregati ad alto peso molecolare (HMW) possono formarsi a partire da proteine bioterapeutiche durante lo sviluppo, la conservazione, la spedizione o la consegna di farmaci. Queste varianti in termini di dimensioni sono un attributo critico per la qualità (CQA) che deve essere ben caratterizzato per impedire una risposta immunogenica e differenze di farmacocinetica o potenza del farmaco. La separazione in base alle dimensioni mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) è una tecnica standard usata per analizzare le varianti in termini di dimensioni e monitorare il livello di purezza di prodotti bioterapeutici come gli anticorpi monoclonali (mAb). La SEC si basa puramente sulla permeabilità delle proteine attraverso i pori della fase stazionaria della colonna e non su interazioni di qualunque tipo con la fase. In questo modo, i peptidi e le proteine globulari si separano in base al raggio idrodinamico (dimensione): le proteine più grandi e gli aggregati eluiscono per primi, seguiti da frammenti e piccoli peptidi.

Fattori critici che influenzano la separazione e la risoluzione di frammenti e aggregati di mAb

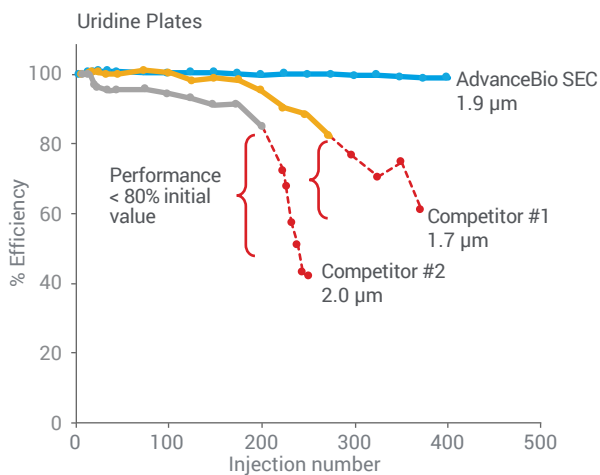
Le dimensioni delle particelle e le caratteristiche dei pori sono fattori importanti che migliorano la forma dei picchi, la sensibilità dei picchi e la risoluzione. Per una separazione efficace di aggregati o frammenti di dimensioni simili è necessaria una giusta dimensione dei pori. Pori più grandi causano una permeazione più efficiente delle biomolecole all'interno dei pori e aumentano il divario del tempo di eluizione tra i diversi composti. D'altra parte, il volume dei pori riduce la forza del materiale di impaccamento rendendolo più fragile. Trovare il giusto equilibrio tra risoluzione e forza meccanica è fondamentale per ottenere la separazione desiderata con le colonne SEC.

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. Quando si sceglie una colonna SEC, è essenziale una particella che riduca al minimo le interazioni secondarie.



Perché usare le colonne Agilent AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, per la separazione di frammenti e aggregati di mAb?

- Le particelle di silice monodispersa brevettate AdvanceBio da 1,9 µm sono progettate per ottenere la robustezza meccanica migliore della categoria. Ciò le rende adatte all'uso sia con gli strumenti UHPLC che HPLC, con un'eccellente durata della colonna.¹
- Le colonne AdvanceBio SEC con particelle da 1,9 µm hanno caratteristiche dei pori ideali per una separazione rapida ad alta risoluzione di frammenti di proteine di peso molecolare inferiore e aggregati e dimeri di mAb, con una sola colonna.²
- L'esclusiva chimica di legame idrofila brevettata offre una superficie inerte, riducendo al minimo l'interazione idrofobica secondaria con gli ADC e gli mAb.



Colonna: 4,6 x 300 mm
Fase mobile: Fosfato di sodio 150 mM, pH 7,0
Flusso: 0,35 mL/min
Temperatura: Ambiente
Rivelatore: 220 nm
Campione: Miscela proteica Bio-Rad e uridina (arresto del flusso ogni 50 iniezioni)

Figura 1. Le colonne AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm hanno presentato una riduzione inferiore al 2% del numero di piatti teorici su 400 iniezioni, confermando l'eccellente stabilità meccanica.

Condizioni iniziali consigliate³

Parametro	Valore
Colonna	AdvanceBio SEC da 200 Å, 4,6 x 300 mm, 1,9 µm (codice PL1580-5201)
Strumento	sistema LC 1260 Infinity II Bio-Inert Agilent
Flusso	0,35 mL/min
Fase mobile	Fosfato di sodio 150 mM, pH 7,0
Lunghezza d'onda	280 nm
Temperatura della colonna	25 °C
Campione	mAb sottoposto a stress (1 µg, iniettato in colonna). Campione di mAb sottoposto a stress in bicarbonato di sodio 100 mM a pH 9,0, incubato per tutta la notte a 40 °C

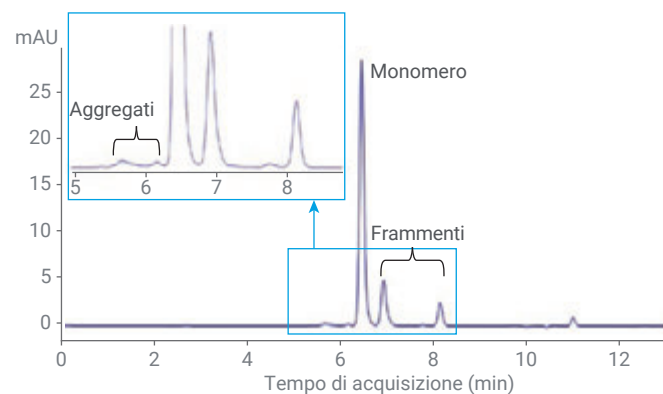


Figura 2. Separazione di aggregati e frammenti in un campione di mAb sottoposto a stress su una colonna AdvanceBio SEC da 200 Å, 4,6 x 300 mm, 1,9 µm nelle condizioni iniziali consigliate.

Come ottimizzare le condizioni cromatografiche

Considerare la regolazione dei valori seguenti per migliorare la separazione o mantenere la solubilità delle proteine dopo aver visualizzato il cromatogramma iniziale:

Forza ionica della fase mobile - I tamponi tipicamente utilizzati per i protocolli che richiedono sale aggiuntivo includono:

- Cloruro di sodio 100-150 mM in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0.
- Solfato di sodio 100-150 mM in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0.
- Urea 50-100 mM in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0. Si possono usare anche altri sali di natura simile (es. KCl) o il cloruro di guanidinio.

pH - Regolare con incrementi di ± 0,2 unità. Le colonne AdvanceBio SEC hanno un intervallo di stabilità compreso tra pH 2,0 e 8,5.

Temperatura - Le separazioni SEC sono generalmente eseguite tra 10 e 30 °C. Temperature più elevate potrebbero essere necessarie per migliorare la risoluzione e il recupero di peptidi idrofobici. La SEC può essere effettuata in camera fredda, per mantenere la massima attività biologica di proteine sensibili alla temperatura. Quando si eseguono separazioni a temperature più basse, monitorare la pressione per evitare pressioni eccessive e regolare il flusso secondo necessità. La massima temperatura operativa delle colonne Agilent AdvanceBio SEC è 80 °C.

Nota: temperature più elevate possono denaturare le proteine.

Aggiunta di solventi organici

- EtOH (o altri solventi simili, come MeOH o CH₃CN) al 5-10% in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0 può essere utile per le proteine altamente idrofobiche.
- DMSO al 5% in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0 può essere aggiunto per proteine contenenti quantità elevate di residui di cisteina sensibili all'ossidazione/aggregazione.

Nota: quando si usano fasi mobili a elevata viscosità potrebbe essere necessario ridurre il flusso per mantenere il sistema al di sotto della pressione massima operativa.

Bibliografia

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](#)

Guida introduttiva alle colonne Agilent AdvanceBio SEC da 200 Å: suggerimenti per assicurarti prestazioni e separazioni ottimali

Considerazioni sui campioni

- 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.⁴
- Massimizzare la risoluzione con il volume di iniezione più basso possibile. 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.

Fattori per la scelta della colonna

Scegli la colonna giusta per i tuoi campioni usando i seguenti criteri:

- Colonne più lunghe determinano una risoluzione maggiore: ideali per separare monomeri da dimeri o monomeri da frammenti.
- Diametri della colonna più stretti:
 - richiedono volumi di iniezione inferiori, ideali quando la disponibilità di campione è limitata.
 - richiedono flussi inferiori; ideali per la desolvatazione/ionizzazione efficiente in native MS.³
- Le colonne rivestite in PEEK possono migliorare la forma dei picchi riducendo al minimo le interazioni secondarie del campione con le superfici metalliche, il che rende anche queste colonne ideali quando si usano tamponi volatili per la fase mobile.⁵
- Considerando l'analisi di aggregati di ordine superiore, le colonne [AdvanceBio SEC da 300 Å, 2,7 µm](#) forniscono una quantificazione rapida e accurata di aggregati, dimeri e monomeri di mAb mantenendo le stesse prestazioni affidabili.⁶

Utilizzo e pulizia delle colonne

- Allineare i flussi con il diametro interno della colonna³: 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 operativo³:
 - 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/min² 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.
- 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.

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 NaN₃ 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 o a metanolo al 20%, il lavaggio della colonna 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.

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
Il mio elenco di prodotti di consumo per la preparazione del campione	
Siringa monouso Captiva, 5 mL, 100/conf.	9301-6476
Filtro per siringa Captiva Premium, PES, 15 mm, 0,2 µm, 100/conf.	5190-5096
Il mio elenco di standard	
Agilent-NISTmAb, 4 x 25 µL	5191-5745
Standard di calibrazione AdvanceBio SEC da 300 Å	5190-9417
Il mio elenco di colonne AdvanceBio SEC	
Precolonna AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 30 mm (consigliata)	PL1580-1201
AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 300 mm (consigliata)	PL1580-5201
AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 4,6 x 150 mm	PL1580-3201
Precolonna AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 50 mm, acciaio inossidabile rivestito in PEEK	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC da 200 Å, 1,9 µm, 2,1 x 150 mm, acciaio inossidabile rivestito in PEEK	PL1980-3201PK
Il mio elenco di raccordi e connettori per colonne	
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
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

Descrizione	Codice
Il mio elenco di kit a dispersione ultra-bassa*	
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
Il mio elenco di prodotti di consumo per contenitori per campioni	
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
Inserito 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
Il mio elenco di solventi e additivi	
Acqua ultra pura per LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4498
MeOH ultra puro per LC/MS InfinityLab, 1L (per la conservazione delle colonne)	5191-4497
Acido formico, 5 mL	G2453-85060
Il mio elenco di prodotti di consumo per la filtrazione del solvente†	
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
Il mio elenco di prodotti di consumo per la manipolazione del solvente	
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.

Per ulteriori soluzioni con colonne SEC per l'analisi di aggregati e frammenti, visita la pagina

www.agilent.com/chem/aggregates

DE44462.411099537

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Stampato negli Stati Uniti l'11 ottobre 2021
5994-3947ITE