

ПРОЦЕСС ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ С ПОМОЩЬЮ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ КОЛОНКИ AGILENT LC ADVANCEBIO RP-mAb



В данном документе специалисты компании Agilent по прикладной химии делятся рекомендациями по выбору оптимальной конфигурации системы ВЭЖХ и ее настройке для выполнения характеристики биомолекул. Также они описывают общий метод подготовки к началу работы и дальнейшую оптимизацию для конкретных целей разделения. Дополнительные методические сведения см. на веб-сайте www.agilent.com/chem/advancebio

Система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity Bio-inert

Рекомендации

Привитая фаза: обычно используются C4 и SB-C8. Чтобы получить альтернативную селективность, используйте колонки с дифенилом.

Градиент: для элюирования целевых компонентов используется смесь изопропилового спирта:ацетонитрил:вода с 0,1% ТФУК или 0,1% муравьиной кислоты.

Растворение пробы: смешать с начальной подвижной фазой.

Температура: повышение температуры колонки может значительно улучшить разрешение и степень извлечения белков.

Разрешение и селективность: смесь изопропилового спирта:ацетонитрил обеспечивает улучшение разрешения. Для изменения селективности можно использовать другие органические растворители. Использование изопропилового спирта приводит к повышению давления, что можно компенсировать изменением температуры колонки и скорости потока.

ЖХ-МС

Обессолте пробы белков перед вводом.

При скорости потока от 0,5 до 1,0 мл/мин наилучшим образом подходят колонки с небольшим внутренним диаметром (например, 2,1 мм).

Использование муравьиной кислоты улучшает сигнал масс-спектрометра. Для улучшения сигнала масс-спектрометра уменьшите содержание ТФУК в элюенте или используйте уксусную кислоту.

Изопропиловый спирт с ацетонитрилом в подвижной фазе обеспечивают более острые пики на общей ионной хроматограмме.

Подвижные фазы

Элюент А: 0,1%-й раствор ТФУК

Элюент Б: изопропиловый спирт, ацетонитрил и вода с 0,09% ТФУК

Насос (G5611A)

Стандартная скорость потока для колонок с внутренним диаметром 2,1 мм составляет 1,0 мл/мин.

Ввод пробы (G5667A)

Ввод 1–5 мкл для проб, содержащих от 1 до 5 мг/мл моноклональных антител. Пробы можно растворять в воде или элюенте А.

Термостат колонок (G1316C)

Для эффективного разделения обычно используют температуру от 60 до 90 °C.

Детектирование (G1315D)

УФ-детектор (210, 280 нм) со стандартной биоинертной проточной кюветой 10 мм.

**BIO
inert**



Выбор колонки

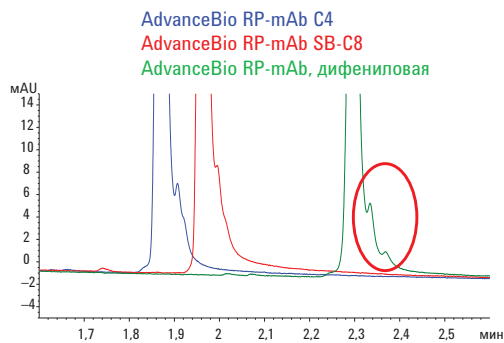
Колонка	C4	SB-C8	Дифениловая
2,1 x 50 мм, 3,5 мкм	799775-904	789775-906	799775-944
2,1 x 75 мм, 3,5 мкм	797775-904	787775-906	797775-944
2,1 x 100 мм, 3,5 мкм	795775-904	785775-906	795775-944
2,1 x 150 мм, 3,5 мкм	793775-904	783775-906	793775-944
4,6 x 50 мм, 3,5 мкм	799975-904	789975-906	799975-944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



Agilent Technologies

Анализ интактных моноклональных антител

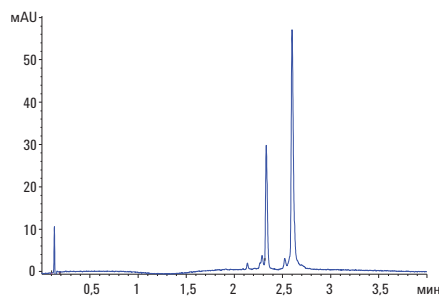
Быстрое разделение с высоким разрешением



Колонки: 2,1 x 100 мм, 3,5 мкм
Элюент А: 0,1% ТБУК в смеси вода:изопропиловый спирт (98:2)
Элюент Б: изопропиловый спирт:ацетонитрил:элюент А (70:20:10)
Скорость потока: 1,0 мл/мин
Градиент: 10–58% Б за 4 мин, 1 мин промывки с 95% Б, 1 мин повторного уравнивания с 10% Б
Вводимый объем: 5 мкл (1 мг/мл)
Проба: вариант герцептина IgG1
Температура: 80 °C
Детектирование: УФ, 254 нм

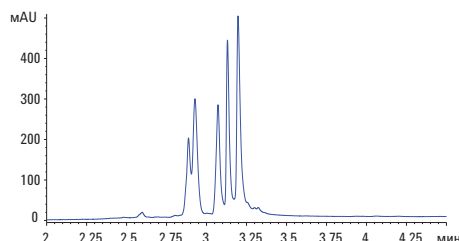
Анализ фрагментов моноклональных антител

Химическое расщепление — тяжелая цепь/легкая цепь



Колонка: AdvantBio RP-mAb Diphenyl, 2,1 x 50 мм, 3,5 мкм
Элюент А: 0,1% ТБУК в воде
Элюент Б: изопропиловый спирт:ацетонитрил:вода (70:20:10) + 0,09% ТБУК
Скорость потока: 1 мл/мин
Градиент: 0 мин, 15% Б; 0,5 мин, 25% Б; 1,5 мин, 35% Б; 1,51 мин, 35% Б; 3 мин, 60% Б; 4 мин, 60% Б
Вводимый объем: 1 мкл (1 мг/мл) (уменьшение ТСЕР)
Проба: оригинальный ритуксимаб
Температура: 80 °C
Детектирование: УФ, 220 нм

Ферментное расщепление — Fab/Fc-фрагменты

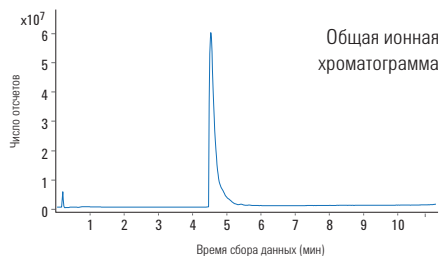


Колонка: AdvantBio RP-mAb C4, 2,1 x 100 мм, 3,5 мкм
Элюент А: 0,1% ТБУК в воде
Элюент Б: н-пропанол:ацетонитрил:элюент А (80:10:10)
Скорость потока: 0,8 мл/мин
Градиент: 5–40% Б за 5 мин, 1 мин промывки с 95% Б, 1 мин повторного уравнивания с 10% Б
Вводимый объем: 1 мкл (2 мг/мл)
Проба: вариант герцептина IgG1 (расщепленный папаином)
Температура: 60 °C
Детектирование: УФ, 220 нм

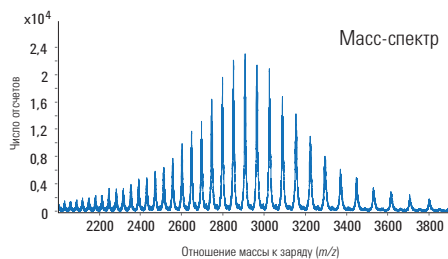
ЖХ-МС-анализ интактных моноклональных антител

Быстрый хроматографический анализ с отличной формой пиков и прекрасным качеством результатов масс-спектрометрии при использовании подвижной фазы муравьиной кислоты

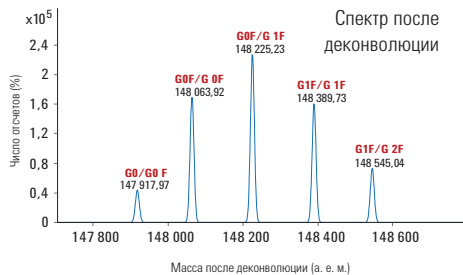
AdvantBio RP-mAb C4,
2,1 x 50 мм, 3,5 мкм



Общая ионная
хроматограмма

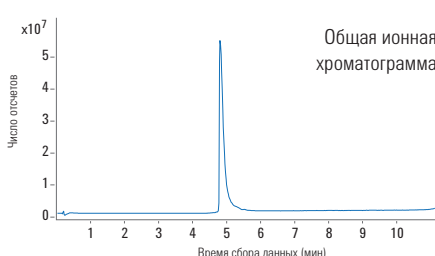


Масс-спектр

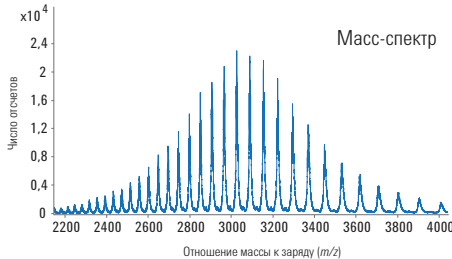


Спектр после
деконволюции

AdvantBio RP-mAb, дифениловая,
2,1 x 50 мм, 3,5 мкм



Общая ионная
хроматограмма



Масс-спектр



Спектр после деконволюции

Элюент А: 0,1% муравьиной кислоты в воде
Элюент Б: изопропиловый спирт:ацетонитрил:вода (80:10:9,9) + 0,1% муравьиной кислоты
Градиент: 0 мин, 20% Б; 4 мин, 20% Б; 5 мин, 40% Б; 10 мин, 70% Б; 11 мин, 90% Б; 11,1 мин, 20% Б
Скорость потока: 0,6 мл/мин
Температура: 80 °C
Вводимый объем: 1 мкл (1 мкг/мкл)
Проба: оригинальный герцептин
Детектирование: квадрупольно-временапролетный ВЭЖХ-МС Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF

Информация в этом документе может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Напечатано в США 6 октября 2015 г.
Номер публикации 5991-6321RU



Agilent Technologies