

## Analisi di varianti di carica di mAb mediante cromatografia a scambio cationico debole (WCX)

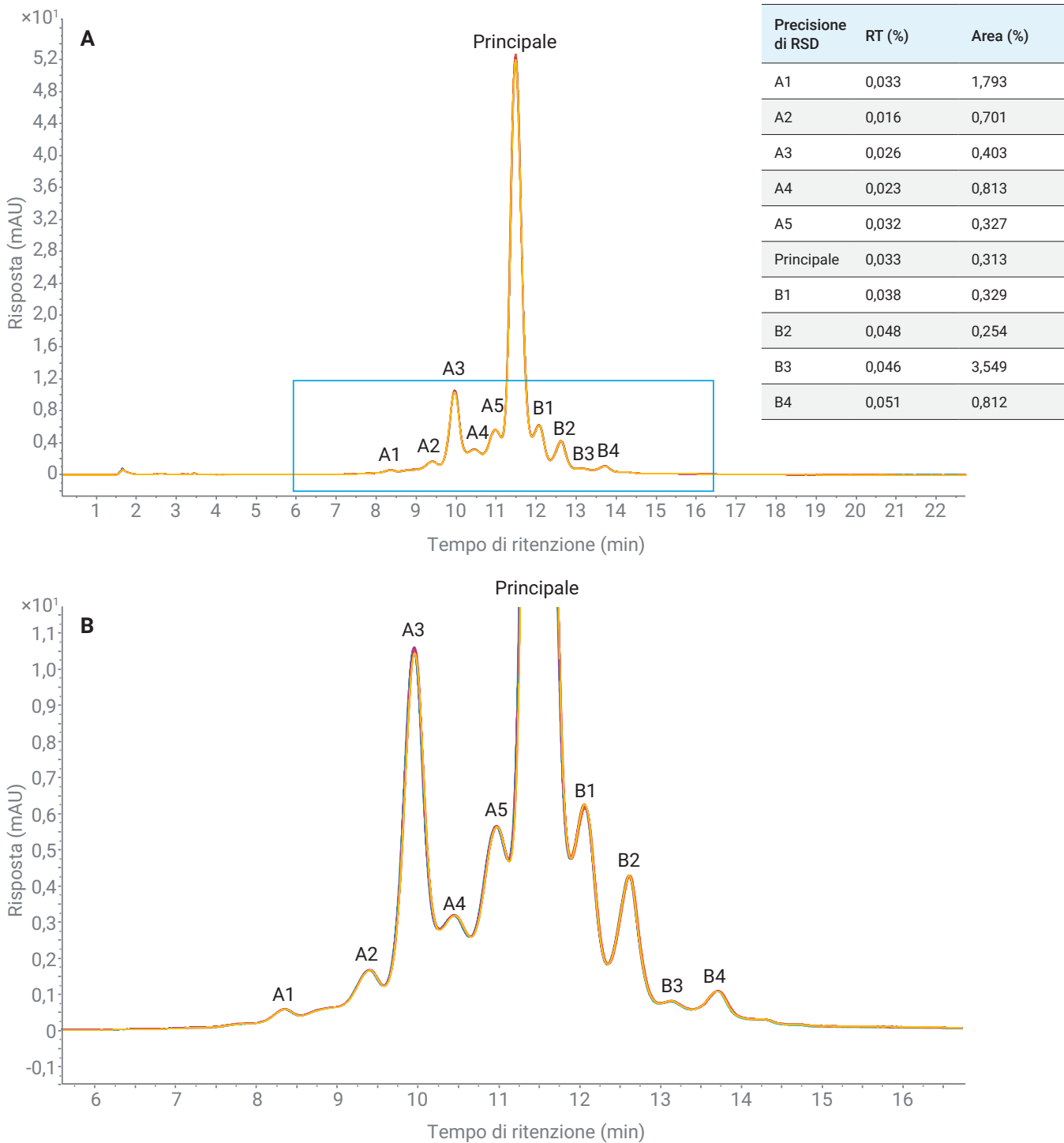


Gli anticorpi monoclonali (mAb, monoclonal antibodies) sono un importante farmaco bioterapeutico prodotto dalla maggior parte delle principali aziende farmaceutiche. Gli mAb hanno una misura di circa 150.000 Dalton e presentano svariate modificazioni che aumentano la complessità di questa classe di macromolecole. Le modificazioni possono verificarsi quando la proteina viene prodotta o quando gli anticorpi monoclonali vengono fabbricati e immagazzinati. Modificazioni come troncamento del terminale C, deamidazione, variazioni della glicosilazione e delezione o sostituzione di amminoacidi hanno effetto sulla carica complessiva di un mAb e sono considerate varianti di carica. Le varianti di carica vengono tipicamente monitorate tramite cromatografia a scambio ionico.<sup>1,2</sup> Il monitoraggio di attributi critici per la qualità (CQA, critical quality attributes) come le varianti di carica è essenziale per garantire che l'efficacia, la sicurezza e l'immunogenicità del prodotto finale non siano compromesse. Agenzie governative come la U.S. Food and Drug Administration (FDA) richiedono dati sulle varianti di carica quando viene presentata una domanda di licenza per prodotti biologici (Biologics License Application).

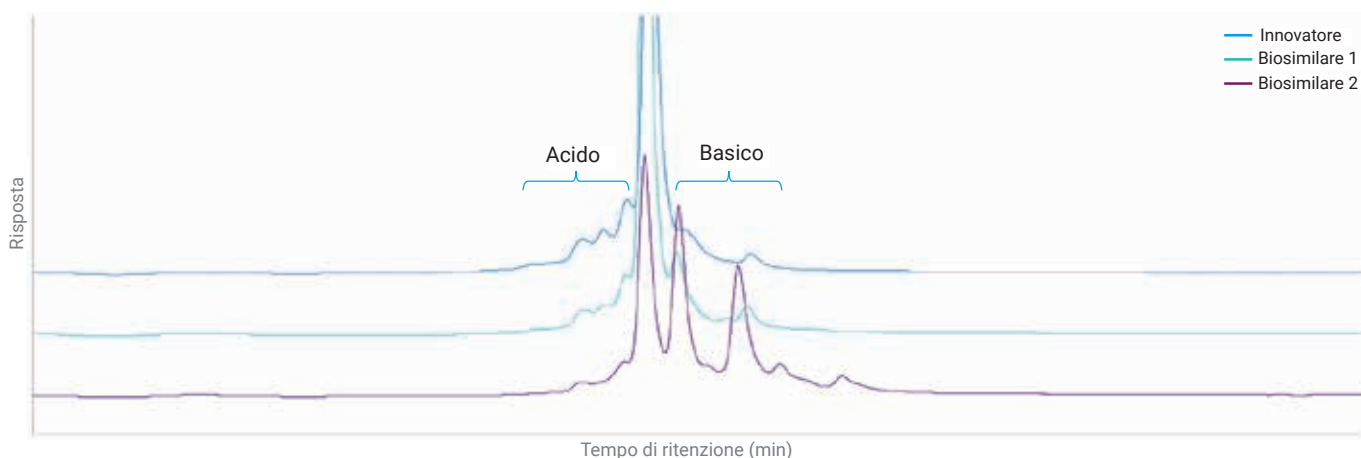
Sebbene l'analisi di varianti di carica sia una tecnica consolidata, rimangono delle difficoltà per questo tipo di analisi. I tamponi che vengono frequentemente utilizzati presentano un'elevata concentrazione di sali e possono essere corrosivi per la tradizionale strumentazione in acciaio inossidabile dei sistemi e delle colonne per cromatografia liquida. L'uso di un sistema bio-compatibile o bio-inerte, come il sistema LC Agilent 1290 Infinity II Bio o il sistema Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert, attenua questo problema. Il percorso di flusso è completamente privo di ferro e di acciaio inossidabile. Tutti i raccordi e i capillari sono costituiti da una lega, MP35N, quindi la corrosione risulta ridotta. Ciò impedisce inoltre che si verifichino reazioni dovute alla corrosione, come l'ossidazione. Il sistema LC 1290 Infinity II Bio è disponibile come pompa binaria, il che è ideale per generare gradienti precisi e accurati, specialmente in caso di gradienti poco pronunciati che sono tipici delle analisi di varianti di carica. Anche l'opzione con pompa quaternaria è utile per l'analisi delle varianti di carica per testare differenti condizioni dei tamponi, il che è reso più semplice grazie al software Agilent Buffer Advisor.

La colonna Agilent Bio MAb è una colonna a scambio cationico debole progettata specificamente per la caratterizzazione dell'eterogeneità di carica degli anticorpi monoclonali.<sup>3</sup> È disponibile con hardware in PEEK, che mantiene un percorso di flusso privo di ferro attraverso il sistema LC 1290 Infinity II Bio, il che è essenziale per ottenere risultati altamente riproducibili (Figura 1).<sup>4</sup>

La colonna in sé, inoltre, è stata progettata specificamente per separazioni di mAb e presenta uno strato di scambio cationico debole extra denso e altamente uniforme legato al rivestimento polimerico idrofilico che è progettato per eliminare le interazioni non specifiche, il che rende la colonna ideale per studi di comparabilità tra biosimilari (Figura 2).<sup>5</sup>



**Figura 1.** Varianti acide e basiche di trastuzumab. Sette cicli successivi forniscono risultati altamente riproducibili in termini di tempo di ritenzione e area dei picchi.



**Figura 2.** Confronto di varianti di carica tra rituximab e due prodotti biosimilari.

### Migliori pratiche per ottimizzare le condizioni di cromatografia

Due parametri sono essenziali per ottenere la risoluzione desiderata e permettere una separazione ottimale delle varianti di carica: determinare il pH ottimale della fase mobile nonché la pendenza ottimale del gradiente. Entrambi i fattori possono influenzare in modo importante la separazione. La Tabella 1 suggerisce i parametri da cui iniziare l'ottimizzazione.

	Gradiente salino	Gradiente di pH
Parametro	Valore	Valore
Colonna	Bio MAb, NP5, 2,1 x 250 mm, PEEK (codice 5190-2411)	Bio MAb, NP5, 2,1 x 250 mm, PEEK (codice 5190-2411)
Sistema LC consigliato	Agilent LC 1290 Infinity II Bio con pompa high speed	Agilent LC 1290 Infinity II Bio con pompa Flex (quaternaria)
Fase mobile	A: Tampone fosfato 30 mM, pH 6,8 B: Tampone fosfato 30 mM, pH 6,8, NaCl 500 mM	A: Acqua 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 dal minuto 0 al minuto 30; 100-500 mM dal minuto 30 al minuto 31; Isocratico 500 mM dal minuto 31 al minuto 35 Tempo post analisi 15 minuti	pH da 6,0 a 8,0, dal minuto 0 al minuto 20 NaCl da 0 a 800 mM, dal minuto 20 al minuto 25 NaCl 800 mM, dal minuto 25 al minuto 30
Flusso	0,25 mL/min	0,25 mL/min
Volume di iniezione	1-5 µL	1-5 µL
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Rivelazione	280 nm	280 nm

**Tabella 1.** Condizioni iniziali suggerite

### Considerazioni sulla fase mobile

- La fase mobile deve contenere il tampone per mantenere il pH di funzionamento desiderato come anche una carica uniforme, la concentrazione è tipicamente 20-30 mM.
- I tamponi fosfati sono molto comuni nell'intervallo di pH tra 6 e 7. Altri tamponi compatibili includono acetato, Tris e tamponi contenenti MES, come anche acetonitrile e metanolo. I campioni di mAb devono essere solubili nella fase mobile.
- Occorre introdurre uno ione competitivo per eluire l'mAb dalla colonna, il che viene tipicamente effettuato con cloruro di sodio tra 100 mM e 500 mM.
- L'aggiunta di cloruro di sodio altera il pH della fase mobile, quindi sarà necessario regolare nuovamente il pH.
- Per ottenere risultati ottimali, i tamponi devono essere preparati ex novo e conservati nel frigorifero se non vengano usati attivamente, in quanto nelle soluzioni tampone si verifica tipicamente crescita batterica. Si raccomanda inoltre di filtrare i tamponi per evitare ostruzioni nella colonna.

### Considerazioni sui gradienti di pH per il tampone

- Benché i gradienti salini siano più usuali nella cromatografia a scambio ionico, i gradienti di pH rappresentano un metodo alternativo<sup>6,7</sup> che può dare come risultato una maggiore risoluzione. La colonna Bio MAb è stabile per pH tra 2 e 12.
- Il gradiente di pH per mAb tipicamente inizia a pH 6 e presenta un aumento fino a pH 7-8, seguito da una fase di pulizia/equilibrio della colonna con il sale cloruro di sodio.
- Il sodio fosfato monobasico monoidrato e il sodio fosfato dibasico diidrato sono tipici tamponi di eluizione.

### Considerazioni generali sulla fase mobile di proteine

- Il pH del tampone iniziale deve essere di 0,5-1 unità di pH al di sotto del pI delle proteine per la cromatografia a scambio cationico.
- pH 6 è un buon punto di partenza se il pI della proteina non è noto.

### Dimensioni delle colonne

- Il diametro interno (d.i.) della colonna deve essere scelto in base alla quantità di mAb che viene analizzata. Una linea guida generale è che il volume iniettato non deve superare per più di 1-2% il volume dell'intera colonna. Per esempio, in una colonna di 2,1 x 50 mm il volume iniettato deve idealmente essere pari o inferiore a 1,7 µL, mentre una colonna di 4,6 x 50 mm può ricevere un'iniezione di 8,3 µL. Se si sceglie una colonna con d.i. 2,1 mm, le tubazioni del sistema LC devono essere configurate in modo da minimizzare la dispersione.

- Una colonna più lunga, come per esempio 250 mm, consente di ottenere una maggiore risoluzione, mentre una colonna più corta, come per esempio 50 mm, può aiutare a ridurre il tempo di esecuzione.

### Dimensioni delle particelle

- In generale, particelle più piccole consentono una separazione più efficiente, ma presentano pressioni di funzionamento più elevate.
- Le biomolecole di grandi dimensioni, come gli mAb, hanno una minore velocità di diffusione, per cui le dimensioni delle particelle non hanno un effetto molto marcato sulla risoluzione.
- Gli eluenti con tamponi acquosi sono relativamente viscosi e possono comportare contropressioni più elevate.
- Le dimensioni delle particelle e le contropressioni massime per le colonne Bio MAb sono come segue:
  - 1,7 µm: 689 bar
  - 3 µm: 551 bar
  - 5 µm: 413 bar
  - 10 µm: 275 bar
- Un altro aspetto da considerare è che l'hardware in PEEK ha un limite di pressione di 400 bar ed è disponibile solo con dimensione delle particelle di 5 e 10 µm. I gradienti salini possono essere corrosivi per l'acciaio inossidabile, quindi l'uso di colonne in PEEK in aggiunta a un sistema LC bio-inerte o bio-compatibile permette di mantenere la robustezza del sistema.

### Durata della colonna e riproducibilità

- I flussi variano tra 0,1 e 1,0 mL/min. Le colonne con d.i. 2,1 mm tipicamente funzionano a 0,2-0,4 mL/min, mentre le colonne con d.i. 4,6 mm tipicamente funzionano con valori tra 0,5 e 1,0 mL/min. Occorre monitorare la contropressione e inizialmente far aumentare i flussi lentamente per assicurarsi che la colonna non superi il limite di pressione di funzionamento.
- Le colonne Bio MAb possono tollerare fino a 80 °C. Per prolungare la durata delle colonne, tuttavia, normalmente devono essere fatte funzionare tra 10 e 50 °C.
- Per ottenere la massima riproducibilità, la fase di pulizia/equilibrio del gradiente deve corrispondere a 5-10 volte il volume della colonna.
- Prendere in considerazione la possibilità di usare una precolonna per prolungare la durata della colonna analitica.
- In caso di immagazzinamento per lunghi periodi, la colonna deve essere lavata con un volume pari ad almeno 15 volte il volume della colonna e conservata in tampone fosfato 20 mM con azoturo di sodio allo 0,1% a pH 6.
- Le colonne che usano hardware PEEK devono essere accoppiate a raccordi PEEK (codice 5042-8957)

## Informazioni per scegliere e ordinare facilmente

Per ordinare gli articoli elencati nelle tabelle riportate di seguito su Agilent Online Store, aggiungere gli articoli al proprio elenco Prodotti preferiti facendo clic sui collegamenti presenti nelle intestazioni delle tabelle Il mio elenco #. Inserire quindi le quantità dei prodotti richieste, aggiungere al carrello e procedere al pagamento. L'elenco rimarrà tra i Prodotti preferiti in modo che sia possibile disporre per ordini futuri.

Se questa è la prima volta che usi i 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 essere ordinati anche tramite i normali canali di vendita e distribuzione.

## Il mio elenco 1: colonne Bio MAb per l'analisi di varianti di carica

Descrizione	Codice
Agilent Bio MAb, NP5, 2,1 x 50 mm, PEEK	5190-2412
Agilent Bio MAb, NP5, 2,1 x 250 mm, PEEK	5190-2411
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 x 50 mm, PEEK	5190-2408
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 x 250 mm, PEEK	5190-2407
Agilent Bio MAb, NP10, 2,1 x 50 mm, PEEK	5190-2420
Agilent Bio MAb, NP10, 2,1 x 250 mm, PEEK	5190-2419
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 x 50 mm, PEEK	5190-2416
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 x 250 mm, PEEK	5190-2415
Agilent Bio MAb, NP1.7, 4 x 10 mm, precolonna	5190-2402
Agilent Bio MAb, NP3, 4 x 10 mm, precolonna	5190-2404
Agilent Bio MAb, NP5, 4 x 10 mm, precolonna	5190-2406
Agilent Bio MAb, NP10, 4 x 10 mm, precolonna	5190-2414
Agilent Bio MAb, NP1.7, 4,6 x 50 mm	5190-2401
Agilent Bio MAb, NP3, 4,6 x 50 mm	5190-2403
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 x 250 mm	5190-2405
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 x 250 mm	5190-2413
Agilent Bio MAb, NP5, 10 x 250 mm	5190-6884
Agilent Bio MAb, NP5, 21,2 x 250 mm	5190-6885

## Il mio elenco 2: Standard

Descrizione	Codice
mAb NIST Agilent, 25 µL	5191-5744
mAb NIST Agilent, 4 x 25 µL	5191-5745

### Il mio elenco 3: Materiali di consumo e solventi

Descrizione	Codice
<b>Conessioni e tubi</b>	
Raccordo Swagelok, polichetone, per hardware PEEK, 10/conf.	5042-8957
Raccordo LC InfinityLab Quick Connect, solo per hardware in acciaio inossidabile	5067-5965
Raccordo Agilent Quick Turn InfinityLab (per collegamento sull'uscita della colonna, solo per hardware in acciaio inossidabile)	5067-5966
Capillare Quick Turn MP35N 0,12 x 200 mm solo per hardware in acciaio inossidabile	5500-1595
Raccordo connettore bio-compatibile, MP35N 10-32 conico, volume morto nullo	5023-2625
Capillare Quick Turn MP35N 0,12 x 280 mm solo per hardware in acciaio inossidabile	5500-1596
Utensile di montaggio per raccordi Quick Turn	5043-0915
Kit valvola di regolazione della pressione in linea (da usare quando un altro rivelatore viene utilizzato in serie dopo la cella di flusso a fluorescenza)	G4212-68001
Valvola di selezione per 6 colonne, analitica, bio-compatibile. Sistema LC 1290 Infinity II Bio	5320-0025
Valvola bio a 2 posizioni/10 porte Quick Change. Include testa della valvola bio Quick Change da 1300 bar.	5067-6682
Kit di tubi a dispersione ultra bassa per Agilent 1290 Infinity II Bio	5004-0007
Kit di capillari per valvola di commutazione bio a 2 posizioni/10 porte	5013-0002
Kit di capillari per valvola di selezione per 6 colonne. Bio-compatibili, d.i. 0,12 mm, sistema LC 1290 Infinity II Bio	5005-0070
<b>Contenitori per campioni</b>	
Vial a elevato recupero, chiusura a vite, con inserto fisso, trasparente, volume dell'inserto 300 µL, 100/conf. Dimensioni vial: 12 x 32 mm (tappo 12 mm)	5188-6591
Tappo, a vite, blu, setti in PTFE/silicone rosso, 100/conf. Dimensione tappo: 12 mm	5182-0717
Vial, tappo a chiusura meccanica/a scatto, polipropilene, certificato, 250 µL, 1.000/conf. Dimensioni vial: 12 x 32 mm (tappo 11 mm)	9301-0978
Tappo, a scatto, trasparente, setti in PTFE/silicone/PTFE, 100/conf. Dimensione tappo: 11 mm (per 5190-3155)	5182-0566
Piastra a 96 pozzetti InfinityLab, 0,5 mL, 30/conf.	5043-9310
Coperchio di chiusura per piastra a 96 pozzetti InfinityLab, 50/conf.	5042-1389
<b>Solventi e additivi</b>	
Acqua ultra pura per LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4498
<b>Filtrazione del solvente</b>	
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 bottiglie di solvente, ingresso solvente, 20 µm	5041-2168

Descrizione	Codice
<b>Manipolazione dei solventi</b>	
Bottiglia solvente InfinityLab, trasparente, 1 L	9301-6524
Bottiglia solvente InfinityLab, ambrata, 1 L	9301-6526
Bottiglia solvente, trasparente, 2 L	9301-6342
Bottiglia solvente, ambrata, 2 L	9301-6341
Contenitore di scarico InfinityLab, GL45, 6 L, con tappo Stay Safe	5043-1221
Filtro al carbone InfinityLab con striscia time strip, 58 g	5043-1193
Kit di avvio Stay Safe con bottiglia di spurgo, include bottiglia di spurgo InfinityLab Stay Safe (codice 5043-1339) e kit di avvio tappi Stay Safe (codice 5043-1222)	5043-1340
Kit di avvio tappo Stay Safe InfinityLab	5043-1222
Bottiglia di spurgo Stay Safe InfinityLab	5043-1339

### Bibliografia:

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. Di quanto puoi ridurre il tuo gradiente? Perfezionamento dell'analisi delle isoforme cariche degli anticorpi monoclonali (mAb) con il sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II  
[5994-2692ITE](#)
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](#)

Per maggiori informazioni:

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

Per trovare un centro assistenza clienti Agilent nel tuo Paese:

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

Italia

numero verde 800 012 575

[customercare\\_italy@agilent.com](mailto:customercare_italy@agilent.com)

Europa

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

DE99980273

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Stampato negli Stati Uniti, 9 febbraio 2024  
5994-6053ITE

