

Coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent - Mais opções para a determinação de titulação de anticorpos monoclonais

Nota de aplicação

Elementos biológicos e biossimilares

Autor

Phu T. Duong
Agilent Technologies, Inc.

Introdução

Nos últimos anos, anticorpos monoclonais (mAbs) se tornaram um dos maiores produtos biofarmacêuticos em resposta à necessidade de tratar várias doenças. Esses anticorpos são produzidos com um makeup genético específico para uma melhor abordagem dos agentes de doença. Durante o desenvolvimento desses anticorpos, as colunas de afinidade analíticas Protein A e G são usadas para a determinação de sua titulação ou concentração de vários sobrenadantes de cultura celular. Um monólito polimérico inerte é usado como suporte para as colunas Protein A e Protein G. Ambas as colunas têm alta afinidade para anticorpos e, por isso, ligam-se apenas a anticorpos em sobrenadantes de cultura celular. No entanto, elas possuem seletividade diferente, conforme mostrado na Tabela 1.

Essa nota de aplicação apresenta a coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent. A coluna é projetada para capacidade de alta carga e alta velocidade. Os dados são apresentados para mostrar a linearidade com alta especificidade. A análise de linearidade revela a capacidade da coluna para análise de quantificação precisa de mAbs em sobrenadantes de cultura celular. Além disso, os dados de análise de tempo de vida útil indicam que a coluna pode ser altamente reproduzível e tem um longo tempo de vida com pressão de retorno baixa e estável. A coluna Bio-Monolith Protein G é complementar à coluna Bio-Monolith Protein A, para fornecer mais opções para a determinação de titulação de anticorpos monoclonais.



Agilent Technologies

Tabela 1. Afinidade de ligação das colunas Bio-Monolith Protein A e G da Agilent para diferentes subclasses de IgG [1,2].

Anticorpo	Protein A	Protein G
Humano		
IgG1 humano	++++	++++
IgG2 humano	++++	++++
IgG3 humano	–	++++
IgG4 humano	++++	++++
IgA humano	++	–
IgD humano	++	–
IgE humano	++	–
IgM humano	++	–
Camundongo		
IgG1 de camundongo	+	++
IgG2a de camundongo	++++	++++
IgG2b de camundongo	++++	+++
IgG3 de camundongo	+	+++
IgM de camundongos	+/-	–
Fragmentos de anticorpos		
Fab humano	+	+
F(ab)'2 humano	+	+
scFv humano	+	+
Fc humano	+	+
K humano	+	+
L humano	+	+

++++ = Forte afinidade
 +++ = Afinidade moderada
 ++ = Afinidade fraca
 + = Pouca afinidade
 – = Nenhuma afinidade

Materiais e métodos

- Monodrato de fosfato monobásico de sódio (Sigma-Aldrich, Corp., p/n S3522) (MW 137.99)
- Diidrato dibásico de fosfato de sódio (Sigma, p/n 71643) (MW 177.99)
- Monodrato de ácido cítrico (Sigma, p/n C7129) (MW 210.14)
- Cloreto de sódio (Sigma, p/n S5886) (MW 58.44)
- Ácido fosfórico, 85 peso % em H₂O, 99,99% base de metal em nível traço (Aldrich, p/n 345245)
- Solução de hidróxido de sódio, 50 a 52% em água, eluente para IC (FLUKA 72064) (MW 40)
- Glicina, para eletroforese, 99% (Sigma, p/n G8898) (MW 75.07)
- Ácido acético glacial (Sigma, p/n C7129) (MW 60,05)
- Ácido clorídrico, 36,5 a 38,0%, biorreagente, para biologia molecular (Sigma, p/n H1758)
- *Escherichia coli* kit de lise celular (Sigma p/n CB0500).

- Lisado e sobrenadante de célula de CHO de ovário de hamster chinês, sobrenadante de célula de inseto, anticorpo monoclonal derivado de célula humanizada de CHO (IgG2 e IgG3) de CreativeBio Labs.

Método

A fase móvel A é a ligação e o tampão de lavagem, contendo tampão de fosfato de sódio de 50 mM, pH 7,4. Duas soluções de estoque (0,2 M) são feitas de 27,6 g de monodrato monobásico de fosfato de sódio em 1 l de água deionizada e 35,6 g de diidrato dibásico de fosfato de sódio, também em 1 l de água deionizada.

Para fazer 2 l de fosfato de sódio contendo 50 mM de tampão de fosfato de sódio e 50 mM de cloreto de sódio, pH 7,0:

1. Misture 195 ml de solução de estoque de monodrato monobásico de fosfato de sódio e 305 ml de solução de estoque de diidrato dibásico de fosfato de sódio. Agite usando um agitador magnético.
2. Adicione 5,8 g de cloreto de sódio e continue misturando.
3. Adicione 1 l de água deionizada.
4. Meça o pH da solução e ajuste-o para 7,0 com NaOH ou 3 M de ácido fosfórico.
5. Despeje a solução em um frasco volumétrico de 2 l e adicione água até a marcação.

A fase móvel B é um tampão de eluição contendo 0,1 M de ácido cítrico, feito através da diluição de 21 g de monodrato de ácido cítrico em aproximadamente 600 ml de água, mexendo suavemente. Ajuste o pH para 2,0 com 1 M HCl e dilua a solução com água a 1 l em um frasco volumétrico.

Sobrenadante de célula de CHO, lisado, lisado de célula de inseto (todas as amostras foram centrifugadas) e IgG1, IgG2 e IgG3 monoclonal humanizado foram adquiridas da Creative BioLabs, Nova York. O lisado de *Escherichia coli* foi preparado de acordo com o protocolo recomendado por Sigma-Aldrich, Corp [3]. O kit contém Cellytic B, um reagente de lise bacteriana (500 ml), solução de lisozima (10 × 1 ml), benzonase (25.000 unidades) e coquetel inibidor de protease (5 ml). O lisado é preparado pela adição de 1,0 g de pasta de células a 10 ml de reagente Cellytic B, 0,2 ml de lisozima, 0,1 ml de inibidores de protease e 500 unidades de benzonase. A mistura é submetida a vortex e misturada por 10 minutos (à mão ou no misturador) para garantir maior extração das proteínas solúveis. A mistura é então centrifugada a 5.000 g por 10 minutos para granular quaisquer materiais insolúveis. A fração da proteína solúvel (sobrenadante) é cuidadosamente removido dos restos de células (grãos no fundo do tubo). A concentração de proteína no sobrenadante pode ser estimada usando o ensaio de proteínas Bradford, nesse caso, 40 mg/ml.

Algum sobrenadante foi então acrescido de IgG1, IgG2 ou IgG3, como descrito. Os sobrenadantes foram diluídos com tampão de ligação (ou tampão A) a uma concentração de 10 mg/ml e acrescido de 2 mg/ml de anticorpos monoclonais simples humanizados e purificados como IgG1, IgG2 ou IgG3.

Condições

Coluna:	Bio-Monolith Protein G da Agilent, 5,2 mm de diâmetro, 4,95 mm de comprimento (p/n 5069-3639)	
Tampão de ligação:	A, 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,4	
Tampão de eluição:	B, 0,1 M de ácido cítrico, pH 2,0	
Amostra:	ver cromatogramas	
Vol. de inj.:	ver cromatogramas	
Taxa de fluxo:	1,0 ml/min (ou ver cromatogramas)	
Gradiente:	Tempo (min)	% A
	0	100
	0,4	100
	0,5	0
	2,0	0
	2,1	100
	4,2	100
Temp:	25 °C	
Detector:	UV, 280 nm	
Sistema:	LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert	

Resultados e discussão

Especificidade e seletividade

Como indicado na Tabela 1, a coluna Protein G tem maior afinidade de ligação para subclasses diferentes de anticorpos monoclonais humanizados do que a coluna Protein A, e somente a Protein G tem afinidade para a subclasse IgG3. Os dados na Figura 1A demonstram a especificidade da coluna Bio-Monolith Protein G e sua capacidade de monitorar a titulação, ou seja, a presença e a concentração de anticorpos no sobrenadante. A coluna foi injetada com a amostra contendo mAb humanizado recombinante purificado, IgG3, que foi acrescido no sobrenadante de células de CHO. Esse mAb foi expresso na linha de células de CHO. Os dados mostram que IgG3 foi a única proteína capturada e eluída na coluna, a cerca de 1,6 minuto a 1,0 ml/min, enquanto todas as proteínas de células hospedeiras não foram capturadas pela coluna e eluídas no pico de fluxo contínuo.

Para mostrar a seletividade diferente entre as colunas Protein A e Protein G, ambas foram injetadas separadamente com anticorpos monoclonais IgG1, IgG2 e IgG3. IgG1 e IgG2 foram capturados pelas duas colunas (dados não mostrados), mas IgG3 não foi capturado pela coluna Bio-Monolith Protein A. IgG3 foi eluída como um pico de fluxo contínuo e IgG3 foi apenas capturado e eluído pela coluna Bio-Monolith Protein G (comparar Figuras 1A e 1B).

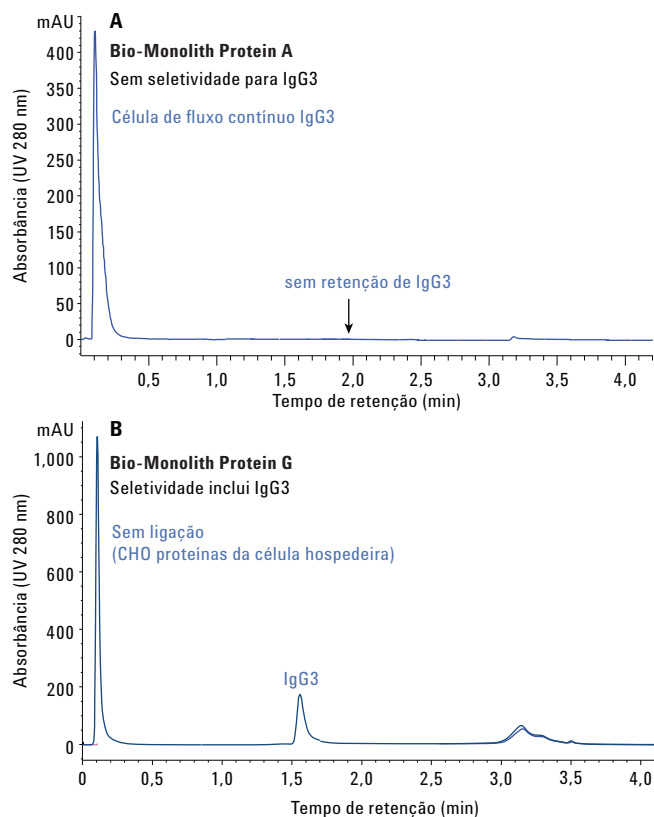


Figura 1. A) Nenhuma ligação de IgG3 na coluna Bio-Monolith Protein A. IgG3 foi eluído como o pico de fluxo contínuo. 2 mg/ml de IgG3 humanizado misturado com tampão de ligação (3 µl foram injetados na coluna). B) A coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent capturou rapidamente apenas IgG3 de uma cultura celular colhida acrescida de IgG3 (5 µL de 2,0 mg/ml de IgG3 misturados com 10 mg/ml de sobrenadante de célula de CHO foram injetados na coluna).

Um teste mais robusto foi realizado para confirmar que a especificidade da coluna Bio-Monolith Protein G era tal que não tinha afinidade de ligação para proteínas de células hospedeiras. Foram usadas amostras de proteína de células hospedeiras de lisado de células de *E. coli*, lisado de células de CHO, sobrenadante e lisado de células de insetos. Esses lisados continham proteínas de células hospedeiras que foram extraídos por tampões de lise contendo dodecil sulfato de sódio, um produto químico que influencia muito as ligações não específicas à coluna. Essas amostras não continham anticorpos, apenas proteínas de células hospedeiras. O teste foi realizado porque as amostras resistentes fornecerão resultados não específicos se a coluna não for bem projetada. A Figura 2 não mostra evidências de qualquer proteína de qualquer sobrenadante de célula hospedeira sendo absorvida pela coluna. Todas as proteínas de células hospedeiras foram eluídas como picos de fluxo contínuo. Os dados sugerem que a coluna Bio-Monolith Protein G não tinha afinidade alguma para proteínas de células hospedeiras.

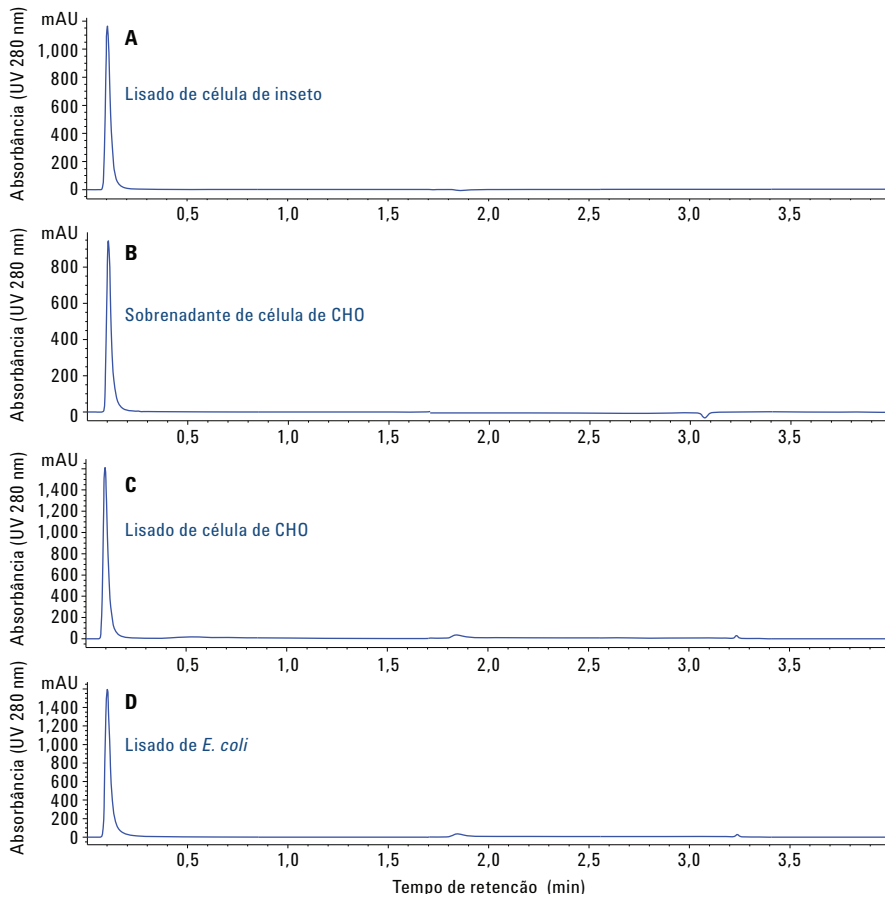


Figura 2. Análise de especificidade usando a coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent com 10 mg/ml de proteínas de célula hospedeira diluídas com tampão de ligação. O volume da injeção era 5 µl para todas as amostras. A) Lisado de célula de insetos, B) Sobrenadante de célula de CHO, C) Lisado de célula de CHO, D) Lisado de *E. coli*.

Quantificação precisa

A quantificação precisa da titulação de mAb é essencial durante os estágios iniciais de desenvolvimento quando a linha celular é selecionada e também durante a fabricação quando a quantidade de mAb no sobrenadante da cultura celular determina o período otimizado de colheita. Para demonstrar a capacidade da coluna Bio-Monolith Protein G na quantificação precisa de mAbs, diferentes quantidades (µg) de IgGs purificados foram injetadas na coluna. Os dados de áreas de pico em relação às quantidades de IgGs gerados foram usados para construir as linhas de linearidade, para determinar a precisão da análise. A Figura 3 mostra a linearidade de áreas de pico da coluna Protein G, mostrando que a coluna pode ser usada para a quantificação de mAb em meio de colheita de cultura celular com diferentes variações de concentrações. A coluna foi injetada com 2 µg IgG. A razão sinal-ruído não era maior do que 1:1 para 2 µg (dados não mostrados). A capacidade máxima de carregamento dessa coluna é de aproximadamente 400 a 500 µg IgG (dados não mostrados), o que cobre a variação de concentrações atingida durante a produção e seleção de linhas celulares.

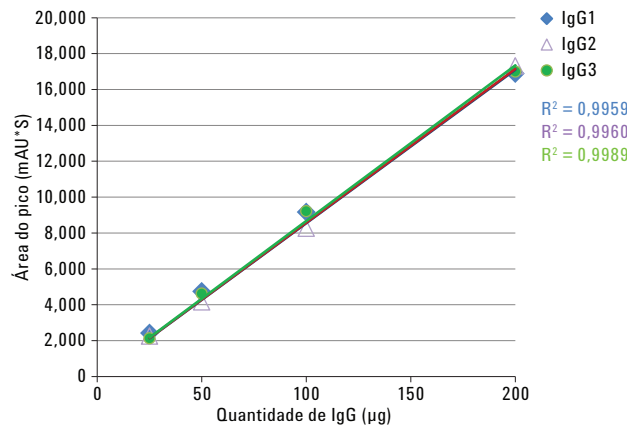


Figura 3. A coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent quantifica anticorpos monoclonais. As linhas de linearidade incluem dados da área do pico de 25 a 200 µg de IgG.

Varição de carregamento mais ampla do que a coluna protein G de outro fornecedor

A Figura 4A mostra a comparação de linearidade de uma ampla variação de carregamento de IgG3 entre a coluna Bio-Monolith Protein G e a coluna protein G de 2,1× 30 mm, 4.000 Å de outro fornecedor. A coluna da Agilent gerou uma variação de carregamento linear de 25 a 200 µg IgG3, enquanto a outra coluna pôde apenas gerar dados lineares entre 25 e 100 µg IgG3, como recomendado pela literatura

do outro fornecedor. A razão para não ter uma linha linear a uma variação de carregamento maior é porque a coluna não pôde reter todo o material com a variação de carregamento mais alta. Na verdade, a uma variação de carregamento de 200 µg, a coluna protein G do outro fornecedor teve um pico de rompimento de mAb (algum IgG3 não foi retido na coluna e eluído como um pico de fluxo contínuo), como mostrado na coluna 4B.

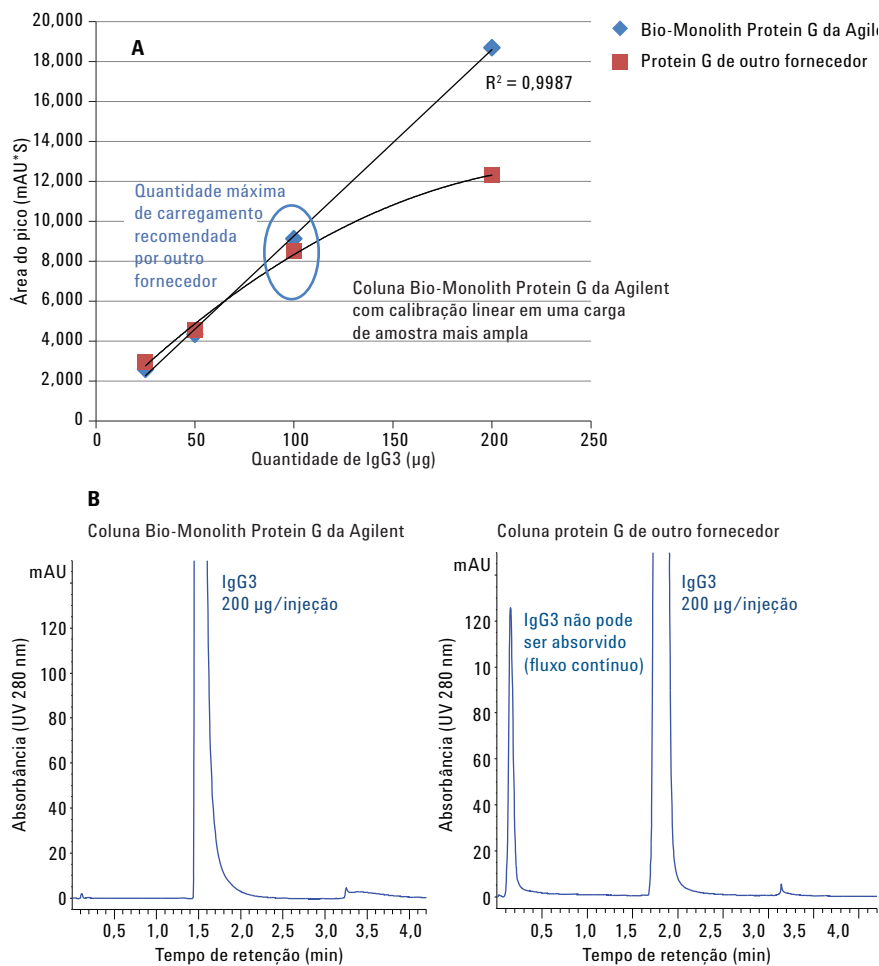


Figura 4. A) Comparação de variação de carregamento linear entre a coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent e a coluna protein G de outro fornecedor. B) Em um carregamento de 200 µl, a coluna do outro fornecedor mostra o fluxo contínuo que não é observado com a Bio-Monolith Protein G. Assim, a Bio-Monolith Protein G tem uma capacidade maior de carregamento.

Separações rápidas

A coluna Bio-Monolith Protein G foi projetada para separações rápidas. Sua capacidade de eluição e captura rápidas de mAb a várias taxas de fluxo é demonstrada com IgG3 na Figura 5, com taxas de fluxo de 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 ml/min (a coluna pode ser operada em até 3,0 ml/min,

dados não mostrados). A Tabela 2 mostra as taxas de fluxo e os gradientes operacionais. A retenção do pico de IgG3 foi reduzida quando a taxa de fluxo aumentou. No entanto, as áreas de pico relativo entre todas as taxas de fluxo foram similares. Isso indica que a coluna gerou recuperação semelhante em todas as taxas de fluxo (Tabela 3).

Tabela 2. Taxas de fluxo e gradientes operacionais usados em uma avaliação da capacidade de retenção da coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent.

Tempo (min)	%A	%B
1,0 mL/min		
0	100	0
0.4	100	0
0.5	0	100
1.7	0	100
1.8	100	0
4.2	100	0
1,5 mL/min		
0	100	0
0.3	100	0
0.4	0	100
1.3	0	100
1.4	100	0
3.0	100	0
2,0 mL/min		
0	100	0
0.2	100	0
0.3	0	100
0.9	0	100
1.0	100	0
2.1	100	0
2,5 mL/min		
0	100	0
0.1	100	0
0.3	0	100
0.7	0	100
0.8	100	0
1.7	100	0

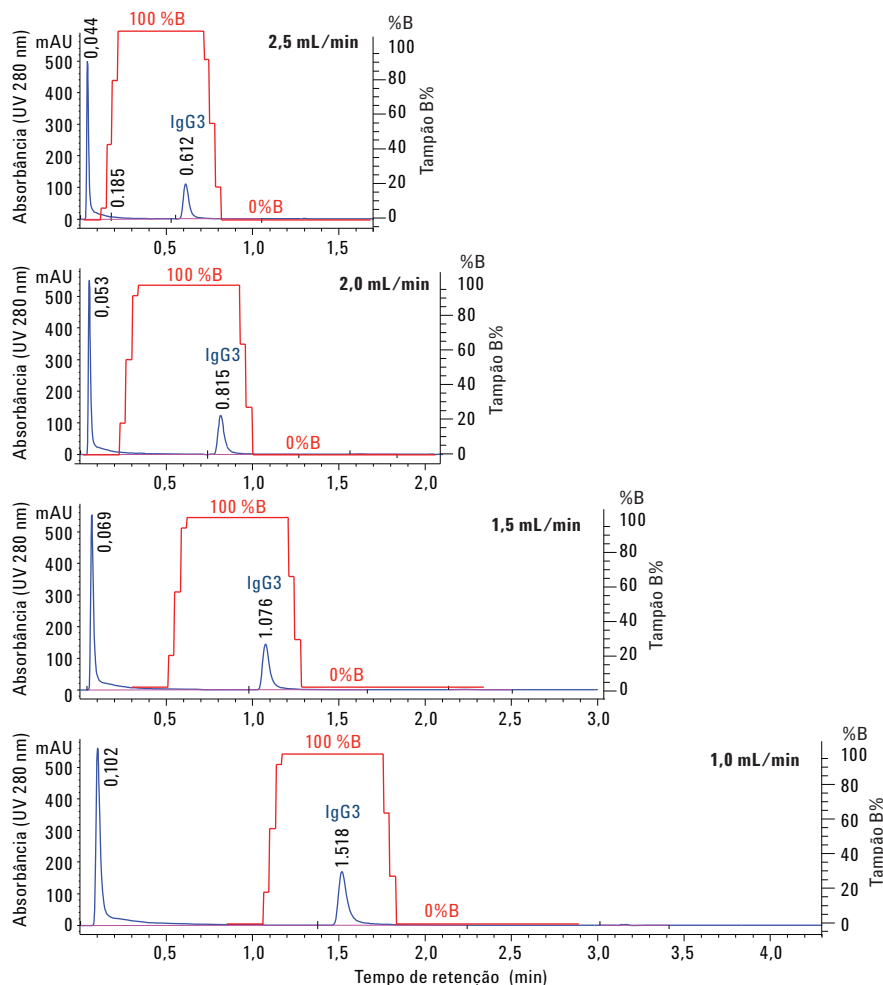


Figura 5. Ligação de IgG3 na coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent avaliada em várias taxas de fluxo. Injeção de 5 µl (2.0 mg/ml de IgG3 misturado com 5 mg/ml de proteínas hospedeiras células de CHO).

Tabela 3. A coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent fornece porcentagens relativas semelhantes de picos de IgG3 e fluxo contínuo para todas as taxas de fluxo.

Taxa de fluxo (ml/min)	Área total (mAu*U*S)	Área do pico de fluxo contínuo (mAu*S)	Área relativa do pico de fluxo contínuo (%)	Área do pico de IgG3 (mAu*S)	Área relativa do pico de IgG3 (%)
2.5	798	521	65.3	277	34.7
2.0	1,056	709	67.1	347	32.9
1.5	1,390	932	67.1	458	32.9
1.0	2,069	1392	67.3	677	32.7

A figura 6 mostra a linha de linearidade da pressão de retorno da coluna. Quando a coluna foi testada em intervalos de 0,5 ml/min, aumentando de um pra 2,5 ml/min a pressão de retorno aumentou linearmente. A coluna tem uma pressão de retorno máxima de 150 bar. Uma taxa de fluxo de separação típica da coluna Bio-Monolith Protein G é de 1,0 ml/min. Com a taxa de fluxo do instrumento definida a 1,0 ml/min, a pressão de retorno da coluna era de ~24 bar. Quando a taxa de fluxo foi aumentada para 2,5 ml/min, a pressão de retorno da coluna aumentou para ~60 bar. Houve efeito mínimo na ligação de IgG na coluna à pressão de retorno máxima, como indicado anteriormente.

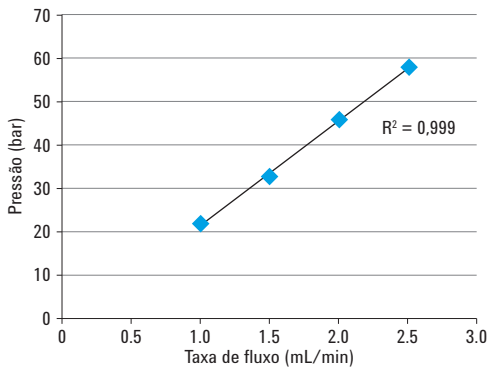


Figura 6. Taxa de fluxo em relação à contrapressão. A contrapressão da coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent aumentou linearmente quando a taxa de fluxo também aumentou linearmente.

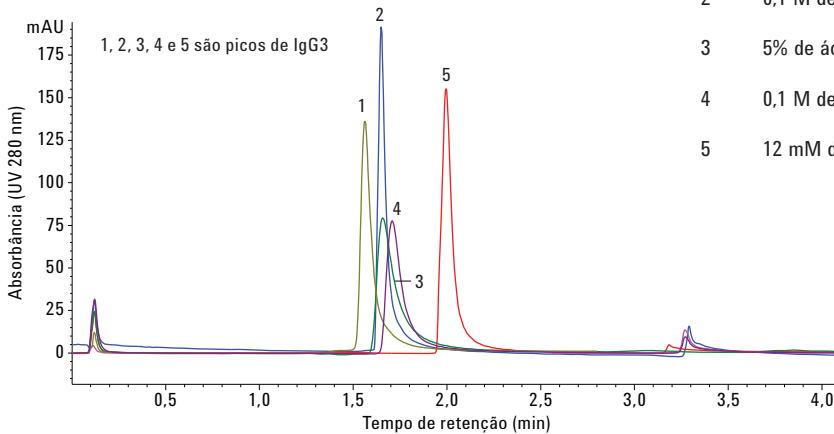


Figura 7. Pico de IgG3 humanizado eluído por diferentes eluentes ácidos da coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent.

A compatibilidade de tampões de eluição diferentes

A Figura 7 mostra compatibilidade com tampões de eluição diferentes para a coluna Bio-Monolith Protein G. O pico de IgG3 pode ser eluído por muitos eluentes ácidos diferentes. A Tabela 4 mostra as forças e o pH de eluentes ácidos. Esses eluentes puderam eluir IgG3 da coluna com tempos de retenção semelhantes (dados semelhantes também foram observados com outros IgGs), exceto com 12 mM HCl. A retenção do pico de IgG3 foi maior, em comparação com o tempo de retenção do pico de IgG3 eluído por outros tampões de eluição. Esse tampão de eluição, quando sua concentração foi aumentada para 0,1 M, ganhou força suficiente para eluir IgG3 com retenção semelhante a outros tampões de eluição.

Também vale notar que cada eluente ácido gerou um pico de IgG3 com fator de alargamento e largura do pico levemente diferentes. É sugerido que, dependendo do IgG, os eluentes ácidos e suas forças terão influências diferentes no tempo de retenção, assim como na largura do pico e no fator de alargamento. Portanto, dependendo do IgG e das expectativas dos dados, os eluentes ácidos e suas concentrações devem ser determinados experimentalmente.

Tabela 4. A compatibilidade e o efeito de eluentes ácidos diferentes em IgG.

Número de pico	Ácido	PW	5% TF	Pressão (bar) a 1 ml/min
1	0,1 M de ácido cítrico, pH 2,0	0.058	1.68	24
2	0,1 M de HCl	0.053	1.58	24
3	5% de ácido acético	0.071	1.85	24
4	0,1 M de glicina	0.075	1.82	24
5	12 mM de HCl	0.068	1.69	24

Recuperação do desempenho da coluna após a limpeza no local

A Figura 8 mostra que a coluna Bio-Monolith Protein G pode recuperar seu desempenho total após a limpeza no local (CIP). A coluna foi injetada com IgG3 depois de ter recebido mais de 1.000 injeções com IgG3 acrescido no lisado e sobrenadante de célula de CHO. Os dados mostram que, quando a coluna estava suja, a largura do pico de IgG3 era maior e a altura do pico foi reduzida (compare as Figuras 8A e 8B, antes e depois da limpeza no local). Os dados também mostram que alguns IgG3

não foram capturados pela coluna e foram eluídos como um pico de fluxo contínuo (Figura 8, Painel A). Após a limpeza da coluna, ela recuperou seu desempenho total e IgG3 foi totalmente capturado (consulte a Figura 8B). A Figura 9 mostra os dados de comparação de linearidade de uma ampla variação dinâmica de carregamento antes e depois de a coluna ter sido limpa. As áreas de pico de IgG3 de antes e depois da CIP eram muito comparáveis e altamente lineares. Os dados indicaram que a coluna foi limpa de maneira eficaz e compatível com o protocolo de limpeza descrito na Tabela 5.

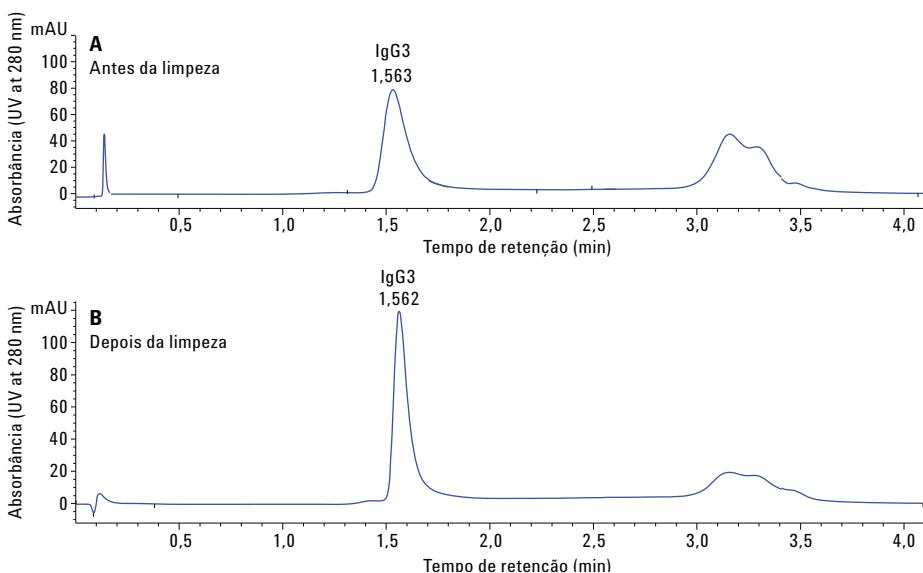


Figura 8. A) Coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent injetada com IgG3 após mais de 1.000 injeções. A coluna estava suja. B) A coluna foi limpa e recuperou seu desempenho total.

Tabela 5. Protocolo para limpeza no local da coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent. Para evitar que contaminantes entrem no resto da coluna, ela deve estar em uma direção de fluxo reverso para a primeira etapa a 0,2 a 0,5 ml/min.

Etapa	Solução	Volume da coluna de lavagem (CV)
1	0,1 M NaOH	10 a 20
2	Água deionizada	10 a 20
3	Tampão de fosfato de sódio de 0,5 M, pH 7,4	10 a 20
4	Reequilibrar a coluna com tampão de ligação	50

Em alguns casos, a simples regeneração da coluna monolítica não é suficiente. As moléculas de amostra podem não eluir completamente na coluna ou podem precipitar dentro dela. Esse acúmulo de contaminantes na coluna pode causar perda de resolução e de capacidade de ligação, pressão de retorno aumentada ou bloqueio completo. Um protocolo específico de CIP deve ser designado para o tipo de contaminantes presentes na amostra. Mais sugestões de regeneração são encontradas no guia de usuário.

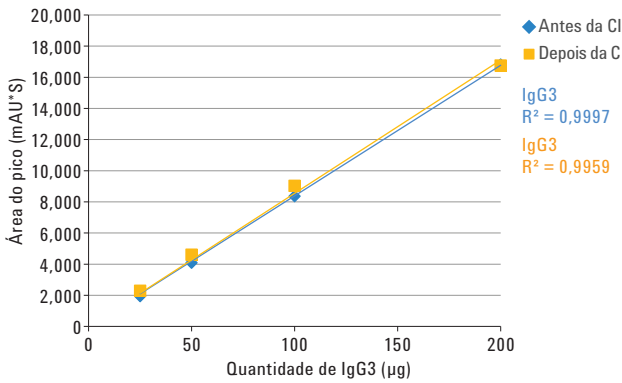


Figura 9. Comparação de linearidade fornecida pela coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent em uma ampla variedade de carregamento dinâmico e após a limpeza no local.

Tempo de vida e reprodutibilidade

As Figuras 10 e 11 mostram os resultados de 1.000 injeções consecutivas de IgG3 e sobrenadante de célula de CHO e lisado na coluna Bio-Monolith Protein G. A coluna recebeu 40 injeções com sobrenadante de célula de CHO e lisado, seguido por 10 injeções de IgG3. Essa sequência foi definida para 1.000 injeções continuamente sem parar para limpeza. A integridade do tempo de retenção do pico e da área do pico (Figura 9), assim como o fator de alargamento do pico e largura do pico (Figura 10), permaneceram praticamente inalteradas sem comprometer o desempenho da coluna em termos de capacidade de eluição, ligação e separação.

A Figura 11 mostra que a largura do pico e o fator de alargamento tiveram impacto mínimo durante o curso do estudo de 1.000 injeções.

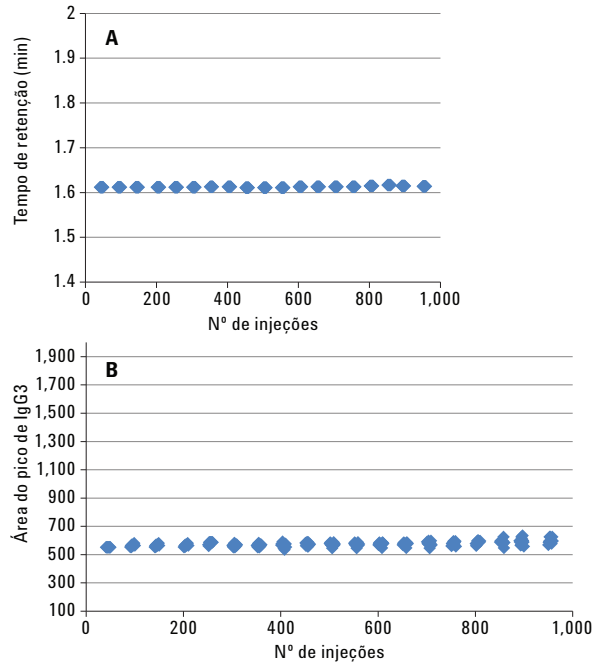


Figura 10. Reprodutibilidade da coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent em 1.000 injeções sem a limpeza no local. A) Tempo de retenção. B) Área do pico de IgG3. Dez injeções foram registradas após 40 injeções e mais de 1.000 injeções foram feitas. O tempo de retenção e largura do pico com IgG3 permaneceram inalterados (desvio padrão = 2,5, n = 100).

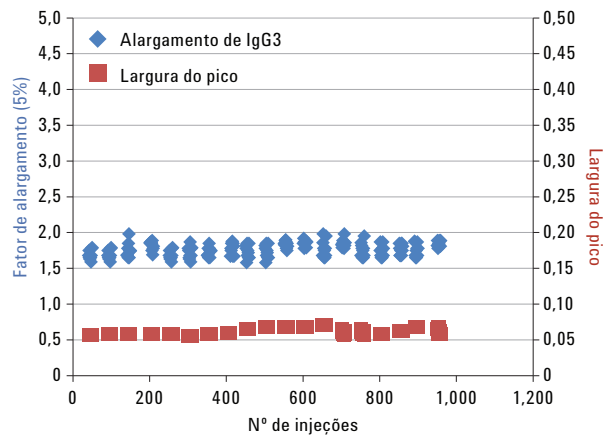


Figure 11. A consistência da largura do pico e do fator de alargamento do pico de IgG3 em 1.000 injeções na coluna Bio-Monolith Protein G da Agilent.

Conclusões

A coluna Agilent Bio-Monolith Protein G tem alta afinidade com subclasses de anticorpos monoclonais. É evidente que a coluna pode capturar e quantificar com precisão em uma ampla variedade de linearidade de carregamento de mAb a sobrenadantes. As colunas podem ser usadas de maneira eficaz para determinar a quantidade de anticorpos monoclonais com várias taxas de fluxo, sem sacrificar dados. A pressão de retorno operacional foi significativamente baixa, ilustrando que a coluna Bio-Monolith Protein G pode ser operada com instrumentos HPLC de <600 bar. A flexibilidade da coluna com diferentes eluentes ácidos permite design experimental fácil e direto. As colunas Bio-Monolith Protein A e G da Agilent são complementares, assim a coluna Protein G tem afinidade para mAbs que não se ligam à coluna Protein A e *vice versa*. Essas colunas fornecem mais opções para a determinação de titulação rápida para uma ampla gama de variáveis de mAb.

Referências

1. Richman, D. D.; Cleveland, P. H.; Oxman, M. N.; Johnson, K. M. The binding of 1. Staphylococci protein A by the sera of different animal species. *J. Immunol.* **1982**, *128*, 2300-2305.
2. Frank, M. B. Antibody Binding to Protein A and Protein G beads; 5. Em *Molecular Biology Protocols*; Frank, M. B., Ed.; Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA, **1997**.
3. Anon. CellLytic B Plus Kit. Números de catálogos CB0500 e CB0050. Boletim técnico. Sigma-Aldrich, Corp. St. Louis, MO, USA.

Mais informações

Estes dados representam os resultados típicos. Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o site www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Impresso nos EUA
29 de julho de 2015
5991-6094PTBR



Agilent Technologies