

## Análisis de variantes de carga de anticuerpos monoclonales por cromatografía de intercambio catiónico débil (WCX)

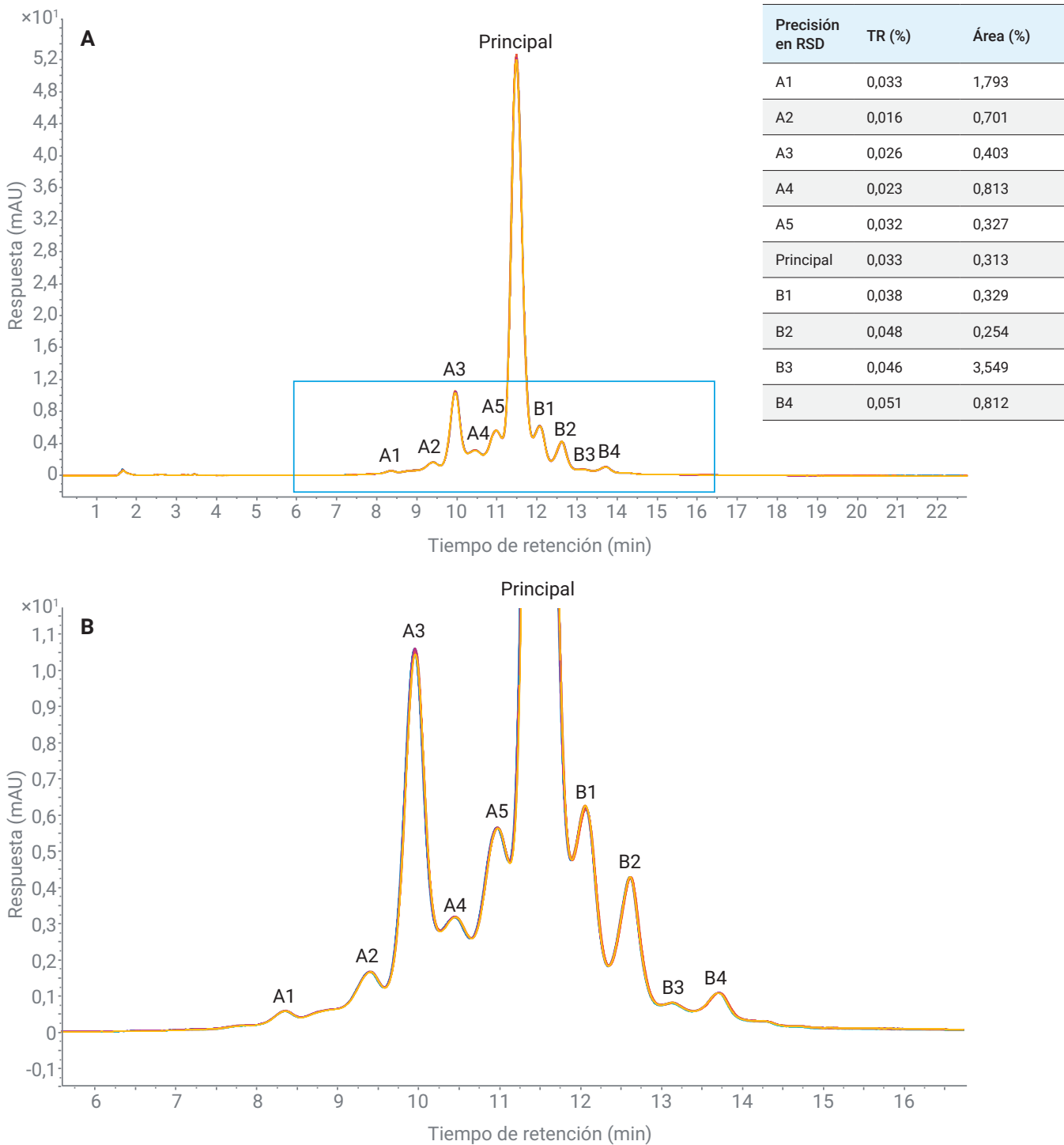


Los anticuerpos monoclonales (mAb) son importantes productos bioterapéuticos, fabricados por la mayoría de las principales empresas farmacéuticas. Los anticuerpos monoclonales suelen tener una masa de unos 150.000 Da y presentan diversas modificaciones que incrementan la complejidad de esta clase de macromoléculas. Se pueden producir modificaciones durante la producción de la proteína o la fabricación y el almacenamiento de los productos. Las modificaciones, como el truncamiento del extremo C, la desamidación, los cambios en la glicosilación y la eliminación o sustitución de aminoácidos, afectan a la carga total de los anticuerpos monoclonales y se consideran variantes de carga. Las variantes de carga se suelen monitorizar mediante cromatografía de intercambio iónico<sup>1,2</sup>. La monitorización de los atributos de calidad críticos (CQA) como las variantes de carga resulta esencial para garantizar que la eficacia, la seguridad y la inmunogenicidad del producto final no se vean afectadas. Los organismos gubernamentales, como la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA), exigen datos de variantes de carga a la hora de presentar una solicitud de licencia para productos biológicos.

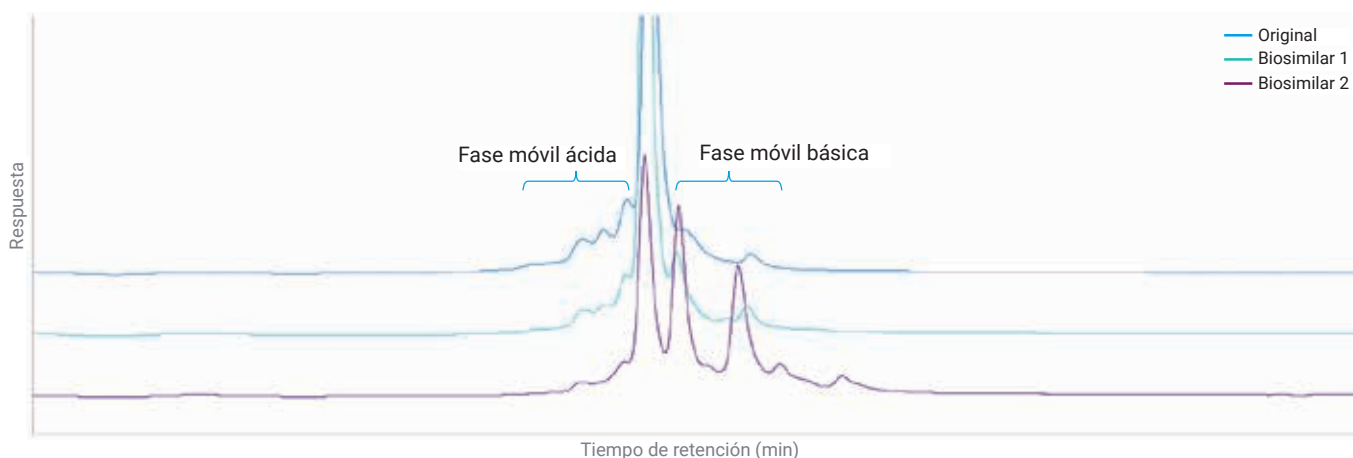
A pesar de que el análisis de variantes de carga es una técnica consolidada, este ensayo sigue planteando dificultades. Los tampones habituales suelen tener elevadas concentraciones salinas y pueden resultar corrosivos para los componentes convencionales de acero inoxidable de los sistemas y las columnas de cromatografía de líquidos. El uso de un sistema biocompatible o bioinerte, como el sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II o el sistema bioinerte Agilent 1260 Infinity II, contribuye a resolver este problema. La ruta de flujo está completamente libre de hierro y acero inoxidable. Todos los conectores y capilares están en aleación MP35N, lo cual reduce la corrosión. Además, esto evita que se produzcan reacciones asociadas a la corrosión, como oxidación. El sistema de LC Bio 1290 Infinity II está disponible con una bomba binaria que es idónea para obtener gradientes exactos y precisos, sobre todo en el caso de los gradientes suaves que se utilizan habitualmente en los análisis de variantes de carga. La bomba cuaternaria opcional también resulta útil para probar diferentes tampones para el análisis de variantes de carga, una tarea que resulta sencilla gracias al software Agilent Buffer Advisor.

La columna de intercambio catiónico débil Agilent Bio MAb está diseñada específicamente para caracterizar la heterogeneidad de carga de los anticuerpos monoclonales<sup>3</sup>. Está disponible con estructura de PEEK, que permite mantener una ruta de flujo libre de hierro en todo el sistema de LC Bio 1290 Infinity II, un aspecto esencial para obtener resultados altamente reproducibles (Figura 1)<sup>4</sup>.

Además, la propia columna está diseñada específicamente para separaciones de anticuerpos monoclonales y tiene una capa de intercambio catiónico débil muy densa y uniforme que está unida al recubrimiento polimérico hidrófilo, lo que permite eliminar las interacciones no específicas y hace que sea idónea para estudios de comparabilidad de biosimilares (Figura 2)<sup>5</sup>.



**Figura 1.** Variantes ácidas y básicas del trastuzumab. Se realizaron siete análisis consecutivos en los que se obtuvieron resultados altamente reproducibles de tiempo de retención y área de pico.



**Figura 2.** Comparación de variantes de carga entre el rituximab y dos biosimilares.

### Prácticas recomendadas para la optimización de las condiciones cromatográficas

Hay dos parámetros cuya determinación resulta esencial para obtener la resolución deseada y permitir una separación óptima de las variantes de carga: el pH óptimo de la fase móvil y la pendiente óptima del gradiente. Ambos factores afectan en gran medida a la separación. En la Tabla 1 se proponen los parámetros iniciales para la optimización.

	Gradiente salino	Gradiente de pH
Parámetro	Valor	Valor
Columna	Bio MAb, NP5, 2,1 × 250 mm, PEEK (número de referencia 5190-2411)	Bio MAb, NP5, 2,1 × 250 mm, PEEK (número de referencia 5190-2411)
Sistema de LC recomendado	Sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II con bomba de alta velocidad	Sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II con bomba (cuaternaria) flexible
Fase móvil	A: tampón de fosfato 30 mM, pH = 6,8 B: tampón de fosfato 30 mM (pH = 6,8) y NaCl 500 mM	A: Agua B: NaCl 1,6 M C: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM D: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM
Gradiente	NaCl 0-100 mM (0-30 minutos) 100-500 mM (30-31 minutos): 500 mM, isocrático (31-35 minutos) 15 minutos de tiempo posterior	pH de 6,0 a 8,0 (0-20 minutos) NaCl de 0 a 800 mM (20-25 minutos) NaCl 800 mM (25-30 minutos)
Flujo	0,25 ml/min	0,25 ml/min
Volumen de inyección	1-5 µl	1-5 µl
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Detección	280 nm	280 nm

**Tabla 1.** Condiciones iniciales recomendadas.

### Consideraciones sobre la fase móvil

- La fase móvil debe contener un tampón (con una concentración típica de 20-30 mM) para mantener el pH operativo deseado y una carga uniforme.
- El uso de tampones de fosfato es muy habitual en el intervalo de pH de 6 a 7. El acetato, el tris y los tampones que contienen MES también son compatibles, así como el acetonitrilo y el metanol. Las muestras de anticuerpos monoclonales deben ser solubles en la fase móvil.
- Asimismo, es necesario añadir un ion competidor para eluir el anticuerpo monoclonal de la columna, lo que se suele conseguir con cloruro sódico en concentraciones de 100 a 500 mM.
- La adición de cloruro sódico modificará el pH de la fase móvil, por lo que habrá que reajustarlo.
- Para obtener unos resultados óptimos, los tampones deben estar recién preparados y almacenarse en un refrigerador, salvo que se utilicen de forma activa, ya que es habitual que en los tampones diluidos se produzca crecimiento bacteriano. Otra práctica recomendada es filtrar los tampones para evitar la obstrucción de la columna.

### Consideraciones sobre el tampón del gradiente de pH

- Aunque los gradientes salinos son más habituales en la cromatografía de intercambio iónico, los gradientes de pH son un método alternativo<sup>6,7</sup> que puede incrementar la resolución. La columna Bio MAb es estable en un intervalo de pH de 2 a 12.
- Los gradientes de pH para anticuerpos monoclonales suelen comenzar con un valor de pH de 6 y alcanzar valores de 7-8; además, requieren un paso de limpieza/ equilibrado de la columna con cloruro sódico.
- El fosfato monosódico y el fosfato disódico son tampones de elución habituales.

### Consideraciones generales sobre la fase móvil para la proteína

- En el caso de la cromatografía de intercambio catiónico, el pH del tampón inicial deberá ser entre 0,5 y 1 unidades de pH inferior al potencial de ionización (pI) de la proteína.
- Un valor de pH de 6 es un buen punto de partida si se desconoce el pI de la proteína.

### Dimensiones de la columna

- El diámetro interno (d.i.) de la columna se debe seleccionar en función de la cantidad de anticuerpo monoclonal que se vaya a analizar. Como norma general, el volumen inyectado no debe ser superior al 1-2 % del volumen total de la columna. Por ejemplo, el valor ideal de inyección para una columna de 2,1 × 50 mm sería de 1,7 µl como máximo, mientras que en una columna de 4,6 × 50 mm se podría utilizar una inyección de 8,3 µl. Si elige una columna de 2,1 mm de d.i., deberá realizar las conexiones del sistema de LC de tal forma que se minimice la dispersión.

- Una columna más larga (por ejemplo, de 250 mm) permitirá obtener una resolución mayor, mientras que una columna más corta (por ejemplo, de 50 mm) puede contribuir a reducir el tiempo de análisis.

### Tamaño de partícula

- Por lo general, los tamaños de partícula pequeños consiguen que la separación sea más eficiente, pero conllevan presiones operativas más elevadas.
- Las biomoléculas grandes, como los anticuerpos monoclonales, tienen una velocidad de difusión más lenta; por lo tanto, el tamaño de partícula no tiene un efecto excesivamente grande sobre la resolución.
- Los eluyentes con tampones acuosos son relativamente viscosos y pueden producir un aumento de la retropresión.
- Los tamaños de partícula y las retropresiones máximas de las columnas Bio MAb son los siguientes:
  - 1,7 µm: 689 bar
  - 3 µm: 551 bar
  - 5 µm: 413 bar
  - 10 µm: 275 bar
- Otro aspecto que hay que considerar es que la estructura de PEEK tiene un límite de presión de 400 bar y solo está disponible para los tamaños de partícula de 5 y 10 µm. Los gradientes salinos pueden corroer el acero inoxidable; por consiguiente, combinar el uso de columnas de PEEK con un sistema de LC bioinerte o biocompatible mantendrá la robustez del sistema.

### Vida útil de la columna y reproducibilidad

- Los flujos varían entre 0,1 y 1,0 ml/min. Las columnas de 2,1 mm de d.i. funcionan habitualmente con flujos de 0,2-0,4 ml/min, mientras que en las columnas de 4,6 mm de d.i. se suelen utilizar flujos de 0,5-1,0 ml/min. Se debe monitorizar la retropresión; asimismo, para garantizar que no se supere el límite de presión operativa de la columna, las rampas iniciales de flujo deben ser suaves.
- Las columnas Bio MAb pueden soportar hasta 80 °C. No obstante, a fin de alargar su vida útil, se recomienda que funcionen de forma habitual entre 10-50 °C.
- Con el fin de optimizar la reproducibilidad, deben utilizarse 5-10 volúmenes de columna para el paso de equilibrado/ limpieza asociado al gradiente.
- Valore utilizar una precolumna para prolongar la vida útil de la columna analítica.
- Para períodos largos de almacenamiento de la columna, lávela con al menos 15 volúmenes de columna y consévela en tampón de fosfato 20 mM con azida sódica al 0,1 % y un valor de pH de 6.
- Las columnas que utilizan estructuras de PEEK deben conectarse con acoplamientos de PEEK (n.º ref. 5042-8957)

## Selección sencilla e información para pedidos

Para encargar los artículos que se indican en las tablas que aparecen a continuación en la tienda en línea de Agilent, añada los artículos a la lista de Productos favoritos haciendo clic en los enlaces de cada encabezado de Mi lista n.º.

A continuación, introduzca las cantidades que necesita de cada producto, pulse Añadir a la cesta y proceda al pago. Su lista permanecerá guardada en Productos favoritos para que pueda usarla en futuros pedidos.

Si es la primera vez que utiliza 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. En cambio, si no tiene una cuenta registrada de Agilent, deberá registrarse para hacerse una. Esta función solo es válida en las regiones que tengan habilitado el comercio electrónico. Todos los artículos se pueden pedir también a través de sus canales habituales de venta y distribución.

## Mi lista 1: Columnas Bio MAb para el análisis de variantes de carga

Descripción	Referencia
Agilent Bio MAb, NP5, 2,1 × 50 mm, PEEK	<a href="#">5190-2412</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 2,1 × 250 mm, PEEK	<a href="#">5190-2411</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 × 50 mm, PEEK	<a href="#">5190-2408</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 × 250 mm, PEEK	<a href="#">5190-2407</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 2,1 × 50 mm, PEEK	<a href="#">5190-2420</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 2,1 × 250 mm, PEEK	<a href="#">5190-2419</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 × 50 mm, PEEK	<a href="#">5190-2416</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 × 250 mm, PEEK	<a href="#">5190-2415</a>
Agilent Bio MAb, NP1.7, 4 × 10 mm, precolumna	<a href="#">5190-2402</a>
Agilent Bio MAb, NP3, 4 × 10 mm, precolumna	<a href="#">5190-2404</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 4 × 10 mm, precolumna	<a href="#">5190-2406</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 4 × 10 mm, precolumna	<a href="#">5190-2414</a>
Agilent Bio MAb, NP1.7, 4,6 × 50 mm	<a href="#">5190-2401</a>
Agilent Bio MAb, NP3, 4,6 × 50 mm	<a href="#">5190-2403</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 × 250 mm	<a href="#">5190-2405</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 × 250 mm	<a href="#">5190-2413</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 10 × 250 mm	<a href="#">5190-6884</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 21,2 × 250 mm	<a href="#">5190-6885</a>

## Mi lista 2: Patrones

Descripción	Referencia
Agilent NIST mAb, 25 µl	<a href="#">5191-5744</a>
Agilent NIST mAb, 4 × 25 µl	<a href="#">5191-5745</a>

### Mi lista 3: Consumibles y disolventes

Descripción	Referencia
<b>Tubos y conexiones</b>	
Conector Swagelok, de policetona, para estructuras de PEEK, 10/paq.	5042-8957
Conector de conexión rápida InfinityLab para LC, solo para estructuras de acero inoxidable	5067-5965
Conector de giro rápido Agilent InfinityLab (para la conexión de la salida de la columna, solo para estructuras de acero inoxidable)	5067-5966
Capilar de giro rápido MP35N 0,12 x 200 mm, solo para estructuras de acero inoxidable	5500-1595
Unión de conector biocompatible, MP35N, rosca 10-32, cónica, sin volumen muerto	5023-2625
Capilar de giro rápido MP35N 0,12 x 280 mm, solo para estructuras de acero inoxidable	5500-1596
Herramienta de montaje para conectores de giro rápido	5043-0915
Kit de válvula de seguridad en línea (para su uso con otro detector si se emplea en serie después de la celda de flujo de fluorescencia)	G4212-68001
Válvula selectora de 6 columnas, analítica, biocompatible, sistema de LC Bio 1290 Infinity II	5320-0025
Válvula bioinerte de intercambio rápido de 2 posiciones y 10 puertos, 1.300 bar, incluye cabeza de válvula bioinerte de intercambio rápido.	5067-6682
Kit de tubos de dispersión ultrabaja para el sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II	5004-0007
Kit capilar para válvula de conmutación de 2 posiciones y 10 puertos, biocompatible	5013-0002
Kit capilar para válvula selectora de 6 columnas. Biocompatible, 0,12 mm de d.i., sistema de LC Bio 1290 Infinity II	5005-0070
<b>Recipientes para muestras</b>	
Vial de alta recuperación, tapón de rosca, inserto fijo, transparente, volumen de inserto de 300 µl, 100/paq. Tamaño del vial: 12 x 32 mm (tapón de 12 mm)	5188-6591
Tapón de rosca, azul, séptum de PTFE/silicona roja, 100/paq. Tamaño del tapón: 12 mm	5182-0717
Vial, de encapsulado/sellado a presión, de polipropileno, certificado, 250 µl, 1.000/paq. Tamaño del vial: 12 x 32 mm (tapón de 11 mm)	9301-0978
Tapón a presión, transparente, séptum de PTFE/silicona/PTFE, 100/paq. Tamaño del tapón: 11 mm (para 5190-3155)	5182-0566
Placa de 96 pocillos InfinityLab, 0,5 ml, 30/paq.	5043-9310
Almohadilla de sellado para placa de 96 pocillos InfinityLab, 50/paq.	5042-1389
<b>Disolventes y aditivos</b>	
Agua ultrapura InfinityLab para LC/MS, 1 l	5191-4498
<b>Filtración de disolventes</b>	
Dispositivo de filtración de disolventes InfinityLab	5191-6776
Matraz de filtración de disolventes InfinityLab, vidrio, 2 l	5191-6781
Membrana de filtro, 47 mm, de nylon, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4341
Membrana de filtro, 47 mm, de 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

Descripción	Referencia
<b>Manipulación de disolventes</b>	
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
Depósito de residuos InfinityLab, GL45, 6 l con tapa Stay Safe	5043-1221
Filtro de carbón InfinityLab con lector de tiempo, 58 g	5043-1193
Kit de inicio Stay Safe y botella de purga, incluye botella de purga con tapa InfinityLab Stay Safe (n.º ref. 5043-1339) y kit de inicio de tapas Stay Safe (n.º ref. 5043-1222)	5043-1340
Kit de inicio de tapas InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Botella de purga InfinityLab Stay Safe	5043-1339

### Referencias:

1. Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography  
[5991-5273EN](#)
2. Charge Variant Analysis, Application Compendium  
[5994-2074](#)
3. Analysis of Intact and C-terminal Digested IgG1 on an Agilent Bio MAb 5 µm Column  
[5991-0895EN](#)
4. ¿Qué nivel de superficialidad se puede alcanzar? Perfeccionamiento del análisis de variantes con carga de anticuerpos monoclonales (mAb) con el sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II  
[5994-2692ES](#)
5. Charge Variant and Aggregation Analysis of Innovator and Biosimilars of Rituximab  
[5994-1496EN](#)
6. pH Gradient Elution for Improved Separation of Monoclonal Antibody Charge Variants  
[5990-9629EN](#)
7. High-resolution Analysis of Charge Heterogeneity in Monoclonal Antibodies Using pH-gradient Cation Exchange Chromatography  
[5991-1407EN](#)

Más información:

[www.agilent.com/chem/advancebio](http://www.agilent.com/chem/advancebio)

Encuentre un centro de atención al cliente de  
Agilent en su país:

[www.agilent.com/chem/contactus](http://www.agilent.com/chem/contactus)

España

901 11 68 90

[customercare\\_spain@agilent.com](mailto:customercare_spain@agilent.com)

Europa

[info\\_agilent@agilent.com](mailto:info_agilent@agilent.com)

Asia-Pacífico

[inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:inquiry_lsca@agilent.com)

DE99980273

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Impreso en EE. UU., 9 de febrero de 2024  
5994-6053ES