

FLUXO DE TRABALHO DE CARACTERIZAÇÃO DE ESTRUTURA PRIMÁRIA POR MEIO DE LC DE FASE REVERSA

COLONAS DE LC ADVANCEBIO RP-mAb AGILENT



Neste documento, os químicos de aplicações da Agilent compartilham suas recomendações para obter um sistema LC otimizado e a configuração para a caracterização de biomoléculas. Eles também oferecem orientações sobre um método genérico para você começar e como este método pode atender a seus requisitos específicos de separação. Outras informações de aplicação estão disponíveis em www.agilent.com/chem/advancebio

Sistema LC Agilent 1260 Infinity Bio-inert

Condições analíticas

Coluna cromatográfica: C4 e SB-C8 são usados rotineiramente. Para obter seletividade alternativa use a coluna de difenil.

Gradiente: IPA:ACN:água com 0,1% TFA ou 0,1% FA para eluir todos os componentes de interesse.

Solubilidade da amostra: misturar com a fase móvel inicial.

Temperatura: a temperatura mais alta da coluna pode aumentar bastante a resolução e a recuperação de proteínas.

Resolução/seletividade: uma mistura de IPA:ACN oferece melhor resolução. Outros solventes orgânicos podem ser usados para obter seletividade diferenciada. O uso de IPA aumenta a pressão, que pode ser controlada pela temperatura e taxa de fluxo da coluna.

LC/MS

Dessalinizar as amostras de proteína antes da injeção.

Colunas com diâmetro interno pequeno (ex: 2,1 mm) geralmente são a melhor opção com uma taxa de fluxo de 0,5 a 1,0 mL/min.

FA fornece melhores sinais de MS. Use menos TFA no eluente para melhorar os sinais de MS ou use AcOH.

IPA com ACN na fase móvel proporciona picos de TIC mais acentuados.

Fases móveis

Eluente A: 0,1% TFA Eluente B: IPA, ACN e água com 0,09% TFA

Bomba (G5611A)

A taxa de fluxo típica para colunas com diâmetro interno de 2,1 mm é de 1,0 mL/min

Injeção de amostra (G5667A)

Injeção de 1 a 5 µL para amostras contendo de 1 a 5 mg/mL de mAb. As amostras podem ser dissolvidas em água ou eluente A.

Compartimento da coluna (G1316C)

De 60 a 90 °C é uma temperatura típica para uma boa separação

Deteção (G1315D)

UV (210, 280 nm) com cela de fluxo padrão Bio-inert de 10 mm.

**BIO
inert**



Seleção da coluna

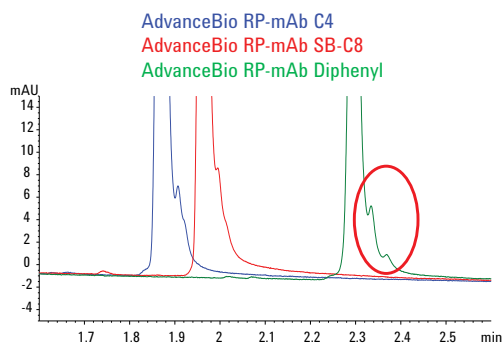
Coluna	C4	SB-C8	Difenil
2,1 x 50 mm, 3,5 µm	799775-904	789775-906	799775-944
2,1 x 75 mm, 3,5 µm	797775-904	787775-906	797775-944
2,1 x 100 mm, 3,5 µm	795775-904	785775-906	795775-944
2,1 x 150 mm, 3,5 µm	793775-904	783775-906	793775-944
4,6 x 50 mm, 3,5 µm	799975-904	789975-906	799975-944
4,6 x 100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

Análise de mAb intacto

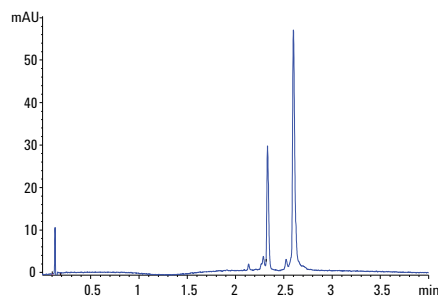
Separação rápida e de alta resolução



Colunas: 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
 Eluente A: 0,1% TFA em água:IPA (98:2)
 Eluente B: IPA:ACN:Eluente A (70:20:10)
 Taxa de fluxo: 1,0 mL/min.
 Gradiente: 10-58% B em 4 min, lavagem de 1 min a 95% B, reequilíbrio em 1 min a 10% B
 Injeção: 5 µL (1 mg/mL)
 Amostra: Variante de herceptina IgG1
 Temperatura: 80 °C
 Detecção: UV, 254 nm

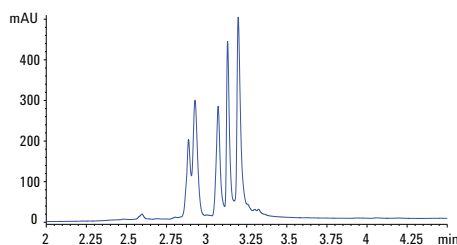
Análise de fragmentos de mAb

Digestão química – cadeia pesada/cadeia leve



Coluna: AdvanceBio RP-mAb difenil, 2,1 x 50 mm, 3,5 µm
 Eluente A: 0,1% TFA em água
 Eluente B: IPA:ACN:água (70:20:10) + 0.09 % TFA
 Taxa de fluxo: 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
 Injeção: 1 µL (1 mg/mL) (redução TECP)
 Amostra: Inovador rituximab
 Temperatura: 80 °C
 Detecção: UV, 220 nm

Digestão enzimática – Regiões Fab/Fc

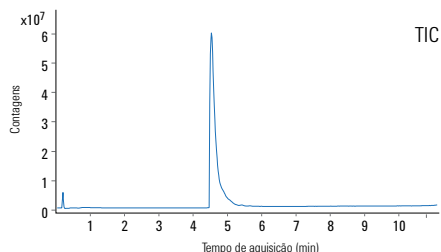


Coluna: AdvanceBio RP-mAb C4, 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
 Eluente A: 0,1% TFA em água
 Eluente B: n-Propanol:ACN:eluente A (80:10:10)
 Taxa de fluxo: 0,8 mL/min
 Gradiente: 5-40% B em 5 min, lavagem de 1 min a 95% B, reequilíbrio em 1 min a 10% B
 Injeção: 1 µL (2 mg/mL)
 Amostra: IgG1 variante de herceptina – digerida por papaína
 Temperatura: 60 °C
 Detecção: UV, 220 nm

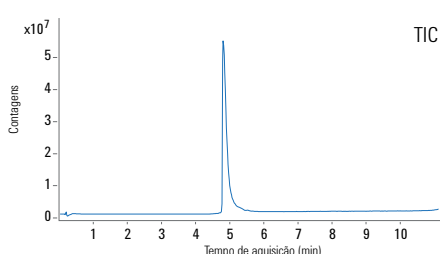
Análise de LC/MS de mAbs intactos

Cromatografia rápida com formato do pico excelente e dados de MS usando fase móvel de ácido fórmico.

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

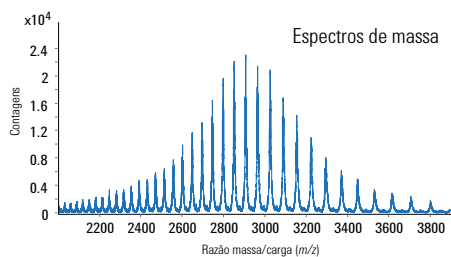


AdvanceBio RP-mAb Diphenyl,
2,1 x 50 mm, 3,5 µm

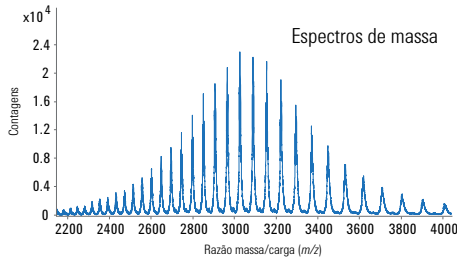


Eluente A: 0,1% FA em água
 Eluente B: IPA:ACN:água (80:10:9.9) + 0,1% FA
 Gradiente: 0 min, 20% B; 4 min, 20% B; 5 min, 40% B; 10 min, 70% B; 11 min, 90% B; 11,1 min, 20% B
 Taxa de fluxo: 0,6 mL/min
 Temperatura: 80 °C
 Injeção: 1 µL (1 µg/mL)
 Amostra: Herceptina inovadora
 Detecção: Q-TOF LC/MS

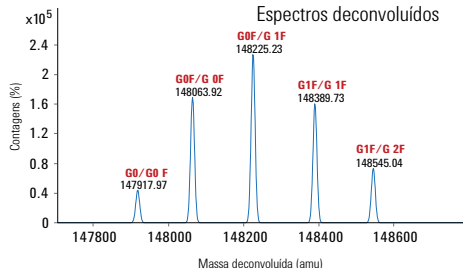
Espectros de massa



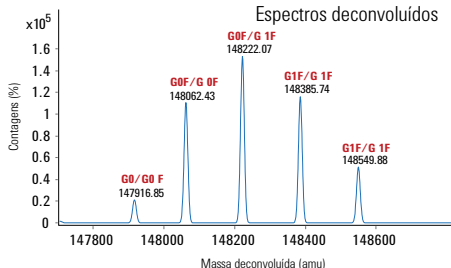
Espectros de massa



Espectros deconvolvidos



Espectros deconvolvidos



Essas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
 Impresso nos EUA, 06 de outubro de 2015
 Número de publicação 5991-6321PTBR



Agilent Technologies