

FLUJO DE TRABAJO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS PRIMARIAS MEDIANTE LC DE FASE REVERSA

COLUMNAS AGILENT LC ADVANCEBIO RP-mAb



En este documento, los químicos de aplicaciones de Agilent comparten sus recomendaciones para un sistema de LC óptimo y su configuración para la caracterización de biomoléculas. También ofrecen consejos sobre un método general de inicio e indican cómo puede optimizarse este método para satisfacer sus objetivos específicos de separación. Encontrará información adicional de las aplicaciones en www.agilent.com/chem/advancebio

Sistema LC bioinerte Agilent 1260 Infinity

Directrices

Fase ligada: C4 y SB-C8 se utilizan de forma rutinaria. Para la selectividad alternativa, use la columna de difenil.

Gradiente: isopropanol:acetonitrilo:agua con ácido trifluoroacético al 0,1 % o ácido fórmico al 0,1 % para eluir todos los componentes de interés.

Solubilidad de la muestra: mezcla con fase móvil inicial.

Temperatura: una temperatura de columna superior puede mejorar drásticamente la resolución y la recuperación de proteínas.

Resolución/selectividad: una mezcla de isopropanol:acetonitrilo proporciona una mejor resolución. Se pueden usar otras sustituciones de disolventes orgánicos para obtener una selectividad diferente. El uso de isopropanol implica un incremento de la presión, que se puede compensar modificando la temperatura de columna y la velocidad de flujo.

Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, LC/MS

Desalinice las muestras de proteínas antes de la inyección.

Las columnas de d. i. pequeño (p. ej., de 2,1 mm) suelen ser la mejor opción con una velocidad de flujo de 0,5 a 1,0 ml/min.

El ácido fórmico proporciona mejores señales de MS. Use menos ácido trifluoroacético en el eluyente para mejorar las señales de MS, o bien utilice ácido acético.

El uso de isopropanol con acetonitrilo en la fase móvil proporciona picos más estrechos en el cromatograma de iones totales, TIC.

Fases móviles

Eluyente A: ácido trifluoroacético al 0,1 %
Eluyente B: isopropanol, acetonitrilo y agua con ácido trifluoroacético al 0,09 %

Bomba (G5611A)

La velocidad de flujo típica para las columnas de 2,1 mm de d.i. es de 1,0 ml/min.

Inyección de muestra (G5667A)

Inyección de 1 a 5 µl para muestras que contengan de 1 a 5 mg/ml de anticuerpos monoclonales. Las muestras se pueden disolver en agua o en el eluyente A.

Compartimento de la columna (G1316C)

Una temperatura habitual para conseguir una separación correcta es de 60 a 90 °C.

Detección (G1315D)

UV (210, 280 nm) con una celda de flujo estándar bioinerte de 10 mm.

**BIO
inert**



Selección de columnas

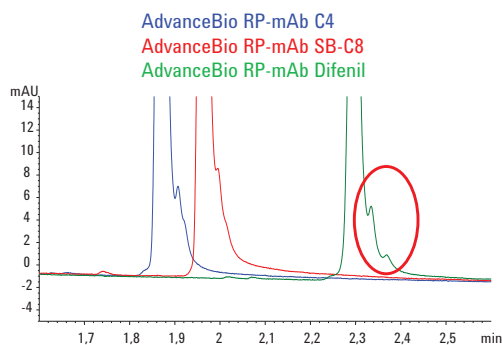
Columna	C4	SB-C8	Difenil
2,1 x 50 mm, 3,5 µm	799775-904	789775-906	799775-944
2,1 x 75 mm, 3,5 µm	797775-904	787775-906	797775-944
2,1 x 100 mm, 3,5 µm	795775-904	785775-906	795775-944
2,1 x 150 mm, 3,5 µm	793775-904	783775-906	793775-944
4,6 x 50 mm, 3,5 µm	799975-904	789975-906	799975-944
4,6 x 100 mm, 3,5 µm	795975-904	785975-906	795975-944
4,6 x 150 mm, 3,5 µm	793975-904	783975-906	793975-944



Agilent Technologies

Análisis de anticuerpos monoclonales inalterados

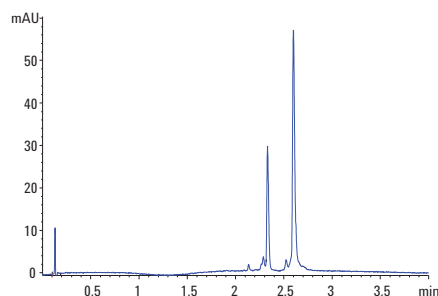
Separación rápida y de alta resolución



Columnas: 2,1 x 100 mm, 3,5 μ m
 Eluyente A: ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua e isopropanol (98:2)
 Eluyente B: isopropanol:acetonitrilo:eluyente A (70:20:10)
 Velocidad de flujo: 1,0 ml/min
 Gradiente: 10-58 % B durante 4 min, lavado durante 1 min con 95 % B, reequilibrado durante 1 min con 10 % B
 Inyección: 5 μ L (1 mg/ml)
 Muestra: anticuerpo IgG1 (Herceptin)
 Temperatura: 80 °C
 Detección: UV, 254 nm

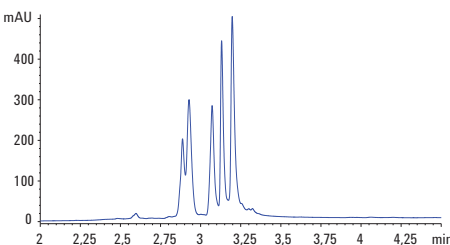
Análisis de fragmentos de anticuerpos monoclonales

Digestión química - cadena pesada/ligera



Columna: AdvanceBio RP-mAb difenil, 2,1 x 50 mm, 3,5 μ m
 Eluyente A: 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua
 Eluyente B: isopropanol:acetonitrilo:agua (70:20:10) + 0,09 % ácido trifluoroacético
 Velocidad de flujo: 1 ml/min
 Gradiente: 0 min, 15 % B; 0,5 min, 25 % B; 1,5 min, 35 % B; 1,51 min, 35 % B; 3 min, 60 % B; 4 min, 60 % B
 Inyección: 1 μ L (1 mg/ml) (reducción con TCEP)
 Muestra: Rituximab Innovator
 Temperatura: 80 °C
 Detección: UV, 220 nm

Digestión enzimática – regiones Fab/Fc

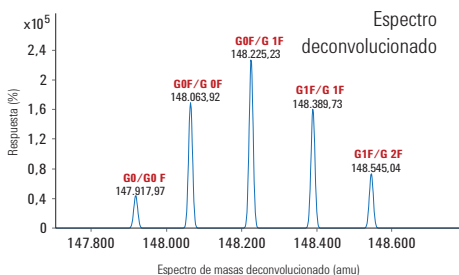
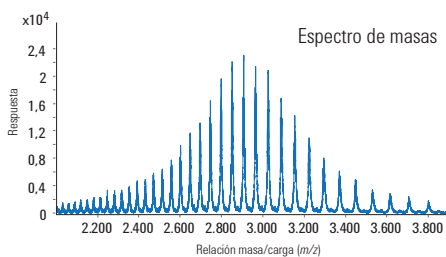
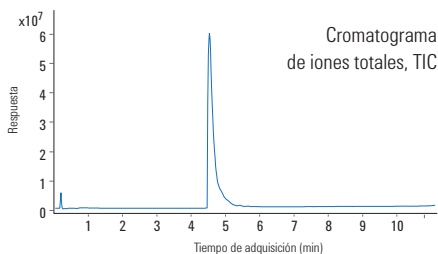


Columna: AdvanceBio RP-mAb C4, 2,1 x 100 mm, 3,5 μ m
 Eluyente A: 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua
 Eluyente B: n-propanol:acetonitrilo:eluyente A (80:10:10)
 Velocidad de flujo: 0,8 ml/min
 Gradiente: 5-40 % B durante 5 min, lavado durante 1 min con 95 % B, reequilibrado durante 1 min con 10 % B
 Inyección: 1 μ L (2 mg/ml)
 Muestra: anticuerpo IgG1 (Herceptin) digerido en papaina
 Temperatura: 60 °C
 Detección: UV, 220 nm

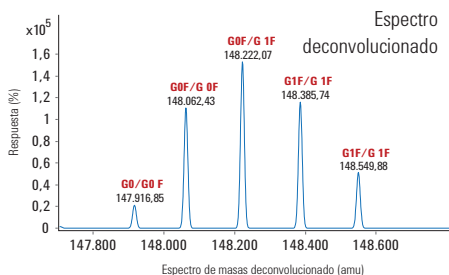
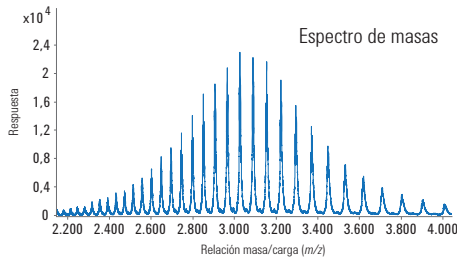
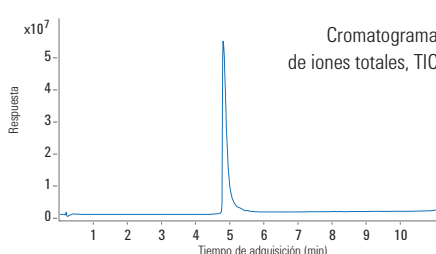
Análisis de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de anticuerpos monoclonales inalterados

Cromatografía rápida con excelente forma de pico y datos MS usando una fase móvil con ácido fórmico

AdvanceBio RP-mAb C4,
2,1 x 50 mm, 3,5 μ m



AdvanceBio RP-mAb difenil,
2,1 x 50 mm, 3,5 μ m



Eluyente A: 0,1 % ácido fórmico en agua
 Eluyente B: isopropanol:acetonitrilo:agua (80:10:9,9) + 0,1 % ácido fórmico
 Gradiente: 0 min, 20 % B; 4 min, 20 % B; 5 min, 40 % B; 10 min, 70 % B; 11 min, 90 % B; 11,1 min, 20 % B
 Velocidad de flujo: 0,6 ml/min
 Temperatura: 80 °C
 Inyección: 1 μ L (1 μ g/ μ L)
 Muestra: Innovator Herceptin
 Detección: sistema LC/MS Q-TOF de masa exacta Agilent 6530

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
 Impreso en EE. UU., 06 de octubre de 2015
 Número de publicación 5991-6321ES



Agilent Technologies