

## Análise de variantes de carga de mAb por cromatografia de troca catiônica fraca (WCX)

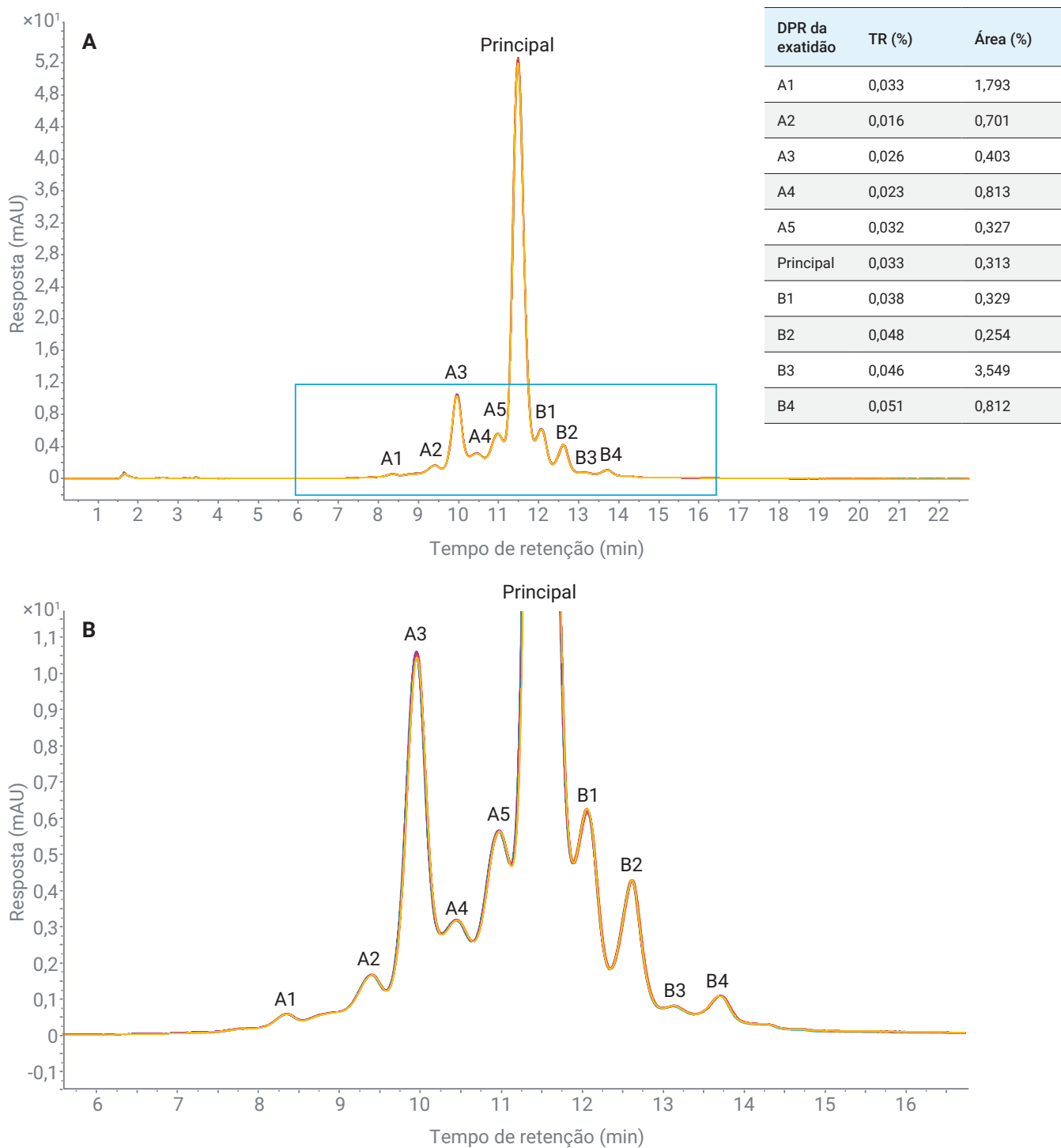


Os anticorpos monoclonais (mAbs) são bioterapêuticos muito importantes produzidos pela maioria das grandes empresas farmacêuticas. Os mAbs têm cerca de 150.000 Daltons e possuem diversas modificações que aumentam a complexidade dessa classe de macromoléculas. As modificações podem ocorrer durante a produção da proteína ou à medida que são fabricadas e armazenadas. Modificações como bloqueio da porção C-terminal, desamidação, alterações na glicosilação e remoção ou substituição de aminoácidos afetam a carga geral de um mAb e são consideradas variantes de carga. As variantes de carga são geralmente monitoradas por cromatografia de troca iônica.<sup>1,2</sup> O monitoramento de atributos críticos de qualidade (CQAs), como variantes de carga, é essencial para garantir que a eficácia, a segurança e a imunogenicidade do produto final não sejam comprometidas. Agências governamentais, como a U.S. Food and Drug Administration (FDA), exigem dados de variantes de carga ao enviar um pedido para obter a licença de produtos biológicos.

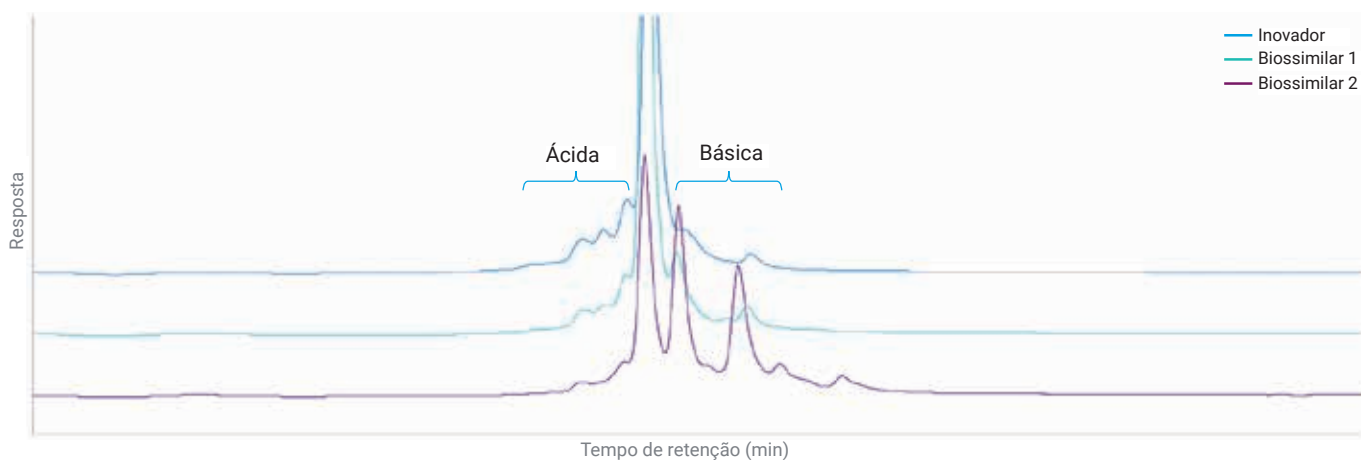
Embora a análise de variantes de carga seja uma técnica bem estabelecida, os desafios para este tipo de ensaio ainda existem. Os tampões usados com mais frequência têm uma alta concentração de sal e podem ser corrosivos para o hardware tradicional de aço inoxidável em sistemas e colunas de cromatografia líquida. O uso de um sistema biocompatível ou bioinerte como o sistema de LC Bio Agilent 1290 Infinity II ou Bio-Inert Agilent 1260 Infinity II atenua esse problema. A trajetória de fluxo é completamente livre de ferro e aço inoxidável. Todas as conexões e capilares são feitos de uma liga, MP35N, de modo que a corrosão é reduzida. Além disso, isso evita que ocorram reações de corrosão, como a oxidação. O LC Bio 1290 Infinity II está disponível com uma bomba binária que é ideal para produzir gradientes exatos e precisos, especialmente para gradientes superficiais que são comuns em análises de variantes de carga. A opção de bomba quaternária também é útil para análise de variantes de carga para testar diferentes condições de tampão, o que é facilitado com o software Agilent Buffer Advisor.

A coluna Agilent Bio MAb é uma coluna de troca catiônica fraca projetada especificamente para caracterização da heterogeneidade de carga dos anticorpos monoclonais.<sup>3</sup> Está disponível no hardware PEEK, que mantém uma trajetória de fluxo sem ferro em todo o sistema LC Bio 1290 Infinity II, o que é essencial para resultados altamente reprodutíveis (Figura 1).<sup>4</sup>

Além disso, a própria coluna foi projetada especificamente para separações de mAb e possui uma camada de troca catiônica fraca e altamente densa e uniforme que é ligada ao revestimento polimérico hidrofílico, projetada para eliminar interações não específicas, tornando-a ideal para estudos de comparação de biossimilaridade (Figura 2).<sup>5</sup>



**Figura 1.** Variantes ácidas e básicas do trastuzumab. Sete corridas subsequentes forneceram resultados altamente reprodutíveis em tempo de retenção e área do pico.



**Figura 2.** Comparação de variantes de carga entre rituximabe e dois biossimilares.

### Práticas recomendadas para otimizar as condições cromatográficas

Dois parâmetros são essenciais para alcançar a resolução desejada e a separação ideal das variantes de carga: determinar o pH ideal da fase móvel, bem como a inclinação ideal do gradiente. Ambos os fatores podem ter uma grande influência na separação. A Tabela 1 sugere parâmetros para iniciar a otimização.

Parâmetro	Gradiente de sal	Gradiente de pH
	Valor	Valor
Coluna	Bio MAb, NP5, 2,1 x 250 mm, PEEK (part number 5190-2411)	Bio MAb, NP5, 2,1 x 250 mm, PEEK (part number 5190-2411)
Sistema de LC sugerido	Sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II com bomba de alta velocidade	Sistema LC Bio Agilent 1290 Infinity II com bomba flex (quaternária)
Fase móvel	A: Tampão de fosfato 30 mM, pH 6,8 B: Tampão de fosfato 30 mM, pH 6,8, NaCl 500 mM	A: Água 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 de 0-30 minutos; 100-500 mM de 30-31 min; Isocrático em 500 mM de 31-35 min. Tempo posterior de 15 minutos	pH 6,0 a 8,0, 0 a 20 minutos NaCl 0 a 800 mM, 20 a 25 minutos NaCl 800 mM, 25 a 30 minutos
Vazão	0,25 mL/min	0,25 mL/min
Volume de injeção	1–5 µL	1–5 µL
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Detecção	280 nm	280 nm

**Tabela 1.** Condições iniciais sugeridas

## Considerações da fase móvel

- A fase móvel deve conter tampão para manter o pH operacional desejado, bem como carga consistente, a concentração é tipicamente 20–30 mM.
- Tampões de fosfato são muito comuns na faixa de pH 6 a 7. Outros tampões compatíveis incluem acetato, tris e tampões contendo MES, assim como acetonitrila e metanol. As amostras de mAb devem ser solúveis na fase móvel.
- Um íon competitivo deve ser introduzido para eluir o mAb da coluna, o que normalmente é realizado com cloreto de sódio de 100 mM a 500 mM.
- A adição de cloreto de sódio alterará o pH da fase móvel, portanto, o pH precisará ser reajustado.
- Para melhores resultados, os tampões devem ser feitos frescos e armazenados na geladeira, a menos que sejam usados ativamente, pois o crescimento bacteriano é comum no tampão diluído. Além disso, é uma prática recomendada filtrar os tampões para evitar o entupimento da coluna.

## Considerações sobre o tampão do gradiente de pH

- Gradientes de sal são mais comuns em cromatografia de troca iônica; no entanto, gradientes de pH são um método alternativo<sup>6,7</sup> que pode resultar em maior resolução. A coluna Bio MAb é estável a partir do pH 2–12.
- Os gradientes de pH do mAb normalmente começam em pH 6 e vão até pH 7–8 e têm uma etapa de limpeza/ equilíbrio da coluna com sal de cloreto de sódio.
- Fosfato monossódico e fosfato dissódico são tampões de eluição comuns.

## Considerações gerais sobre a fase móvel da proteína

- O pH do tampão inicial deve ser de 0,5 a 1 unidade de pH abaixo do pH das proteínas para cromatografia de troca catiônica.
- O pH 6 é um bom ponto de partida se o pH da proteína não for conhecido.

## Dimensões da coluna

- O diâmetro interno (DI) da coluna deve ser selecionado com base na quantidade de mAb que está sendo analisada. Uma diretriz geral é que o volume injetado não deve exceder mais de 1–2% de todo o volume da coluna. Por exemplo, uma coluna de 2,1 x 50 mm deve idealmente ter 1,7 µL ou menos injetados, enquanto uma de 4,6 x 50 mm pode lidar com uma injeção de 8,3 µL. Se uma coluna de diâmetro interno de 2,1 mm for selecionada, o LC deve ser canalizado para minimizar a dispersão.

- Uma coluna mais longa, como 250 mm, produzirá uma resolução mais alta, enquanto uma coluna mais curta, como 50 mm, pode ajudar a reduzir o tempo de corrida.

## Tamanho de partícula

- Geralmente, tamanhos de partícula menores fornecem uma separação mais eficiente, mas apresentam pressões operacionais mais altas.
- Biomoléculas maiores, como mAbs, têm uma taxa de difusão mais lenta, portanto, os tamanhos das partículas não têm um efeito tão forte na resolução.
- Eluentes com tampões aquosos são relativamente viscosos e podem produzir pressão resultante mais alta.
- Os tamanhos de partícula da Bio MAb e as pressões resultantes máximas são as seguintes:
  - 1,7 µm: 689 bar
  - 3 µm: 551 bar
  - 5 µm: 413 bar
  - 10 µm: 275 bar
- Outra consideração é que o hardware PEEK tem um limite de pressão de 400 bar e está disponível apenas nos tamanhos de partícula de 5 e 10 µm. Os gradientes de sal podem ser corrosivos para o aço inoxidável, portanto, o uso de colunas PEEK, além de um sistema LC bioinerte ou biocompatível, manterá a robustez do sistema.

## Vida útil e reprodutibilidade da coluna

- As vazões variam de 0,1 a 1,0 mL/min. As colunas de 2,1 mm de DI normalmente funcionam a 0,2–0,4 mL/min, enquanto as colunas de 4,6 mm de DI normalmente operam de 0,5–1,0 mL/min. A pressão resultante deve ser monitorada e inicialmente as vazões devem ser aumentadas lentamente para garantir que a coluna não exceda o limite de pressão operacional.
- As colunas Bio MAb podem suportar até 80 °C. No entanto, para prolongar a vida útil da coluna, elas devem ser operadas regularmente entre 10–50 °C.
- Para máxima reprodutibilidade, a etapa de equilíbrio/ limpeza no gradiente deve ser de 5 a 10 volumes de coluna.
- Considere o uso de uma coluna de guarda Agilent para prolongar a vida útil da coluna analítica.
- Para armazenamento prolongado, a coluna deve ser lavada com pelo menos 15 volumes de coluna e armazenada em tampão de fosfato 20 mM com 0,1% de azida de sódio a pH 6.
- As colunas que usam hardware de poliéter éter cetona devem ser ligadas com conexões de poliéter éter cetona (p/n 5042-8957)

## Fácil seleção e informações para pedidos

Para solicitar os itens listados nas tabelas abaixo na Agilent Online Store, adicione itens à sua lista de produtos favoritos clicando nos links do cabeçalho MyList #. Em seguida, insira as quantidades dos produtos necessários, adicione ao carrinho e prossiga para a finalização. A sua lista permanecerá em "Favorite Products" para uso em pedidos futuros.

Caso esta seja a sua primeira vez usando o "Favorite Products", será solicitado que você digite o seu endereço de e-mail para verificação da conta. Se você tiver uma conta Agilent existente, poderá fazer login. No entanto, se não tiver uma conta Agilent registrada, é necessário se registrar para obter uma. Esse recurso é válido apenas nas regiões onde o e-commerce está habilitado. Todos os itens também podem ser solicitados através dos canais regulares de vendas e distribuidores.

## MyList 1: Colunas Bio MAb para análise de variantes de carga

Descrição	Part No.
Agilent Bio MAb, NP5, 2,1 x 50 mm, PEEK	<a href="#">5190-2412</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 2,1 x 250 mm, PEEK	<a href="#">5190-2411</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 x 50 mm, PEEK	<a href="#">5190-2408</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 x 250 mm, PEEK	<a href="#">5190-2407</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 2,1 x 50 mm, PEEK	<a href="#">5190-2420</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 2,1 x 250 mm, PEEK	<a href="#">5190-2419</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 x 50 mm, PEEK	<a href="#">5190-2416</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 x 250 mm, PEEK	<a href="#">5190-2415</a>
Agilent Bio MAb, NP1.7, 4 x 10 mm, guarda	<a href="#">5190-2402</a>
Agilent Bio MAb, NP3, 4 x 10 mm, guarda	<a href="#">5190-2404</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 4 x 10 mm, guarda	<a href="#">5190-2406</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 4 x 10 mm, guarda	<a href="#">5190-2414</a>
Agilent Bio MAb, NP1.7, 4,6 x 50 mm	<a href="#">5190-2401</a>
Agilent Bio MAb, NP3, 4,6 x 50 mm	<a href="#">5190-2403</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 4,6 x 250 mm	<a href="#">5190-2405</a>
Agilent Bio MAb, NP10, 4,6 x 250 mm	<a href="#">5190-2413</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 10 x 250 mm	<a href="#">5190-6884</a>
Agilent Bio MAb, NP5, 21,2 x 250 mm	<a href="#">5190-6885</a>

## MyList 2: Padrões

Descrição	Part No.
Agilent NIST mAb, 25 µL	<a href="#">5191-5744</a>
Agilent NIST mAb, 4 x 25 µL	<a href="#">5191-5745</a>

### MyList 3: Consumíveis e solventes

Descrição	Part No.
<b>Conexões e tubulação</b>	
Conexão Swagelok, policetona, para hardware em poliéter éter cetona, 10/pacote	5042-8957
Conexão para LC InfinityLab Quick Connect, somente para hardware em aço inoxidável	5067-5965
Conexão Agilent InfinityLab Quick Turn (para conexão na saída da coluna, somente para hardware em aço inoxidável)	5067-5966
Capilar Quick Turn MP35N 0,12 x 200 mm, somente para hardware em aço inoxidável	5500-1595
União de conexão biocompatível, MP35N 10-32 com cone, volume morto zero	5023-2625
Capilar Quick Turn MP35N 0,12 x 280 mm, somente para hardware em aço inoxidável	5500-1596
Ferramenta de montagem para conexão Quick Turn	5043-0915
Kit de válvula de alívio de pressão em linha (Para uso quando outro detector é usado em série após a célula de fluxo de fluorescência)	G4212-68001
Válvula seletora de 6 colunas, analítica, biocompatível. Sistema LC Bio 1290 Infinity II	5320-0025
A válvula bio de 2 posições/10 portas Quick Change inclui cabeça da válvula bio Quick Change de 1300 bar.	5067-6682
Kit de tubulação de dispersão ultrabaixa para LC Bio Agilent 1290 Infinity II	5004-0007
Kit capilar para válvula bio de 2 posições/10 portas	5013-0002
Kit capilar para válvula seletora de 6 colunas. Biocompatível, 0,12 mm de DI, Sistema LC Bio 1290 Infinity II	5005-0070
<b>Armazenamento de amostras</b>	
Vial de alta recuperação, rosqueável, com insert fixo, transparente, volume do insert de 300 µL, 100/pacote Tamanho do vial: 12 x 32 mm (tampa de 12 mm)	5188-6591
Tampa, rosqueável, azul, septo de PTFE/silicone vermelho, 100/pacote Tamanho da tampa: 12 mm	5182-0717
Vial lacrável/com tampa de encaixe, polipropileno, certificado, 250 µL, 1.000/pacote. Tamanho do vial: 12 x 32 mm (tampa de 11 mm)	9301-0978
Tampa, de encaixe, transparente, septo de PTFE/silicone/PTFE, 100/pacote Tamanho da tampa: 11 mm (para 5190-3155)	5182-0566
Placa de 96 poços InfinityLab, 0,5 mL, 30/pacote	5043-9310
Tela de vedação para placa de 96 poços InfinityLab, 50/pacote	5042-1389
<b>Solventes e aditivos</b>	
Água de grau LC/MS ultrapura InfinityLab, 1 L	5191-4498
<b>Filtração de solvente</b>	
Conjunto de filtração de solvente InfinityLab	5191-6776
Frasco de filtração de solvente InfinityLab, vidro, 2 L	5191-6781
Membrana de filtro, nylon de 47 mm, medida de poro de 0,2 µm, 100/pacote	5191-4341
Membrana de filtro, celulose regenerada, 47 mm, medida de poro de 0,2 µm, 100/pacote	5191-4340
Filtro de vidro para frascos de solvente, entrada de solvente, 20 µm	5041-2168

Descrição	Part No.
<b>Manipulação de solvente</b>	
Frasco de solvente InfinityLab, transparente, 1 L	9301-6524
Frasco de solvente InfinityLab, âmbar, 1 L	9301-6526
Frasco de solvente, transparente, 2 L	9301-6342
Frasco de solvente, âmbar, 2 L	9301-6341
Recipiente de resíduos InfinityLab, GL45, 6 L com tampa Stay Safe	5043-1221
Filtro de carvão InfinityLab com faixa sinalizadora de tempo de uso, 58 g	5043-1193
Kit inicial e frasco de purga Stay Safe, inclui frasco de purga InfinityLab Stay Safe (PN 5043-1339) e kit inicial de tampas Stay Safe (PN 5043-1222)	5043-1340
Kit inicial de tampas de solvente Agilent A-Line Stay Safe	5043-1222
Frasco de purga InfinityLab Stay Safe	5043-1339

### Referências:

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. How Shallow Can You Go? Refining charge variant analysis of mAbs with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System  
[5994-2692EN](#)
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](#)

Saiba mais em:

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

Encontre um centro de atendimento ao cliente da  
Agilent no seu país:

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

Brasil

0800 7281405

[chem\\_vendas@agilent.com](mailto:chem_vendas@agilent.com)

Europa

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

Ásia e Pacífico

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

DE99980273

Essas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Impresso nos EUA, 9 de fevereiro de 2024  
5994-6053PTBR

