

FLUSSO DI LAVORO PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLA STRUTTURA PRIMARIA TRAMITE CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA

COLONNE LC AGILENT ADVANCEBIO RP-mAb



In questo documento gli esperti di chimica applicata Agilent offrono alcuni consigli su un sistema LC ottimale e su come configurarlo per la caratterizzazione di biomolecole. Inoltre, forniscono utili indicazioni su un metodo generico iniziale e su come ottimizzarlo ulteriormente per ottenere specifici obiettivi di separazione.

Ulteriori informazioni sull'applicazione sono disponibili sul sito www.agilent.com/chem/advancebio

Sistema LC Bio-Inert Agilent 1260 Infinity

Linee guida

Fase legata: C4 e SB-C8 sono utilizzate per le separazioni di routine. Per una selettività alternativa utilizzare la colonna difenile.

Gradiente: IPA:acetonitrile:acqua con acido trifluoroacetico 0,1% o acido formico 0,1% per eluire i componenti di interesse.

Dissoluzione del campione: miscelare con la fase mobile iniziale.

Temperatura: una temperatura della colonna più alta può migliorare drasticamente risoluzione e recupero di proteine.

Risoluzione/selettività: una miscela di IPA:acetonitrile migliora la risoluzione. È possibile utilizzare altri solventi organici per variare la selettività. L'uso di IPA provoca un aumento della pressione, che può essere gestito variando la temperatura della colonna e la velocità di flusso.

LC/MS

Desalinizzare i campioni di proteine prima dell'iniezione.

Colonne di diametro interno ridotto (per esempio 2,1 mm) spesso sono la scelta ideale con una velocità di flusso compresa tra 0,5 e 1,0 mL/min.

L'acido formico migliora i segnali MS. Ridurre il contenuto di acido trifluoroacetico nell'eluente per incrementare i segnali MS; in alternativa, utilizzare AcOH.

Una miscela di IPA e acetonitrile nella fase mobile migliora la definizione dei picchi in un cromatogramma ionico totale.

Fasi mobili

Eluente A: acido trifluoroacetico 0,1%

Eluente B: IPA, acetonitrile e acqua con acido trifluoroacetico 0,09%

Pompa (G5611A)

La velocità di flusso tipica per le colonne con diametro interno di 2,1 mm è pari a 1,0 mL/min

Iniezione di campione (G5667A)

Iniezioni da 1 a 5 µL di campioni contenenti da 1 a 5 mg/mL di mAb. I campioni possono essere disciolti in acqua o nell'eluente A.

Comparto colonne (G1316C)

La temperatura tipica di una separazione efficace è compresa tra 60 e 90 °C

Rivelazione (G1315D)

UV (210, 280 nm) con cella di flusso standard bio-inert da 10 mm

**BIO
inert**



Selezione colonna

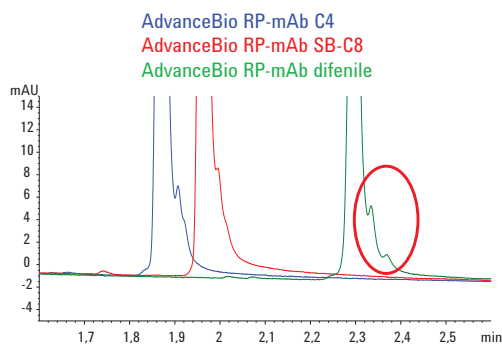
Colonna	C4	SB-C8	Difenile
2,1 x 50 mm, 3,5 µm	799775-904	789775-906	799775-944
2,1 x 75 mm, 3,5 µm	797775-904	787775-906	797775-944
2,1 x 100 mm, 3,5 µm	795775-904	785775-906	795775-944
2,1 x 150 mm, 3,5 µm	793775-904	783775-906	793775-944
4,6 x 50 mm, 3,5 µm	799975-904	789975-906	799975-944
4,6 x 100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

Analisi di mAb intatti

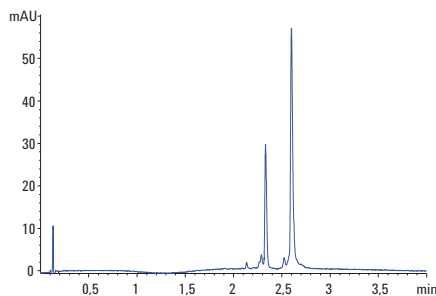
Separazione rapida e ad alta risoluzione



Colonne: 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Eluente A: acido trifluoroacetico 0,1% in acqua:IPA (98:2)
Eluente B: IPA:acetonitrile:eluente A (70:20:10)
Velocità di flusso: 1,0 mL/min
Gradiente: 10-58% B in 4 min, lavaggio 1 min a 95% B, riequilibrio 1 min a 10% B
Iniezione: 5 µL (1 mg/mL)
Campione: variante IgG1 di Herceptin
Temperatura: 80 °C
Rivelazione: UV, 254 nm

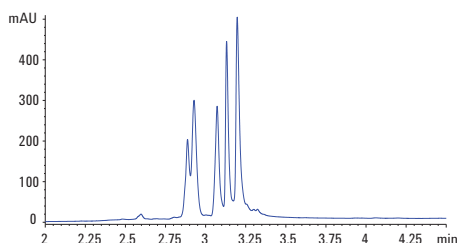
Analisi di frammenti mAb

Digestione chimica: catena pesante/catena leggera



Colonna: AdvanceBio RP-mAb difenile, 2,1 x 50 mm, 3,5 µm
Eluente A: acido trifluoroacetico 0,1% in acqua
Eluente B: IPA:acetonitrile:acqua (70:20:10) + acido trifluoroacetico 0,09%
Velocità di flusso: 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
Iniezione: 1 µL (1 mg/mL) (riduzione con TCEP)
Campione: farmaco originale Rituximab
Temperatura: 80 °C
Rivelazione: UV, 220 nm

Digestione enzimatica: regioni Fab/Fc

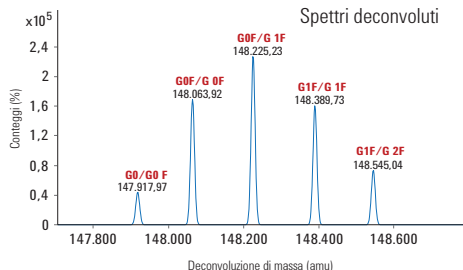
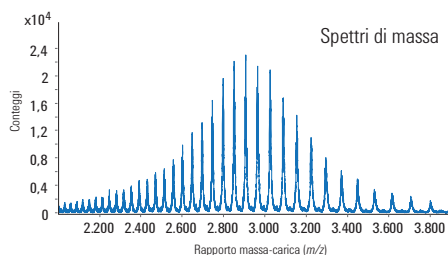
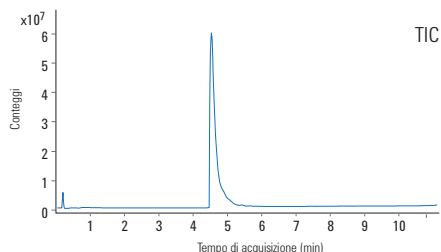


Colonna: AdvanceBio RP-mAb C4, 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Eluente A: acido trifluoroacetico 0,1% in acqua
Eluente B: n-propanolo:acetonitrile:eluente A (80:10:10)
Velocità di flusso: 0,8 mL/min
Gradiente: 5-40% B in 5 min, lavaggio 1 min a 95% B, riequilibrio 1 min a 10% B
Iniezione: 1 µL (2 mg/mL)
Campione: variante IgG1 di Herceptin: digestione con papaina
Temperatura: 60 °C
Rivelazione: UV, 220 nm

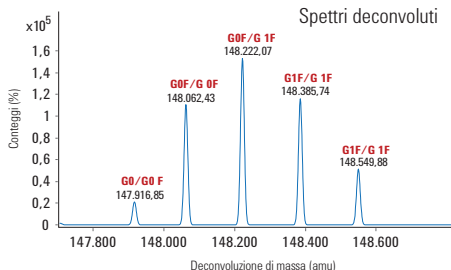
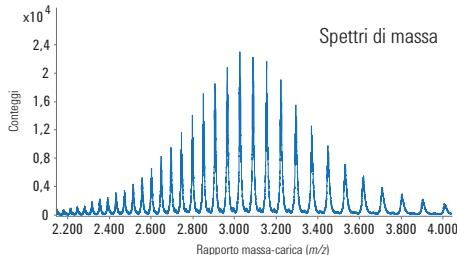
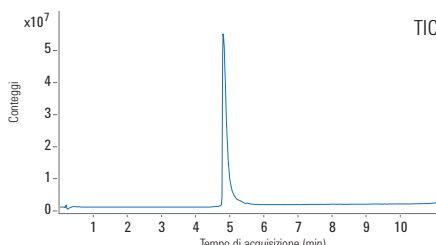
Analisi LC/MS di mAb intatti

Cromatografia rapida con eccellente forma dei picchi e ottima qualità dei dati MS utilizzando una fase mobile a base di acido formico

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



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



Eluente A: acido formico 0,1% in acqua
Eluente B: IPA:acetonitrile:acqua (80:10:9,9) + acido formico 0,1%
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
Velocità di flusso: 0,6 mL/min
Temperatura: 80 °C
Iniezione: 1 µL (1 µg/µL)
Campione: farmaco originale Herceptin
Rivelazione: LC/MS Accurate-Mass Q-TOF Agilent serie 6530

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Stampato negli Stati Uniti 6 ottobre 2015
5991-6321ITE



Agilent Technologies