

FLUX DE TÂCHES DE CARACTÉRISATION DE STRUCTURES PRIMAIRES PAR LC EN PHASE INVERSE

COLONNES DE LC AGILENT ADVANCEBIO RP-mAb



Dans ce document, les chimistes en charge des applications d'Agilent font part de leurs recommandations pour obtenir un système LC optimal et le configurer pour la caractérisation des biomolécules. Ils vous proposent également une méthode générique pour débiter vos analyses, ainsi que la manière de l'optimiser, si nécessaire, pour répondre à vos besoins particuliers de séparation. Pour plus d'informations sur les applications, rendez-vous sur www.agilent.com/chem/advancebio

Système de LC Agilent 1260 Infinity Bio-Inert

Recommandations

Phase greffée : les phases C4 et SB-C8 sont couramment utilisées. Une colonne diphényl peut être utilisée pour une sélectivité différente.

Gradient : IPA:acétonitrile:eau avec TFA 0,1 % ou FA 0,1 % pour éluer tous les composants d'intérêt.

Solubilité de l'échantillon : mélanger dans la phase mobile de départ.

Température : une température de colonne plus élevée peut considérablement améliorer la résolution et le recouvrement de protéines.

Résolution/sélectivité : un mélange d'IPA:acétonitrile augmente la résolution. D'autres solvants organiques peuvent être utilisés pour modifier la sélectivité. L'utilisation d'IPA augmente la pression, qui peut être gérée avec la température de colonne et le débit.

LC/MS

Dessalez les échantillons de protéines avant injection.

Pour des débits de 0,5 à 1,0 mL/min, il est souvent préférable de choisir des colonnes de petit diamètre interne (p. ex. 2,1 mm).

De meilleurs signaux MS sont obtenus avec l'acide formique (FA). Pour optimiser les signaux MS, utilisez moins de TFA dans l'éluant, ou utilisez de l'acide acétique.

Une phase mobile contenant de l'IPA et de l'acétonitrile permet d'obtenir un chromatogramme d'ions totaux avec des pics plus étroits.

Phases mobiles

Éluant A : TFA 0,1 %

Éluant B : IPA, acétonitrile et TFA 0,09 % dans de l'eau

Pompe (G5611A)

Le débit typique pour les colonnes de diamètre interne de 2,1 mm est 1,0 mL/min.

Injection d'échantillons (G5667A)

Injection de 1 à 5 µL pour les échantillons contenant 1 à 5 mg/mL de mAb. Les échantillons peuvent être dissous dans l'eau ou dans l'éluant A.

Compartiment colonne (G1316C)

Une température de 60 à 90 °C est typiquement utilisée afin d'obtenir une bonne séparation.

Détection (G1315D)

UV (210, 280 nm) avec une cellule standard bio-inerte de 10 mm.

**BIO
inert**



Sélection de colonnes

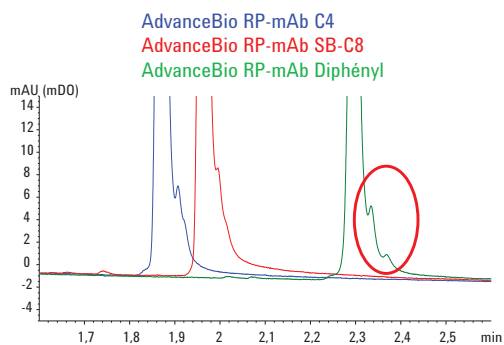
Colonne	C4	SB-C8	Diphényl
2,1 x 50 mm, 3,5 µm	799775-904	789775-906	799775-944
2,1 x 75 mm, 3,5 µm	797775-904	787775-906	797775-944
2,1 x 100 mm, 3,5 µm	795775-904	785775-906	795775-944
2,1 x 150 mm, 3,5 µm	793775-904	783775-906	793775-944
4,6 x 50 mm, 3,5 µm	799975-904	789975-906	799975-944
4,6 x 100 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

Analyse de mAb intacts

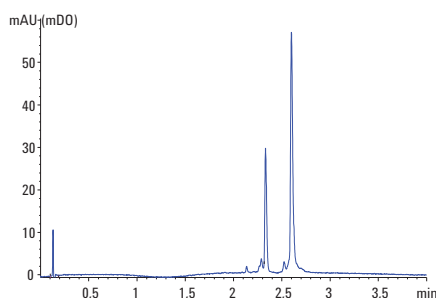
Séparation rapide de haute résolution



Colonnes : 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
 Éluant A : 0,1 % TFA dans l'eau:IPA (98:2)
 Éluant B : IPA:acétonitrile:éluant A (70:20:10)
 Débit : 1,0 mL/min
 Gradient : 10 à 58 % de B en 4 min, 1 min de rinçage à 95 % de B, 1 min de stabilisation à 10 % de B
 Injection : 5 µL (1 mg/mL)
 Échantillon : Herceptin, variant IgG1
 Température : 80 °C
 Détection : UV, 254 nm

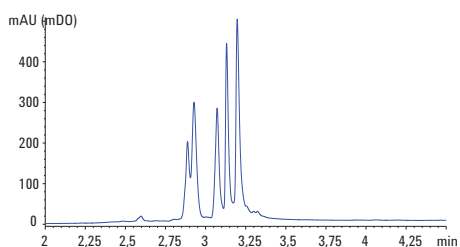
Analyse de fragment de mAb

Digestion chimique : chaîne lourde/chaîne légère



Colonne : AdvanceBio RP-mAb Diphényl, 2,1 x 50 mm, 3,5 µm
 Éluant A : 0,1 % de TFA dans l'eau
 Éluant B : IPA:acétonitrile:eau(70:20:10) + TFA à 0,09 %
 Débit : 1 mL/min
 Gradient : 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
 Injection : 1 µL (1 mg/mL) (réduction TCEP)
 Échantillon : Rituximab - médicament original
 Température : 80 °C
 Détection : UV, 220 nm

Digestion enzymatique, régions Fab/Fc

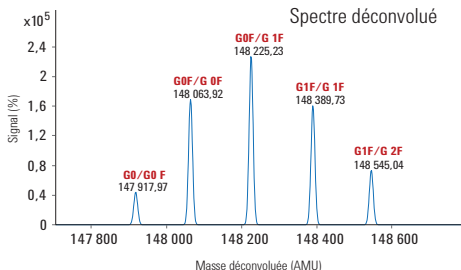
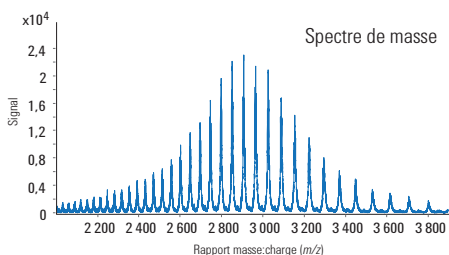
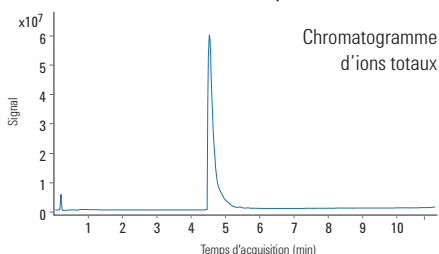


Colonne : AdvanceBio RP-mAb C4, 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
 Éluant A : 0,1 % de TFA dans l'eau
 Éluant B : n-propanol:acétonitrile:éluant A (80:10:10)
 Débit : 0,8 mL/min
 Gradient : 5 à 40 % de B en 5 min, 1 min de rinçage à 95 % de B, 1 min de stabilisation à 10 % de B
 Injection : 1 µL (2 mg/mL)
 Échantillon : Herceptin, variant IgG1, digéré à la papaine
 Température : 60 °C
 Détection : UV, 220 nm

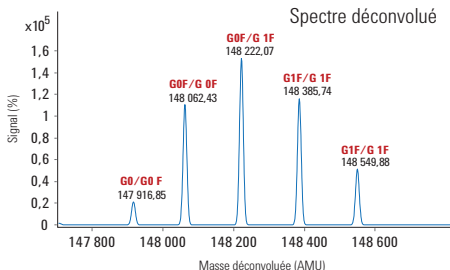
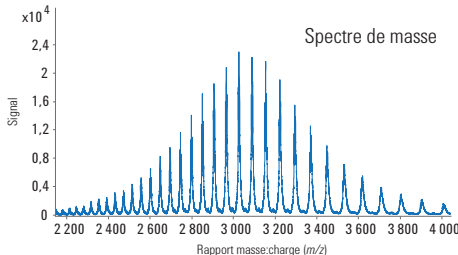
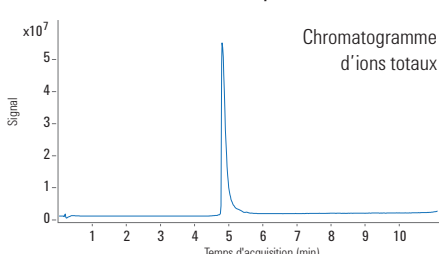
Analyse LC/MS de mAb intacts

Chromatographie rapide avec une forme de pic excellente et données MS avec une phase mobile contenant de l'acide formique

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



AdvanceBio RP-mAb Diphényl,
2,1 x 50 mm, 3,5 µm



Éluant A : 0,1 % de FA dans l'eau
 Éluant B : IPA:acétonitrile:eau (80:10:9.9) + FA à 0,1 %
 Gradient : 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
 Débit : 0,6 mL/min
 Température : 80 °C
 Injection : 1 µL (1 µg/µL)
 Échantillon : Herceptin - médicament original
 Détection : Système LC/MS Agilent Q-TOF série 6530 pour masse exacte

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
 Imprimé aux États-Unis, le 6 octobre 2015
 Numéro de publication 5991-6321FR



Agilent Technologies