

Columnas BioHPLC Agilent de intercambio iónico

CARACTERICE VARIANTES CARGADAS DE PROTEÍNAS CON RAPIDEZ Y CONFIANZA

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

Ahora dispone de más *columnas* y más *opciones* para mejorar su análisis de variante de carga de proteínas

El intercambio iónico (IEX) es una técnica decisiva que se utiliza para separar las proteínas y los bioterapéuticos. Como ocurre con la SEC, el IEX puede usarse para separar proteínas en su estado nativo. Además, resulta útil como técnica preparativa para purificar y aislar estas proteínas.

Durante la producción y la purificación, los anticuerpos pueden mostrar cambios en la heterogeneidad de carga, provocados por sustituciones de aminoácidos, glucosilación, fosforilación y otras modificaciones químicas o postralesionales.

En el análisis de proteínas, las variaciones cargadas en un pH específico indican un cambio en la estructura molecular primaria, que genera formas adicionales de la proteína en cuestión. Estas formas reciben el nombre de isoformas (o variantes cargadas) y pueden resolverse mediante cromatografía de IEX.

El análisis de las variantes cargadas es fundamental para los biofármacos, ya que estos cambios pueden afectar a la estabilidad y actividad, o provocar reacciones inmunológicamente adversas.

Agilent puede ayudarle a separar y caracterizar las biomoléculas con nuestra gama de columnas BioHPLC de intercambio iónico

Tanto si su propósito es caracterizar el siguiente biofármaco o aislar una proteína objetivo, Agilent puede ayudarle a superar los desafíos del aislamiento y la identificación de variantes cargadas de proteínas.

Nuestras columnas BioHPLC de intercambio iónico se han diseñado y probado para proporcionar a su laboratorio:

- **Altos niveles de eficacia y reproducibilidad.**
- **Separaciones rápidas y de alta resolución.**
- **Métodos más sólidos.**
- **La amplia gama de tamaños de poro le permite separar eficazmente proteínas y variantes cargadas de cualquier tamaño.**
- **Mínimo riesgo de contaminación de la columna al capturar muestras complejas.**

Como proveedor líder de la industria biofarmacéutica, Agilent entiende que la calidad y la uniformidad son valores clave para poder ofrecer productos terapéuticos seguros y eficientes. Las columnas BioHPLC Agilent de intercambio iónico ofrecen la rapidez, la resolución y la reproducibilidad que necesita para hacer llegar productos que pueden cambiar vidas a las personas que los necesitan, de forma rápida y asequible.

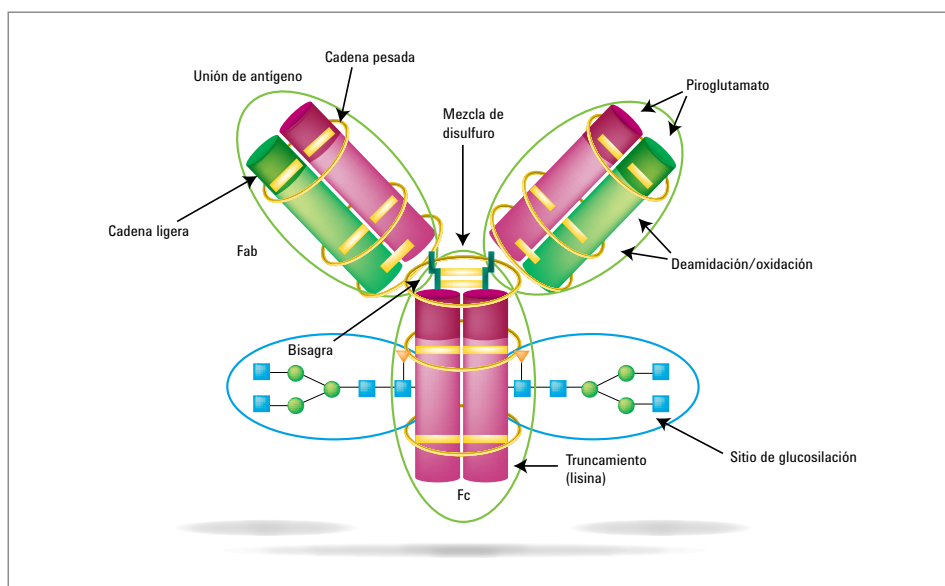
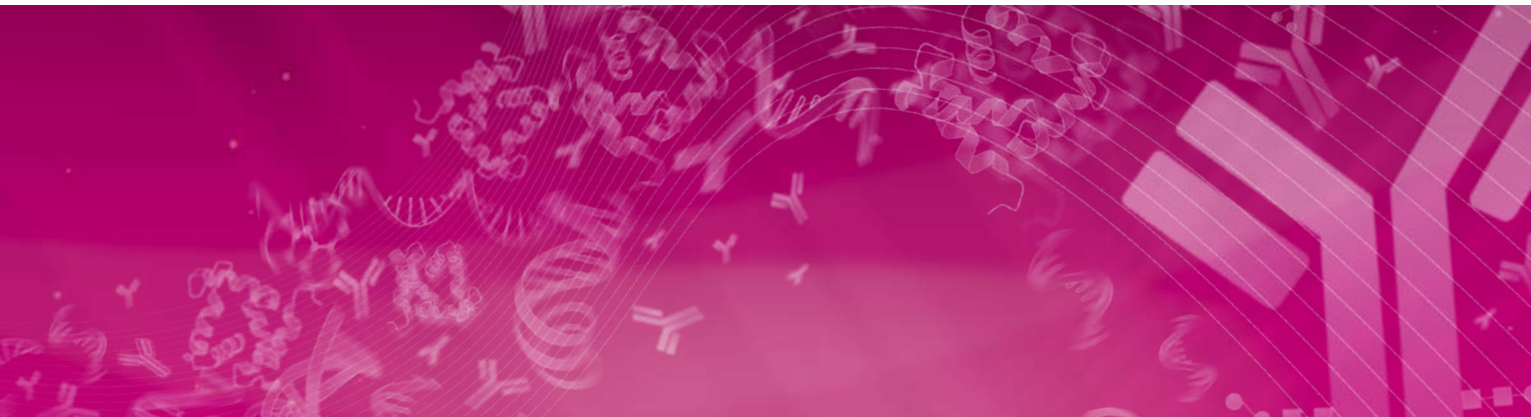


Figura 1. Las Variantes cargadas de anticuerpos monoclonales surgen a través de distintos niveles de glucosilación, deamidación y oxidación de aminoácidos y a través de truncamiento de lisina de cadenas pesadas.

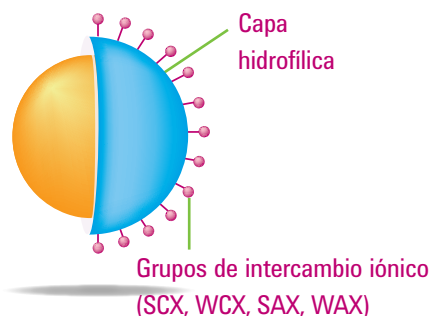
Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

CONTENIDO: Nuestra completa gama de columnas BioHPLC de intercambio iónico para las aplicaciones de biomoléculas de vanguardia

Proteínas y péptidos: columnas Agilent Bio IEX.....	4
Anticuerpos monoclonales: columnas Agilent Bio MAb	8
Separaciones de macrobiomoléculas: columnas Agilent Bio-Monolith	12
Oligonucleótidos sintéticos: columnas Agilent PL-SAX.....	14
Solutos y biomoléculas diversos: columnas Agilent PL-SCX.....	16
Información para pedidos de columnas	18
Software e instrumentos de LC para aplicaciones de biomoléculas.....	22

SEPARACIONES POR CARGA DE ALTA RESOLUCIÓN DE PROTEÍNAS, PÉPTIDOS Y MUCHO MÁS

Partícula Bio IEX



Las columnas Agilent Bio IEX HPLC tienen partículas de intercambio iónico poliméricas y no porosas, gracias a las cuales ofrecen alta recuperación, separaciones de alta eficacia de péptidos, oligonucleótidos y proteínas.

- **Resultados precisos:** ausencia de unión no específica, debido a que una capa hidrofílica polimérica se ha injertado a partículas de poli(estireno-divinilbenceno) altamente ligadas, rígidas y no porosas.
- **Más rapidez y resolución:** las partículas pequeñas, el recubrimiento y los enlaces resisten a las altas presiones.
- **Aumento de la capacidad de la columna:** los grupos funcionales de intercambio iónico uniformes y empaquetados densamente se enlazan químicamente con la capa hidrofílica.
- **Métodos más sólidos** cuando se utilizan con el software Agilent Buffer Advisor y la LC cuaternaria Bio-Inerte Infinity 1260.
- **Opciones para ayudarle a perfeccionar su separación:** adecuado para cualquier separación de proteínas, con cuatro tipos distintos de intercambio iónico: WCX, WAX, SCX, SAX.

Reduzca el tiempo de análisis con partículas más pequeñas y longitudes de columna más cortas. Procesos de separación un 30 % más rápidos

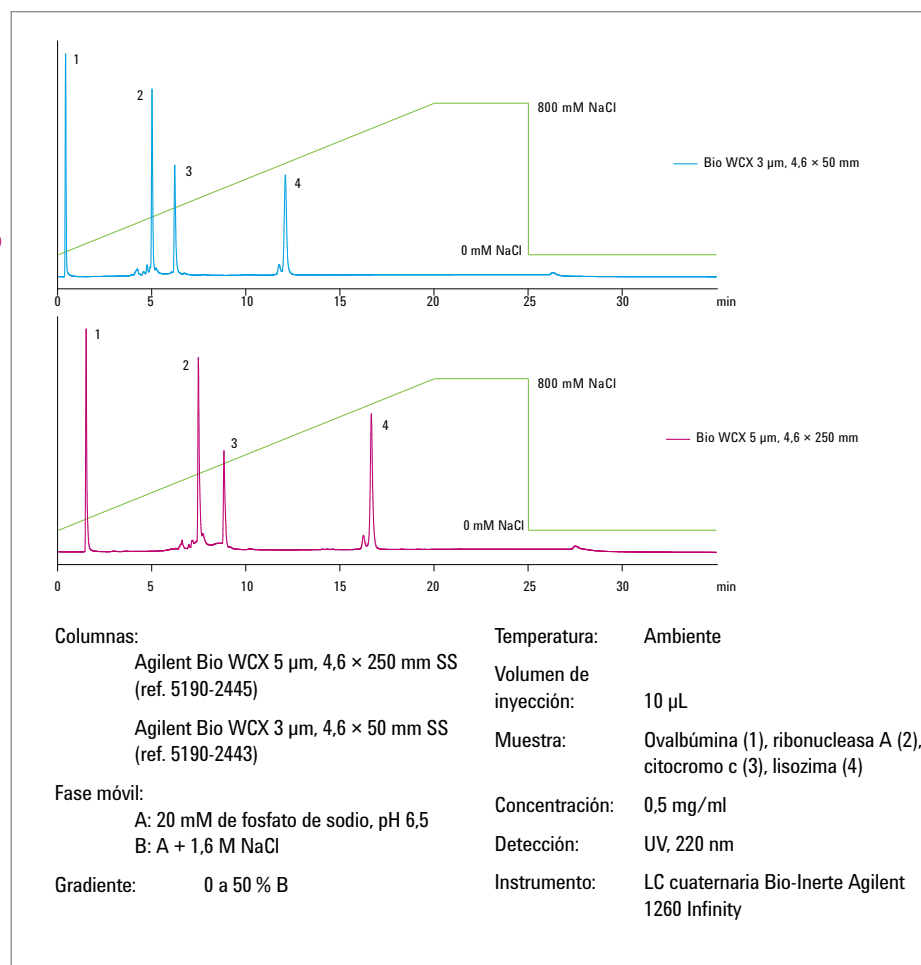


Figura 2. Separación de proteínas en una columna Agilent Bio WCX de 4,6 x 50 mm 3 µm comparada con una columna Agilent Bio WCX 4,6 x 250 mm de 5 µm (velocidad de flujo 1,0 ml/min). Se consiguieron tiempos de análisis más rápidos con un tamaño de partícula más pequeño y una longitud de columna más corta. Las muestras eluyeron de la columna más larga en 17 minutos y en tan solo 12 minutos en la columna más corta.



Los tamaños de partícula pequeños aumentan la resolución

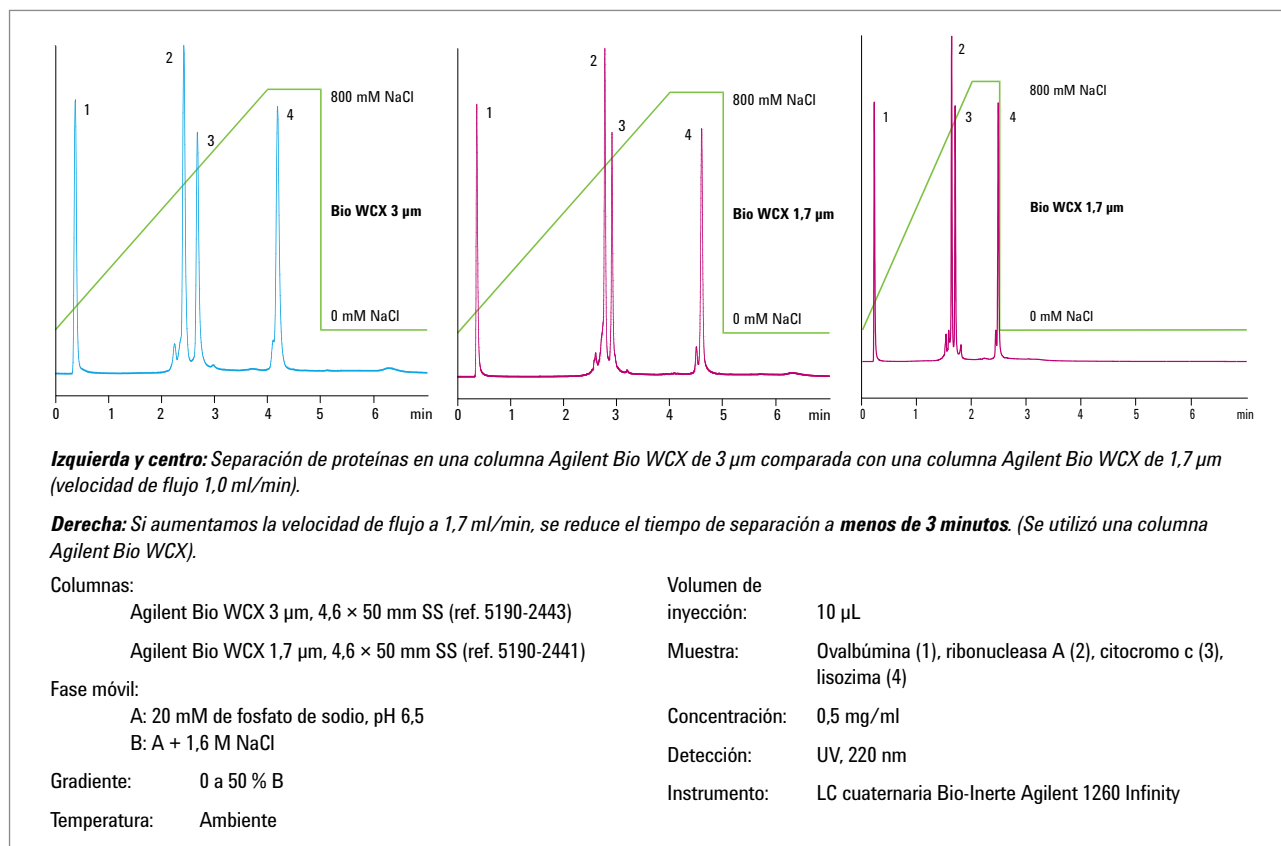


Figura 3. Reduzca el tiempo de análisis sin sacrificar la resolución y la forma de pico y aumentando la velocidad de flujo.

Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

REDUZCA Y SIMPLIFIQUE EL FLUJO DE TRABAJO DE IEX CON EL SOFTWARE BUFFER ADVISOR

La utilización de gradientes de cuatro componentes mezclados dinámicamente, calculados con el **software Agilent Buffer Advisor**, le permite conseguir un método sólido a través de principios de diseño de experimentos. El software Buffer Advisor le permite conseguir tiempos de preparación del tampón considerablemente inferiores, especialmente si los comparamos con la preparación manual de tampones para gradientes de dos componentes premezclados. Asimismo, puede beneficiarse de preparaciones de tampón más precisas, lo que hace que sea un método más sólido para transferirlo a otros laboratorios.

El **software Agilent Buffer Advisor** facilita una amplia variedad de sistemas de tampón prevalidados que el usuario puede escoger para cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. Además, ofrece fórmulas para la preparación de las soluciones madre más adecuadas. Gracias a la optimización del pH realizada por el software, se consiguen niveles superiores de precisión y exactitud de los gradientes en comparación con los gradientes generados mediante el uso de disoluciones tampón preparadas manualmente. El software Agilent Buffer Advisor recalcula el gradiente de cuatro componentes y garantiza que las concentraciones de los componentes del tampón básicos y ácidos mantienen el pH constante deseado.

El cribado inicial de veinte experimentos se consiguió con tan solo cuatro eluyentes de fase móvil, en lugar de necesitar cuarenta soluciones distintas. El software Agilent Buffer Advisor mezcla automáticamente los tampones para crear las fuerzas deseadas de tampón y pH. Posteriormente, la tabla de tiempos del gradiente puede programarse en la bomba cuaternaria.

En 15 horas de funcionamiento desatendido, se completó la totalidad de los 20 experimentos y se seleccionaron resultados óptimos. Los experimentos necesitaron menos de 1 L de eluyente a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min con un gradiente de 0 a 500 mM NaCl.

Desarrollo de métodos automatizado para separaciones óptimas de variante de carga

Columnas:	Agilent Bio WCX 3 μm , 4,6 x 50 mm SS (ref. 5190-2443) Agilent Bio SCX 3 μm , 4,6 x 50 mm SS (ref. 5190-2423)
Fase móvil:	A: Agua B: 1,5 M NaCl C: 40 mM NaH_2PO_4 D: 40 mM Na_2HPO_4 Combinando proporciones predeterminadas de C y D, según lo ha determinado el software Buffer Advisor, se crearon disoluciones tampón en el rango de pH y la fuerza deseados.
Gradiente:	Condiciones para cromatogramas mostradas: pH 5,0 a 7,0, 10 a 25 mM fuerza del tampón 0 a 500 mM NaCl, 0 a 15 minutos 500 mM NaCl, 15 a 20 minutos Experimentos DOE pH 5,0 a 7,0 0 a 200 mM, 0 a 250 mM, y 0 a 300 mM
Velocidad de flujo:	1,0 ml/min
Temperatura:	Ambiente
Volumen de inyección:	5 μL
Muestra:	Anticuerpo monoclonal IgG
Concentración:	2 mg/ml (en 20 mM de tampón fosfato de sodio, pH 6,0)
Detección:	UV, 220 nm
Instrumento:	LC cuaternaria Bio-Inerte Agilent 1260 Infinity

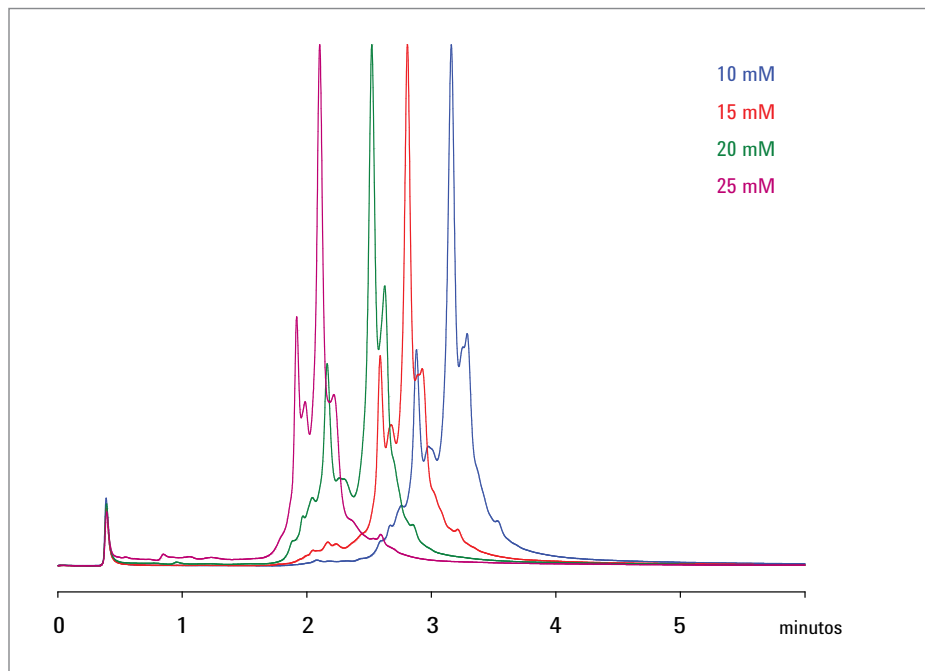


Figura 4. Optimización de la fuerza del tampón a un pH de 6,5 a partir de los cromatogramas de cribado de una separación de IgG monoclonal.



La **figura 4** muestra cuatro cromatogramas de la totalidad de los veinte experimentos obtenidos con tan solo un valor de pH de 6,5, seleccionados de la serie de columnas de separación Bio SCX de 3 μ m. Para visualizar los resultados de toda la serie de experimentos, se calcularon los factores de resolución entre el pico de componente primario y su contaminante principal eluyente anterior. Los datos resultantes se muestran en las **Figuras 5a** y **5b** para las columnas Bio SCX y Bio WCX, respectivamente. La **columna de intercambio catiónico fuerte** ofrece un método más sólido, ya que el intercambiador catiónico fuerte tiene una carga constante en un rango de pH más amplio.

Como es lógico, el **adsorbente de intercambio catiónico débil** no pudo resolver los picos a un pH de 5,0, ya que el adsorbente de intercambio catiónico débil no estaba cargado bajo estas condiciones y, por lo tanto, no funcionó en un modo de intercambio catiónico. A medida que el valor de pH aumentaba, la separación mejoraba.

Otra ventaja del software Buffer Advisor es la capacidad de mezclar distintas proporciones de soluciones madre para crear un gradiente de pH lineal. Esto permite una separación similar, pero se observan diferencias de selectividad (comparado con la **Figura 4**, por ejemplo), lo que puede contribuir a la separación.

Experimento DOE para un desarrollo de métodos sólido

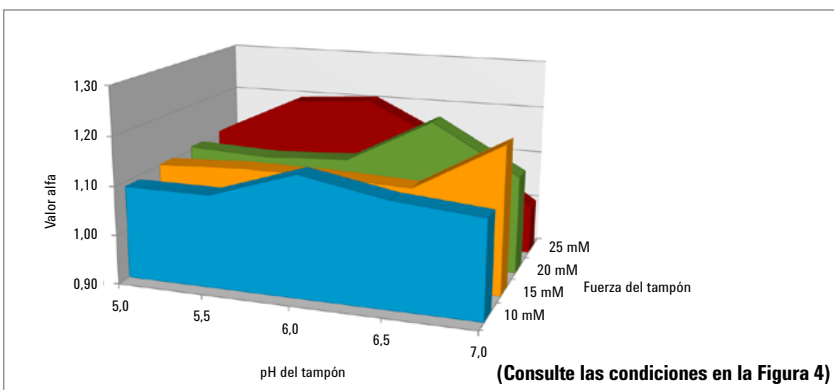


Figura 5a. Representaciones del valor alfa para la columna Bio SCX 3 μ m, 4,6 x 50 mm.

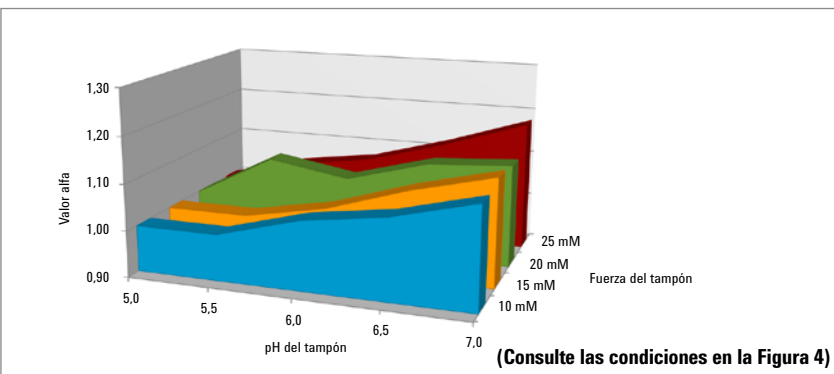


Figura 5b. Representaciones del valor alfa para la columna Bio WCX 3 μ m, 4,6 x 50 mm.

Ahorre tiempo y dinero en la preparación del tampón



Preparación manual de tampones



Mezcla dinámica en línea automatizada de tampones

El software Agilent Buffer Advisor le ayuda a automatizar la producción de tampones. La mezcla dinámica de solo 4 soluciones madre elimina la necesidad de preparar y valorar varias disoluciones tampón.

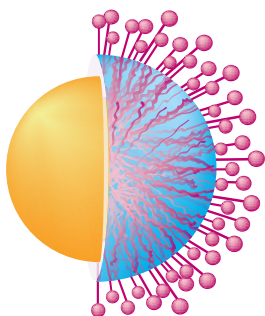
Potencie el rendimiento: pueden utilizarse 4 soluciones madre para realizar más de 88 análisis, para conseguir unos resultados más rápidos.

Ahorre tiempo: la mezcla cuaternaria facilita la combinación de varios tampones de distintos pH, para una preparación más sencilla del tampón.

Reduzca costes: evalúe las condiciones para una exploración de pH antes de analizar muestras, para reducir los desperdicios de muestras y los tiempos de análisis.

DISEÑADAS PARA SEPARACIONES DE ALTA RECUPERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Partícula Bio MAb



Columnas **Agilent Bio MAb HPLC**:
rendimiento superior de adentro hacia afuera

- Las partículas, el recubrimiento y los enlaces resisten las altas presiones, ofreciendo una resolución superior y separaciones más rápidas.
- El recubrimiento hidrofílico elimina la mayoría de interacciones no específicas.
- Capa de intercambio de cationes débil (WCX) altamente uniforme y empaquetada densamente, que está enlazada químicamente a la capa polimérica e hidrofílica.

Utilice Bio MAb para identificar el truncamiento del terminal C en cadenas pesadas

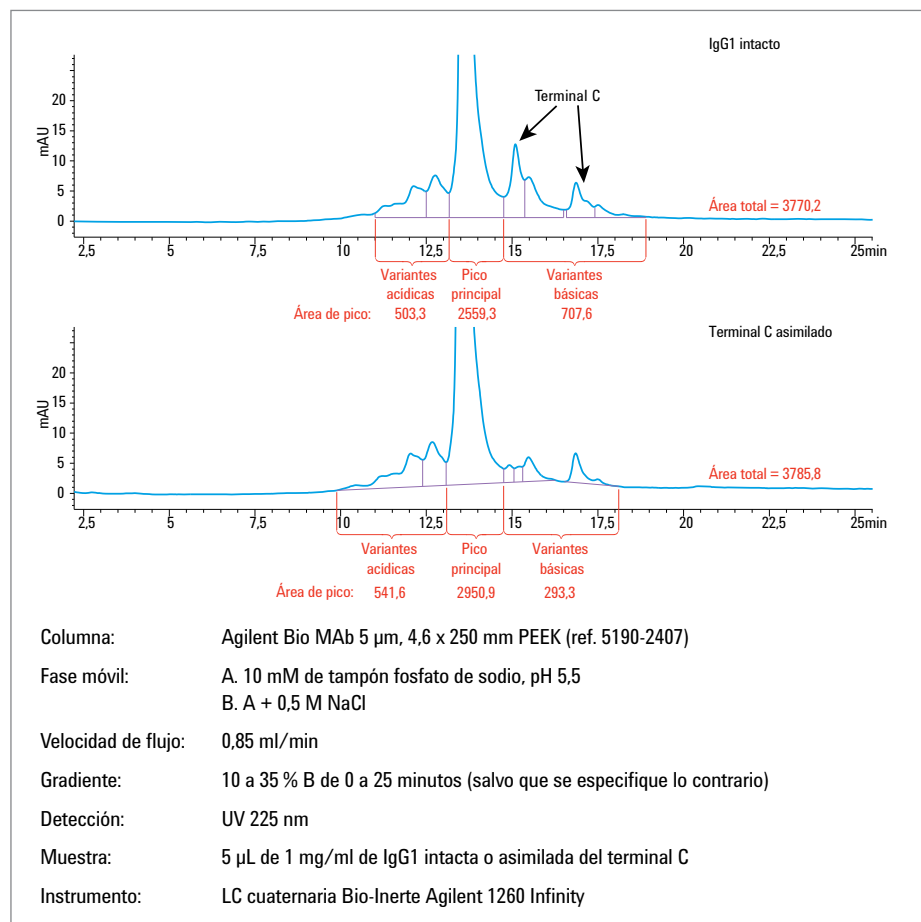


Figura 6. Cálculo de IgG1 asimilada del terminal C de la fuente A utilizando una columna Agilent Bio MAb 5 µm en el sistema LC Cuaternario Bio-Inerte Agilent 1260 Infinity. La columna mostró alta resolución, lo que permitió una identificación de picos más fácil y una cuantificación más precisa.



Para analizar los anticuerpos de forma efectiva, se requiere rapidez y precisión. Las columnas Agilent Bio MAb proporcionan ventajas exclusivas que hacen que sean ideales para separaciones de alta resolución de anticuerpos.

- **Mayor precisión:** ausencia de unión no específica debido a que una capa hidrofílica polimérica se ha injertado a partículas de poli(estireno-divinilbenceno) altamente ligadas, rígidas y no porosas.
- **Análisis superior de MAb:** una capa exterior de mayor densidad fabricada con un proceso optimizado une la fase débil de intercambio de cationes a la partícula.
- **Solidez del método:** rendimiento probado que proporciona resultados precisos y uniformes.
- **Opciones para ayudarle a perfeccionar su separación:** varios tamaños de partícula para conseguir separaciones de anticuerpos de máxima resolución.

La resina única de las columnas Agilent

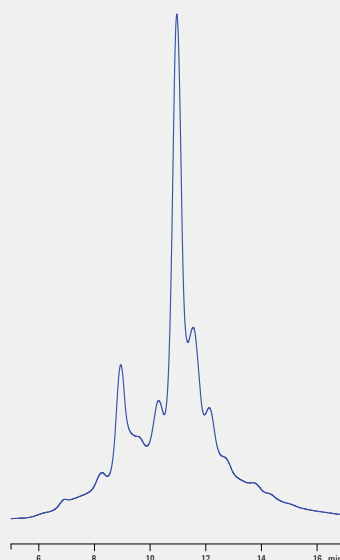
Gradientes de pH, una alternativa poderosa para análisis de variante de carga

Actualmente, cada vez se utiliza más la técnica alternativa a los métodos convencionales de intercambio iónico para variantes de carga, y esa técnica utiliza un gradiente de pH.

Los métodos de intercambio iónico convencionales utilizan un eluyente de fuerza iónica creciente para eluir y separar las proteínas y las variantes de la columna IEX. A medida que la sal aumenta, las interacciones entre la proteína y la columna IEX se alteran y se consigue la separación.

Con la cromatografía de intercambio de cationes puede utilizarse un enfoque de gradiente de pH. El aumento de pH hará que las proteínas pasen a ser neutras (o con carga negativa) y eluyan de la columna. Este enfoque está consiguiendo una mayor aceptación, porque permite conseguir una alta resolución y la ejecución de estos métodos es más sencilla con los nuevos HPLC.

El gráfico siguiente compara los dos métodos.



Análisis de un anticuerpo monoclonal de IgG utilizando un gradiente de pH de 6,5 a 7,5 (0 – 20 min), 50 mM, Agilent Bio MAb 5 µm, 4,6 x 50 mm

IEX de base salina	
Ventajas	• Método consolidado. • Usa instrumentación HPLC estándar. • Capacidad para recopilar fracciones directamente.
Inconvenientes	• No tolera la sal y pH's extremos de las matrices de muestra. • Requiere desarrollo de métodos, a menudo laborioso.
IEX basado en pH	
Ventajas	• Opción de varios productos. • Tolerancia los cambios en la concentración salina y el pH de la muestra. • Usa prácticas e instrumentos HPLC comunes. • Permite analizar muestras en proceso. • Puede ser rápido y sencillo con herramientas como el software Buffer Advisor.
Inconvenientes	• Relativamente nuevo.

Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

REPRODUCIBILIDAD Y PRECISIÓN

Bio MAb hace que sean ideales para la separación por carga de anticuerpos monoclonales. El software Agilent Buffer Advisor le ayudará a completar el gradiente de pH.

Las **tablas 1 y 2** ilustran la DER de los tiempos de retención medios y el área a partir de seis réplicas de una inyección de IgG1. Las columnas Bio MAb son la clave del método con reproducibilidad excelente y precisión incomparable, tal y como puede verse en la baja desviación estándar relativa (DER).

Una variación en la velocidad de flujo del $\pm 10\%$ comparado con el método real hizo que la DER del área se desviara considerablemente. Sin embargo, esta desviación se preveía debido a la carga en la columna de intercambio iónico. No se produjeron más cambios significativos en el patrón cromatográfico cuando se hicieron variaciones deliberadas en condiciones experimentales. Este hecho justifica que el método es sólido.

Las columnas Bio MAb proporcionan métodos sólidos para una cuantificación precisa

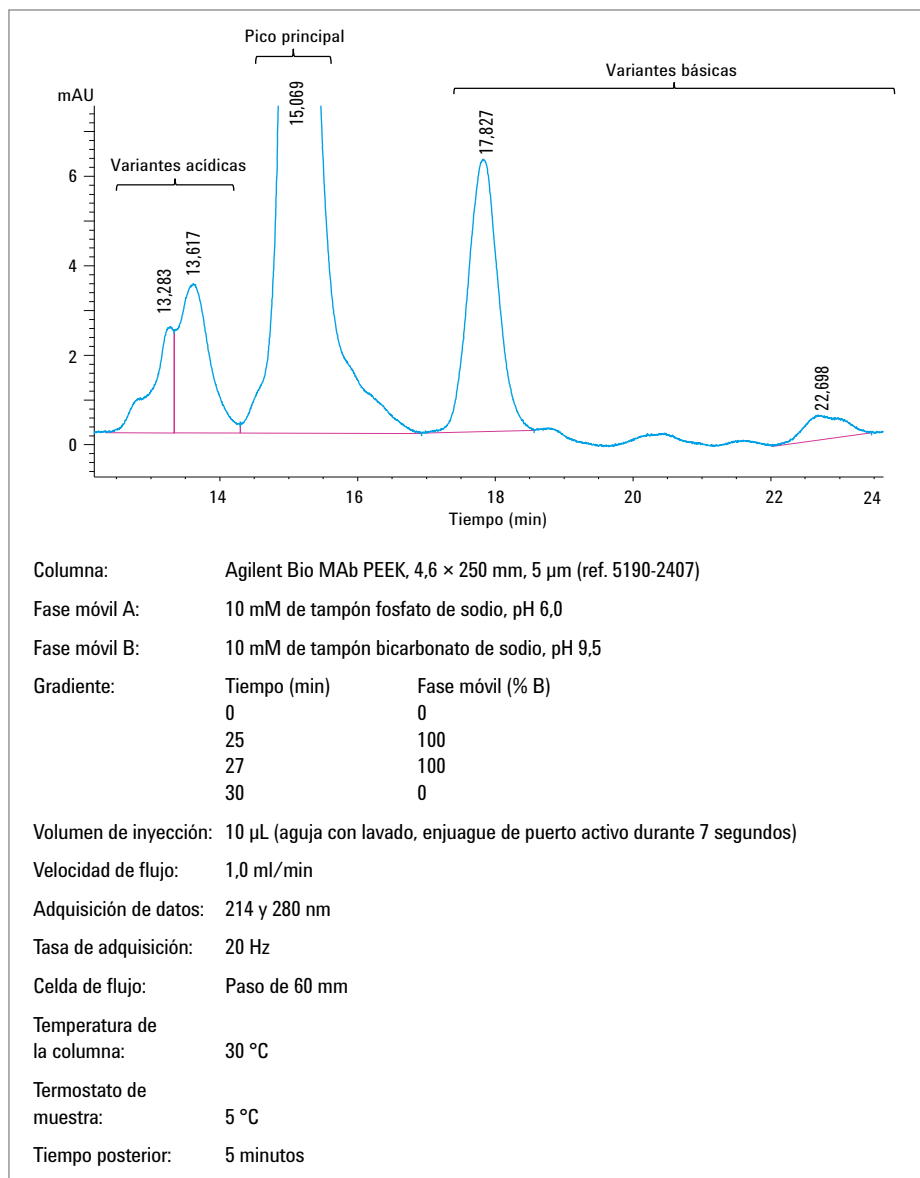


Figura 7. Cromatograma de intercambio catiónico basado en gradiente de pH de una separación de IgG1 utilizando una columna Agilent Bio MAb PEEK, 4,6 × 250 mm, 5 µm.

CONFÍE EN UN RENDIMIENTO FIABLE Y RESISTENTE

Las condiciones reales de su laboratorio requieren que las columnas proporcionen una separación sistemática, incluso con pequeñas variaciones en su método. Nosotros probamos nuestras columnas para asegurarnos de que proporcionan el rendimiento resistente que necesita.

Tabla 1. Cuantificación de variante con carga por % de área, n=6.

	TR (min)	% área
Variantes ácidas	13,28	9,87
	13,61	
Pico principal	15,058	76,92
Variantes básicas	17,82	13,21
	22,69	

Tabla 2. Tiempo de retención y DER de área (%), n=6 para pico primario.

	Tiempo de retención	Área de pico
Media (min)	15,058	1172
DER	0,1061	1,60

Tabla 3. Evaluación de la solidez del método, variando parámetros clave.

Parámetros	Variación	Desviación TR (límite: $\pm 3,0\%$)	Desviación de área (límite $\pm 5,0\%$)
		Pico principal	
Variación en volumen de inyección ($10\ \mu\text{L} \pm 10\%$)	-1 μL	-0,19	10,49
	+1 μL	0	-9,89
Variación en temperatura de columna ($30\ ^\circ\text{C} \pm 5\%$)	-5 %	-1,19	2,73
	+5 %	0,66	2,13
Variación en pH de tampón ($6,0 \pm 0,2$)	-0,2	0,199	-0,68
	+0,2	0,99	-0,08
Variación en velocidad de flujo ($1,0 \pm 2\%$)	-2 %	0,66	2,73
	+2 %	0	-1,10

Para evaluar la solidez de este método, se variaron cuatro parámetros críticos del método optimizado: volumen de inyección, temperatura del columna, pH del tampón y velocidad de flujo. Las desviaciones de DER se encontraron dentro de los límites previstos.

Prueba de pH fácil y fiable, diseñada para cromatografistas

Agilent ahora ofrece una línea completa de electrodos y medidores de pH. Estos medidores de pH están diseñados para cromatografistas y ofrecen un diseño intuitivo para el usuario y una resistencia excepcional para su laboratorio. Los electrodos Agilent CrossLab están disponibles para medidores de pH no fabricados por Agilent.

Más información en agilent.com/chem/AgilentpH



Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

COLUMNAS DE MONOLITO CON BASE DE POLÍMERO PARA SEPARACIONES DE MACROBIOMOLÉCULAS

Las columnas Agilent Bio-Monolith HPLC de intercambio iónico proporcionan separaciones rápidas y de alta resolución de anticuerpos (IgG, IgM), DNA plásmido, virus, fagos y otras macrobiomoléculas.

- **Mejora de la precisión:** menor riesgo de contaminación de la columna al capturar muestras complejas. Un disco monolítico (5,2 x 4,95 mm, 100 µL) con canales continuos elimina la transferencia de difusión de masa.
- **Separaciones rápidas:** la ausencia de difusión, poro y volumen muerto permite un transporte rápido entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- **Desarrollo de métodos eficiente:** las separaciones extremadamente rápidas reducen los costes y la duración del desarrollo de métodos. Ahorre tiempo y tampón bloqueando los parámetros del método.
- **Opciones para ayudarle a perfeccionar su separación:** incluye fases de intercambio catiónico fuerte y fases de intercambio aniónico débil. Las columnas Bio-Monolith HPLC son compatibles con sistemas LC preparativos y HPLC, incluida la serie Agilent 1200 Infinity.

Guía de selección de columnas Agilent Bio-Monolith HPLC

Columna	Descripción	Aplicaciones clave
Control de calidad Bio-Monolith	La fase enlazada cuaternaria de aminas (intercambio aniónico fuerte) se carga completamente en un rango operativo de PH de 2 a 13, uniendo biomoléculas cargadas negativamente.	• Monitorización del proceso de adenovirus y control de calidad • Monitorización de la purificación de IgM y control de calidad • Monitorización de la eliminación de impurezas del ADN • Monitorización de la eliminación de endotoxinas • Pureza HSA
Bio-Monolith DEAE	La fase enlazada de dietilaminoetilo (intercambio aniónico débil) ofrece un aumento de la selectividad de biomoléculas con carga negativa en un rango operativo de PH de 3 a 9.	• Monitorización de procesos y control de calidad de purificación y fabricación de bacteriófagos. • Monitorización de procesos y control de calidad de purificación de ADN plásmido.
Bio-Monolith SO ₃	La fase enlazada de sulfonilo (intercambio catiónico fuerte) se carga completamente en un rango operativo de PH de 2 a 13, uniendo biomoléculas cargadas positivamente.	• Separaciones analíticas rápidas y de alta resolución de grandes moléculas, como las proteínas y los anticuerpos. • Análisis rápidos de hemoglobina A1c.



Las muestras se han tomado del biorreactor en los minutos 36, 158 y 191 (como se muestra en la figura 8). El pico 1 representa las células huésped, medio y fago; el pico 2 representa el ADNg intacto; y el pico 3 representa el ADNg fragmentado. Durante la proliferación del fago, la concentración de ADN genómico (ADNg) aumenta a medida que las células huésped se lisan. Durante las últimas fases de fermentación, el ADNg empieza a degradarse en fragmentos, que no pueden eliminarse fácilmente con medios de purificación. Por lo tanto, es crítico detener el ciclo de fermentación antes de la degradación del ADN genómico.

Estas muestras complejas contienen restos de células, que pueden obstruir la columna HPLC y limitar la posibilidad de controlar rápidamente la fermentación. La estructura de poro abierto de la columna Bio-Monolith DEAE reduce los atascos y permite una monitorización de procesos eficiente en tiempo real.

Las columnas Bio-Monolith DEAE permiten una monitorización de procesos eficiente para un rendimiento máximo del producto

La columna Bio-Monolith DEAE supervisa la producción de fagos durante la fermentación

Columna:	Bio-Monolith DEAE, 5,2 x 4,95 mm (ref. 5069-3636)
Fase móvil:	A: 125 mM de tampón fosfato, pH 7,0 B: 125 mM de tampón fosfato + 1 M NaCl, pH 7,0
Velocidad de flujo:	1 ml/min
Gradiente:	100 % de tampón A (2,5 min) 0 a 100 % de tampón B (10 min) 100 % de tampón A (2 min)
Detector:	UV a 280 nm
Instrumento:	Sistema HPLC de gradiente a alta presión, Agilent 1200 Infinity Series

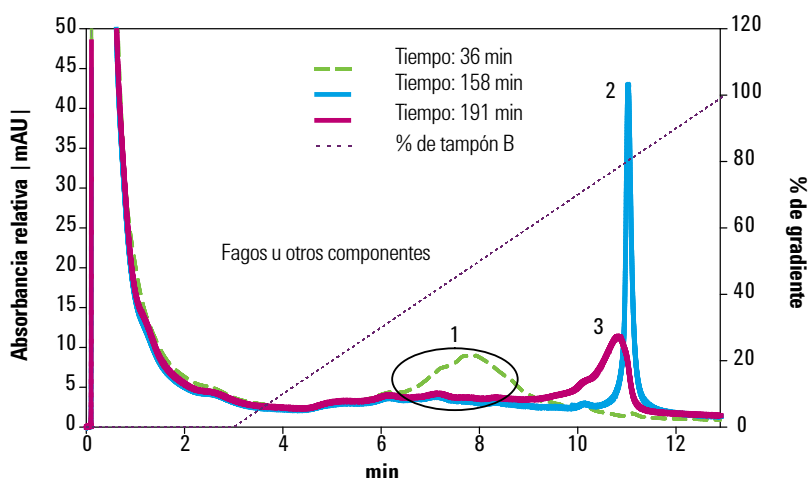


Figura 8. Con el avance de la proliferación del fago, la concentración de ADN genómico (ADNg) aumenta a medida que las células huésped se lisan. En las últimas fases de fermentación, el ADNg empieza a degradarse en fragmentos. Estos fragmentos de ADNg no pueden eliminarse fácilmente con medios de purificación. Por lo tanto, es crítico detener el ciclo de fermentación antes de la degradación del ADN genómico. El cromatograma anterior representa tres muestras tomadas del biorreactor en los minutos 36, 158 y 191. El pico 1 representa las células huésped, medio y fago; el pico 2 representa el ADNg intacto; y el pico 3 representa el ADNg fragmentado.

Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

SEPARACIONES FIABLES DE OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS

Las columnas Agilent PL-SAX están pensadas para separaciones HPLC de intercambio aniónico de proteínas, péptidos y oligonucleótidos sintéticos desprotegidos. Las condiciones de desnaturalización de la temperatura, el disolvente orgánico y los altos niveles de pH se utilizan para las separaciones de oligonucleótidos.

- **Larga vida útil de la columna:** la función de **intercambio aniónico fuerte** garantiza niveles excepcionales de estabilidad térmica y química, incluso con eluentes de hidróxido sódico.
- **Rendimiento cromatográfico excelente** gracias a tamaños de partícula pequeños.
- **Opciones analíticas integrales:** 5 µm para analítico, de 10 a 30 µm para purificación
- **Desarrollo de métodos flexible:** IEX en un amplio rango de pH. Función de intercambio aniónico fuerte, covalentemente enlazado a un polímero completamente estable químicamente y poroso, que amplía el rango operativo de PH.
- **Adecuada para purificación** y conservar la actividad biológica en proteínas.

Alta resolución de oligonucleótidos

Separación de alta resolución de un poli-t-oligonucleótido de tamaño estándar marcado con 10 mer, 15 mer, 30 mer y 50 mer (picos principales)

Columna: PL-SAX 1000Å, 4,6 x 50 mm, 8 µm, (ref. PL1551-1802)
 Fase móvil: A: 7:93 v/v ACN: 0,1 M TEAA, pH 8,5
 B: 7:93 v/v ACN: 0,1 M TEAA, 1 M de cloruro de amonio, pH 8,5
 Gradiente: 0 a 40 % B en 10 min, seguido de 40 a 70 % B en 14 min y 70 a 100 % B en 25 min
 Velocidad de flujo: 1,5 ml/min
 Temperatura: 60 °C
 Detector: UV, 220 nm

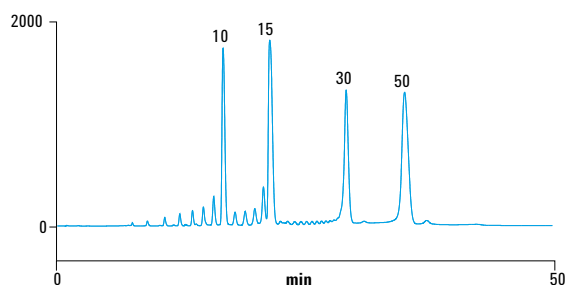


Figura 9. Separación en alta resolución de poli-t-oligonucleótido. Gracias a la utilización del gradiente, la separación de línea de base del n-1 desde n se obtuvo fácilmente hasta el 15 mer.



Puede conseguir separaciones de oligonucleótidos de alta resolución si utiliza el intercambiador aniónico fuerte PL-SAX con separaciones de $n-1$ desde n posibles. La **figura 9** ilustra la separación de un poli-t-oligonucleótido de tamaño estándar marcado con 10 mer, 15 mer, 30 mer y 50 mer (picos principales). Se añadió acetonitrilo al eluyente para suprimir la formación de estructuras secundarias que tendrían un efecto perjudicial en la separación.

En nuestro análisis de colina quinasa se ha demostrado la estabilidad del empaquetado PL-SAX (**figura 10**), donde la actividad de la enzima se estabilizó con éxito. Aquí, la muestra de 75-ml de colina quinasa parcialmente purificada desde un citosol de hígado contenía aproximadamente 1 mg de la enzima a un peso molecular de 160.000.

En la **figura 11**, la enzima amiloglucosidasa se fraccionó del filtrado de cultivo celular de *Aspergillus niger*. La enzima se produce en dos formas con pesos moleculares de 99 kD y 112 kD (picos 1 y 2, respectivamente), que tienen la misma composición de aminoácidos, pero un contenido de carbohidratos distinto. La columna PL-SAX 4000Å 4,6 x 50 mm 8 µm permite purificar 3,6 mg de las isoenzimas o 20 mg de la enzima total en tan solo dos minutos.

Purifique proteínas activas biológicamente

Análisis de colina quinasa en PL-SAX 4000Å

Columna: PL-SAX, 4,6 x 50 mm, 8 µm (ref. PL1551-1803)
 Fase móvil: A: 20 mM Tris 5 % de etileno glicol, pH 7,5
 (Se requiere lo siguiente para mantener la actividad de la enzima)
 1,0 mM de ácido etilenglicoltetraacético
 2,0 mM de β-mercaptoetanol
 0,2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo
 B: A + 1 M KCl

Velocidad de flujo: 3,0 ml/min
 Detector: UV, 280 nm

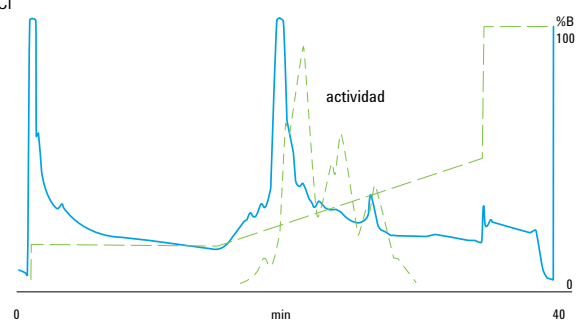


Figura 10. En este análisis de colina quinasa, la actividad de la enzima se ha mantenido y las proteínas activas siguen estando presentes al final de la separación.

Maximice la carga de muestra

Columna: PL-SAX 4000Å, 4,6 x 50 mm, 8 µm (ref. PL1551-1803)
 Eluyente A: 0,01 M Tris HCl, pH 8
 Eluyente B: A + 0,5 M NaCl, pH 8
 Gradiente: Lineal de 0 a 100 % B en 2 min
 Velocidad de flujo: 4,0 ml/min
 Detector: UV, 280 nm

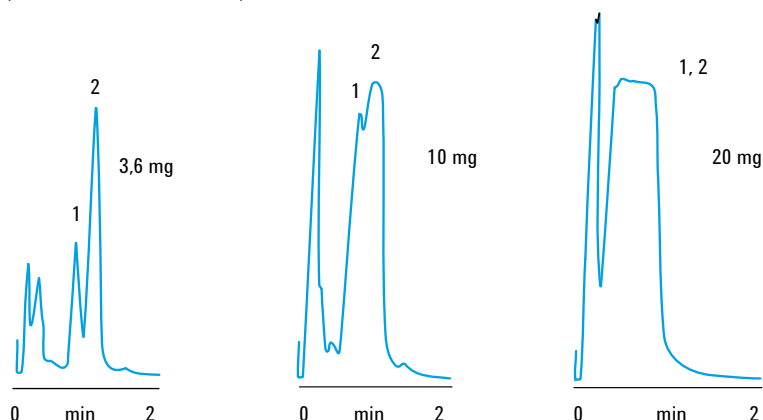


Figura 11. Alta velocidad de purificación de amiloglucosidasa en distintas concentraciones de enzima. La columna Agilent PL-SAX 4000Å 8 µm permitió purificar 3,6 mg de las isoenzimas o 20 mg de la enzima total en tan solo dos minutos.

Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

SEPRE Y PURIFIQUE BIOMOLÉCULAS DIVERSAS

PL-SCX es una matriz de PS/DVB macroporosa con una capa muy hidrofílica y una función de intercambio catiónico fuerte. El proceso de fabricación se controla para ofrecer una densidad óptima de las fracciones de intercambio catiónico fuerte para analizar, separar y purificar una amplia variedad de biomoléculas, desde péptidos pequeños a proteínas grandes.

- **Resolución superior:** el medio de 5 µm proporciona separaciones fiables a alta resolución, mientras que los medios de 10 y 30 µm están indicados para LC de media presión.
- **Opciones para optimizar su separación:** dos tamaños de poro (1000Å y 4000Å) que ofrecen buenas características de transferencia de masa para numerosos tamaños de solutos.
- **Estabilidad excepcional** para una larga vida útil de la columna.

Estabilidad química incomparable para la gama más amplia de eluyentes y procedimientos de limpieza para purificación

Columna: PL-SCX 1000Å, 4,6 x 50 mm, 8 µm (ref. PL1545-1802)

Eluyente A: 0,02 M KH_2PO_4 , pH 6

Eluyente B: A + 0,5 M NaCl, pH 6

Gradiente: Lineal de 0 a 100 % B en 20 min

Detección: UV, 280 nm

Solución de lavado (aprox. 40 volúmenes de columna)	Factor R_2 (picos 2 y 3)	Capacidad de proteínas (mg lisozima/ml CV)
Análisis inicial	1,5	33
0,2 M HCl	1,7	31
0,2 M NaOH	2,0	33
6 M de urea	1,6	33
1 % de TFA	1,6	33
10 % de ácido acético	1,7	28
100 % de metanol	1,6	31
0,5 M HCl	1,5	31
2 M NaOH	2,0	33

Tabla 4. Comparación de separaciones de proteínas en una columna Agilent PL-SCX antes y después del lavado con ácidos fuertes, alcalinos y orgánicos.

Filtros de unión baja de proteínas Captiva

Los filtros de PES Agilent proporcionan uniones bajas de proteínas superiores y consistentes para la filtración relacionada con proteínas.

Más información en

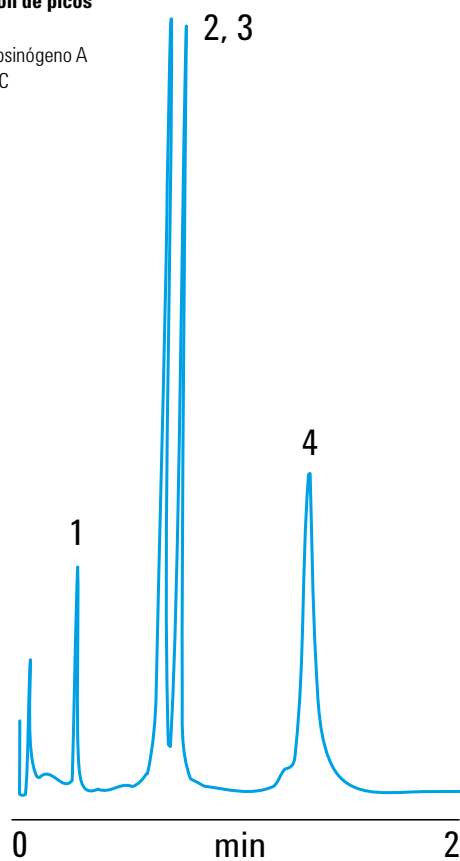
agilent.com/chem/filtration



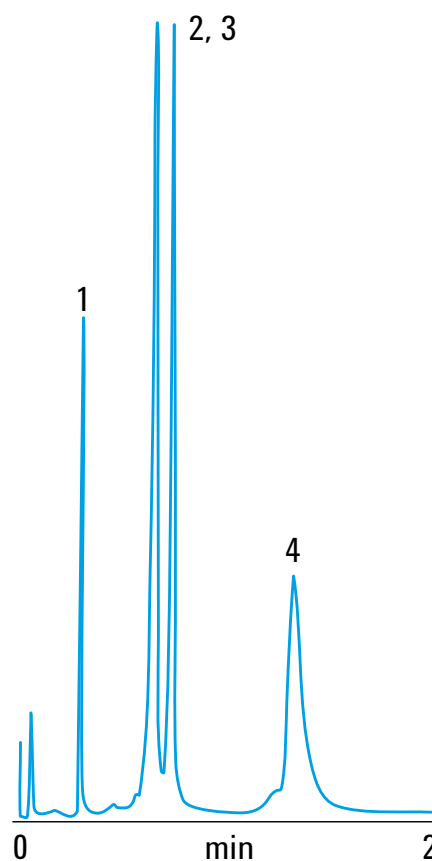


Identificación de picos

1. Mioglobina
2. α -quimotripsinógeno A
3. Citocromo C
4. Lisozima



Cromatograma inicial de una separación de proteínas en una columna Agilent PL-SCX.



Cromatograma final de la misma solución de proteínas en la misma columna después del lavado con cuarenta volúmenes de columna de eluyentes fuertes.

Consulte las condiciones en la página 16

Figura 12. Como puede ver en los ejemplos anteriores, el material PL-SCX es extremadamente estable cuando se expone a alta presión, ácidos fuertes y alcalinos fuertes.

Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Columnas Agilent Bio IEX para una amplia gama de caracterizaciones de proteínas y péptidos

Columnas Agilent Bio IEX HPLC, PEEK

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio SCX	Bio WCX	Bio SAX	Bio WAX
4,6 x 250	10	5190-2435	5190-2455	5190-2475	5190-2495
Guardacolumna 4,6 x 50	10	5190-2436	5190-2456	5190-2476	5190-2496
4,6 x 250	5	5190-2427	5190-2447	5190-2467	5190-2487
Guardacolumna 4,6 x 50	5	5190-2428	5190-2448	5190-2468	5190-2488
2,1 x 250	10	5190-2439	5190-2459	5190-2479	5190-2499
Guardacolumna 2,1 x 50	10	5190-2440	5190-2460	5190-2480	5190-2500
2,1 x 250	5	5190-2431	5190-2451	5190-2471	5190-2491
Guardacolumna 2,1 x 50	5	5190-2432	5190-2452	5190-2472	5190-2492

Columnas Agilent Bio IEX HPLC, acero inoxidable

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio SCX	Bio WCX	Bio SAX	Bio WAX
21,2 x 250	5	5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 x 250	5	5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6876
4,6 x 250	10	5190-2433	5190-2453	5190-2473	5190-2493
4,6 x 150	3				5190-6875
4,6 x 250	5	5190-2425	5190-2445	5190-2465	5190-2485
4,6 x 50	3	5190-2423	5190-2443	5190-2463	5190-2483
4,6 x 50	1,7	5190-2421	5190-2441	5190-2461	5190-2481
Guardacolumna 4,0 x 10	10	5190-2434	5190-2454	5190-2474	5190-2494
Guardacolumna 4,0 x 10	5	5190-2426	5190-2446	5190-2466	5190-2486
Guardacolumna 4,0 x 10	3	5190-2424	5190-2444	5190-2464	5190-2484
Guardacolumna 4,0 x 10	1,7	5190-2422	5190-2442	5190-2462	5190-2482

Para encontrar piezas y consumibles adecuados para conseguir bioseparaciones de alto rendimiento, como los capilares PEEK chapados en acero inoxidable, resistentes y bio-inertes a alta presión, visite agilent.com/chem/LCsupplies

Para recibir una copia del catálogo de consumibles de la serie Infinity y otros recursos clave, visite agilent.com/chem/GetGuides



INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Columnas Agilent Bio MAb para anticuerpos monoclonales

Columnas Agilent Bio MAb HPLC

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio MAb PEEK	Bio MAb de acero inoxidable
21,2 x 250	5		5190-6885
10 x 250	5		5190-6884
4,6 x 250	10	5190-2415	5190-2413
Guardacolumna 4,6 x 50	10	5190-2416	
4,6 x 250	5	5190-2407	5190-2405
Guardacolumna 4,6 x 50	5	5190-2408	
4,6 x 50	3		5190-2403
4,6 x 50	1,7		5190-2401
Guardacolumna 4,0 x 10	10		5190-2414
Guardacolumna 4,0 x 10	5		5190-2406
Guardacolumna 4,0 x 10	3		5190-2404
Guardacolumna 4,0 x 10	1,7		5190-2402
2,1 x 250	10	5190-2419	
Guardacolumna 2,1 x 50	10	5190-2420	
2,1 x 250	5	5190-2411	
Guardacolumna 2,1 x 50	5	5190-2412	

Columnas Agilent Bio-Monolith para separaciones de macromoléculas

Columnas HPLC Agilent Bio-Monolith

Columna	Referencia
Control de calidad Bio-Monolith	5069-3635
Bio-Monolith DEAE	5069-3636
Bio-Monolith SO ₃	5069-3637



Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Columnas Agilent PL-SAX para oligonucleótidos sintéticos

Columnas PL-SAX de intercambio aniónico fuerte

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	PL-SAX 1000Å	PL-SAX 4000Å
1,0 x 50	5	PL1351-1502	PL1351-1503
2,1 x 50	5	PL1951-1502	PL1951-1503
4,6 x 50	5	PL1551-1502	PL1551-1503
2,1 x 50	8	PL1951-1802	PL1951-1803
2,1 x 150	8	PL1951-3802	PL1951-3803
4,6 x 50	8	PL1551-1802	PL1551-1803
4,6 x 150	8	PL1551-3802	PL1551-3803
4,6 x 250	10	PL1551-5102	PL1551-5103
4,6 x 150	10	PL1551-3102	PL1551-3103
25 x 50	10	PL1251-1102	PL1251-1103
25 x 150	10	PL1251-3102	PL1251-3103
50 x 150	10	PL1751-3102	PL1751-3103
100 x 300	10	PL1851-2102	PL1851-2103
4,6 x 250	30	PL1551-5702	PL1551-5703
4,6 x 150	30	PL1551-3702	PL1551-3703
25 x 150	30	PL1251-3702	PL1251-3703
50 x 150	30	PL1751-3702	PL1751-3703
100 x 300	30	PL1851-3102	PL1851-3103

Medio de gran volumen PL-SAX para intercambio aniónico fuerte

Peso	Tamaño de partícula (µm)	PL-SAX 1000Å	PL-SAX 4000Å
100 g	10	PL1451-4102	PL1451-4103
1 kg	10	PL1451-6102	PL1451-6103
100 g	30	PL1451-4702	PL1451-4703
1 kg	30	PL1451-6702	PL1451-6703

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Columnas Agilent PL-SCX para una amplia variedad de solutos y biomoléculas

Columnas PL-SCX de intercambio catiónico fuerte

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	PL-SCX 1000Å	PL-SCX 4000Å
1,0 x 50	5	PL1345-1502	PL1345-1503
2,1 x 50	5	PL1945-1502	PL1945-1503
4,6 x 50	5	PL1545-1502	PL1545-1503
2,1 x 50	8	PL1945-1802	PL1945-1803
2,1 x 150	8	PL1945-3802	PL1945-3803
4,6 x 50	8	PL1545-1802	PL1545-1803
4,6 x 150	8	PL1545-3802	PL1545-3803
4,6 x 250	10	PL1545-3102	PL1545-3103
4,6 x 150	10	PL1545-5102	PL1545-5103
25 x 50	10	PL1245-1103	PL1245-1103
25 x 150	10	PL1245-3103	PL1245-3103
50 x 150	10	PL1745-3103	PL1745-3103
100 x 300	10	PL1845-2103	PL1845-2103
4,6 x 250	30	PL1545-3702	PL1545-3703
4,6 x 150	30	PL1545-5703	PL1545-5703
25 x 150	30	PL1245-3702	PL1245-3703
50 x 150	30	PL1745-3703	PL1745-3703
100 x 300	30	PL1845-3102	PL1845-3103

Medio de gran volumen PL-SCX para intercambio catiónico fuerte

Peso	Tamaño de partícula (µm)	PL-SCX 1000Å	PL-SCX 4000Å
100 g	10	PL1445-4102	PL1445-4102
1 kg	10	PL1445-6102	PL1445-6103
100 g	30	PL1445-4702	PL1445-4703
1 kg	30	PL1445-6702	PL1445-6703

Para obtener más información sobre cómo realizar separaciones de proteínas de alta resolución, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

SISTEMA LC CUATERNARIO BIO-INERTE AGILENT 1260 INFINITY: ANÁLISIS DE BIOMOLÉCULAS INFINITAMENTE MEJOR

Desde el suministro de disolvente exento de hierro y acero a componentes de ruta de flujo de muestra exentos de metal, el sistema LC Cuaternario Bio-Inerte Agilent 1260 Infinity define nuevos estándares en términos de rendimiento y fiabilidad.

Este sistema resistente lidia con las complejas condiciones de los disolventes que suelen utilizarse para analizar proteínas y bioterapéuticos, al tiempo que minimiza los problemas asociados a la unión no específica. Combinado con las columnas BioHPLC Agilent de intercambio iónico, podrá conseguir el tiempo de resolución más alto.

Ruta de flujo de muestra 100 % bio-inerte

Todos los capilares y todas las conexiones que pasan por el inyector automático, el compartimento de la columna y los detectores no contienen metales, por lo que las biomoléculas solo entran en contacto con la cerámica o el PEEK. Esto le ayuda a evitar los riesgos de colas de los picos, baja recuperación y vida útil reducida de la columna minimizando la interacción secundaria de proteínas y péptidos con superficies metálicas.

Verdadero rendimiento de UHPLC

Rango de potencia de hasta 600 bares, que admite las altas presiones requeridas por las emergentes tecnologías de columna con partículas más pequeñas. Es la solución perfecta para todas las columnas SEC e IEX con tamaños de partícula de hasta 1,7 µm.

Tecnología de conexiones y capilares para un funcionamiento seguro y robusto; día tras día

Con el sistema LC Bio-Inerte Infinity 1260, Agilent utiliza la tecnología de conexiones y capilares que proporciona la combinación única de bioinercia exenta de metales y funcionamiento a alta presión. Se han implantado tres tipos distintos de capilares:

- Capilares de titanio muy resistentes a la corrosión para las líneas de suministro de disolvente.
- Capilares PEEK chapados en el inyector automático y el compartimento de la columna.
- Capilares PEEK en las piezas de baja presión al final de la columna de separación.

Los capilares PEEK chapados cuentan con un sistema de conexión único para proporcionar una bioinercia completa en todas las conexiones. La punta PEEK enclavada mecánicamente es muy resistente a la tensión lateral o rotacional, eliminando el par de torsión en el capilar y apretando la conexión.

Para obtener más información, visite agilent.com/chem/LCcapillaries



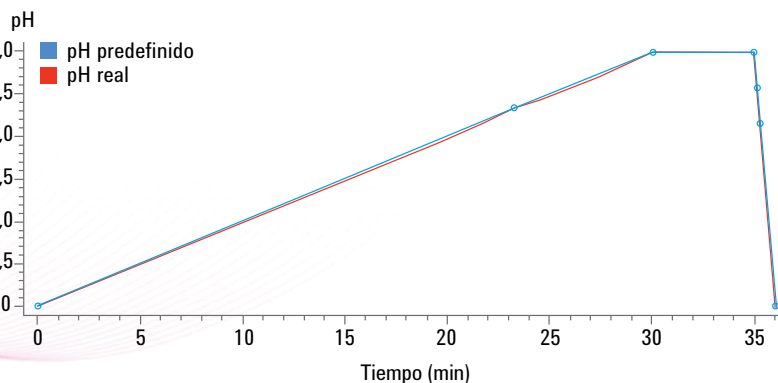
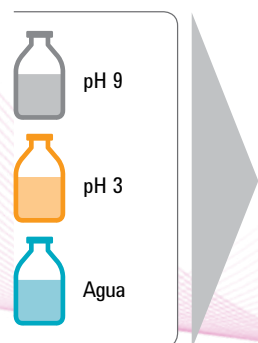
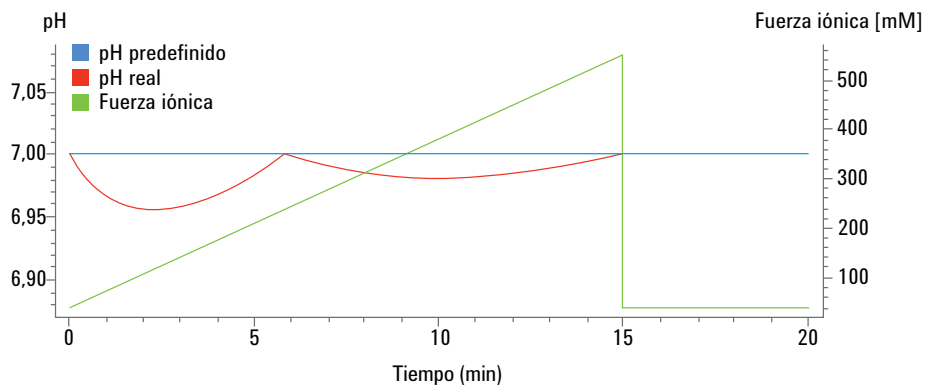
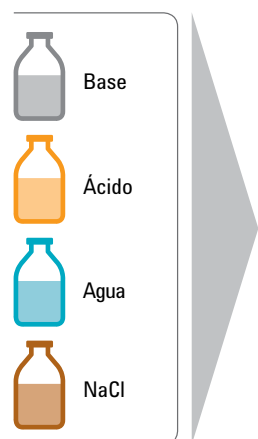
Para obtener más información sobre el sistema LC Bio-Inerte Agilent 1260 Infinity, visite agilent.com/chem/1200BioLC

SIMPLIFIQUE SU FLUJO DE TRABAJO DE BIOANÁLISIS

Exploración de pH y combinación de tampón sencillos

Empleando el principio de mezcla de la bomba cuaternaria Bio-Inerte 1260 Infinity, el software Buffer Advisor facilita la mezcla dinámica de disolventes con tan solo cuatro soluciones madre. De esta forma, simplifica su flujo de trabajo de bioanálisis y reduce drásticamente el tiempo necesario para preparar el tampón.

En primer lugar, el modelo teórico le ayuda a encontrar las mejores condiciones de sal o pH para la separación de proteínas. Las condiciones de gradiente optimizadas se guardan en un archivo de formato XML para importarlo posteriormente en el sistema Agilent OpenLAB CDS. Este archivo define la combinación de disolvente en la tabla de tiempos de la bomba cuaternaria Bio-Inerte 1260 Infinity con proceso de mezcla en 4 canales. Todo lo que necesita para la preparación son cuatro soluciones madre: tampón ácido, tampón básico, agua y sal. Para crear un gradiente salino, una cantidad creciente de solución salina del canal D se mezcla con los componentes del tampón básico y ácido de los canales A y B, y con agua para disolución del canal C.



Los gradientes de sal o pH pueden crearse fácilmente a partir de soluciones madre.

Para obtener más información sobre los beneficios de ahorro de tiempo del software Buffer Advisor,

visite agilent.com/chem/infinity-bufferadvisor

UNA GAMA DE BIOCOLUMNAS PARA OFRECERLE EL MÁXIMO DE OPCIONES Y EL MEJOR CONTROL

Las columnas BioHPLC Agilent de intercambio iónico se han diseñado y probado para garantizar una resolución excelente y un rendimiento biocromatográfico incomparable. Por ello, estas columnas son ideales para estudios de variantes de carga.

Nuestra amplia selección incluye:

- **Columnas Agilent Bio IEX** para proteínas y péptidos.
- **Columnas Agilent Bio MAb** para anticuerpos monoclonales.
- **Columnas Agilent Bio-Monolith** para sistemas LC preparativos.
- **Columnas Agilent PL-SAX** para oligonucleótidos sintéticos.
- **Columnas Agilent PL-SCX** para biomoléculas y solutos.

Desde la simplificación de muestras al análisis, las columnas BioHPLC Agilent de intercambio iónico son fáciles de integrar en su flujo de trabajo para proporcionar resultados reproducibles y de primera calidad, así como un escalado de métodos sencillo.

Puede contar con Agilent para todas sus necesidades de columna BioHPLC, inclusive la exclusión por tamaño, fase reversa, HILIC y columnas por afinidad.



Más información

Para obtener más información sobre las columnas BioHPLC Agilent de intercambio iónico, visite agilent.com/chem/AdvanceBio

Encuentre un centro de atención al cliente de Agilent en su país: agilent.com/chem/contactus

Estados Unidos y Canadá:

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

Europa:

info_agilent@agilent.com

Asia Pacífico:

inquiry_lsca@agilent.com

India:

india-lsca_marketing@agilent.com

Confíe en las columnas Agilent AdvanceBio para conseguir análisis biofarmacéuticos más rápidos y uniformes

Las columnas Agilent AdvanceBio HPLC se han diseñado para ofrecer un rendimiento uniforme y excepcional para la separación y la caracterización de proteínas y péptidos. Los preceptos científicos en los que se basan esta línea de columnas de próxima generación aumentan la precisión, mejoran la productividad y eliminan las interferencias que pueden obstaculizar su progreso analítico.

Para conseguir una confianza superior, las columnas AdvanceBio se someten a pruebas rigurosas para garantizar resultados excelentes. Además, están cubiertas por una garantía de completa satisfacción de 60 días exclusiva de Agilent.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2013
Impreso en los Estados Unidos, 10 de diciembre de 2013
5991-2449ES



Agilent Technologies