

Colonnes échangeuses d'ions BioHPLC Agilent

CARACTÉRISEZ LES ISOFORMES DE CHARGES DE PROTÉINES DE MANIÈRE RAPIDE ET FIABLE

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

Plus de *colonnes* et plus de *choix* pour améliorer vos analyses d'isoformes de charges de protéines

La chromatographie d'échange d'ions (IEX) est une technique essentielle pour séparer les protéines et les produits biothérapeutiques. Comme la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), l'IEX peut être utilisée pour séparer les protéines dans leur état natif ; elle est aussi utile comme technique préparative pour purifier et isoler ces protéines.

Pendant la production et la purification, les anticorps peuvent connaître des changements d'hétérogénéité de charge dus aux substitutions d'acides aminés, à la glycosylation, à la phosphorylation et à d'autres modifications post-traductionnelles ou chimiques.

Dans l'analyse des protéines, les variations de charge à un pH déterminé indiquent un changement de structure moléculaire primaire qui aboutit à des formes supplémentaires de la protéine. Il s'agit d'isoformes (ou isoformes de charge) pouvant être résolues par la chromatographie IEX.

Ces changements pouvant affecter la stabilité et l'activité ou provoquer des effets immunologiques indésirables, l'analyse d'isoformes de charge est essentielle en industrie biopharmaceutique.

Notre gamme de colonnes échangeuses d'ions BioHPLC, un atout indispensable pour séparer et caractériser les biomolécules.

Que vous souhaitiez caractériser le prochain produit biopharmaceutique ou isoler une protéine cible, Agilent vous aidera à surmonter les défis de l'isolation et de l'identification d'isoformes de charge de protéines.

Nos colonnes échangeuses d'ions BioHPLC sont conçues et testées pour apporter à votre laboratoire les avantages suivants :

- Une efficacité et reproductibilité élevées
- Des séparations haute résolution rapides
- Des méthodes plus robustes
- Une vaste gamme de diamètres de pore, qui vous permet de séparer efficacement les protéines et isoformes de charge de toutes tailles
- Une minimisation des risques de contamination des colonnes lors de l'analyse d'échantillons complexes

Principal fournisseur de l'industrie biopharmaceutique, Agilent sait que la qualité et la régularité sont essentielles pour apporter des traitements thérapeutiques sûrs et hautement efficaces. Nos colonnes échangeuses d'ions BioHPLC offrent la vitesse, la résolution et la reproductibilité nécessaires pour fournir de manière rapide et rentable des produits révolutionnaires à ceux qui en ont besoin.

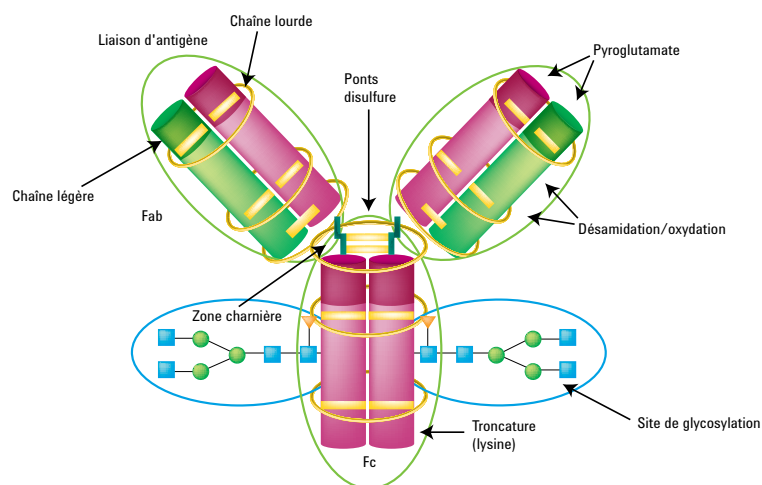


Figure 1. Les isoformes de charge d'anticorps monoclonaux sont produites par glycosylation, désamidation et oxydation des acides aminés à des degrés divers, et par troncature de la lysine au niveau des chaînes lourdes.

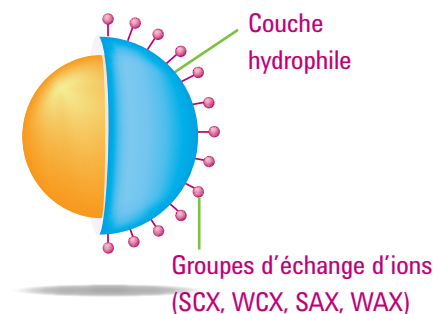
Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

AU SOMMAIRE : notre gamme complète de colonnes échangeuses d'ions BioHPLC, destinées aux toutes dernières applications dans le domaine des biomolécules

Protéines et peptides – Colonnes Agilent Bio IEX.....	4
Anticorps monoclonaux – Colonnes Agilent Bio MAb	8
Séparations de macro-biomolécules – Colonnes Agilent Bio-Monolith.....	12
Oligonucléotides synthétiques – Colonnes Agilent PL-SAX.....	14
Diverses biomolécules et solutés – Colonnes Agilent PL-SCX	16
Informations pour commander des colonnes.....	18
Instruments LC et logiciel pour applications de biomolécules.....	22

SÉPARATIONS HAUTE RÉOLUTION DE PROTÉINES, PEPTIDES ET PLUS, EN FONCTION DE LEUR CHARGE

Particule Bio IEX



Remplies de particules échangeuses d'ions polymériques non poreuses, nos colonnes HPLC Bio IEX permettent de réaliser des séparations de peptides, oligonucléotides et protéines avec une grande efficacité et un fort rendement.

- **Des résultats précis :** Absence d'interactions non-spécifiques, en raison d'une couche polymérique hydrophile qui recouvre les particules de poly(styrène divinylbenzène) non poreuses, rigides et hautement réticulées.
- **Une vitesse et résolution supérieures :** les petites particules non-poreuses, la couche hydrophile et le greffage résistent aux hautes pressions
- **Une capacité de colonne accrue :** les groupes fonctionnels échangeurs d'ions sont greffés à la couche hydrophile de manière dense et uniforme
- **Des méthodes plus robustes** avec le logiciel Agilent Buffer Advisor et le système LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity
- **Une gamme de choix pour affiner vos séparations :** adaptée à toutes les séparations de protéines, avec quatre différents types d'échanges d'ions : WCX, WAX, SCX, SAX

Bénéficiez d'un temps d'analyse plus court avec des particules plus petites et des colonnes plus courtes. Diminuez votre temps d'analyse de 30 %

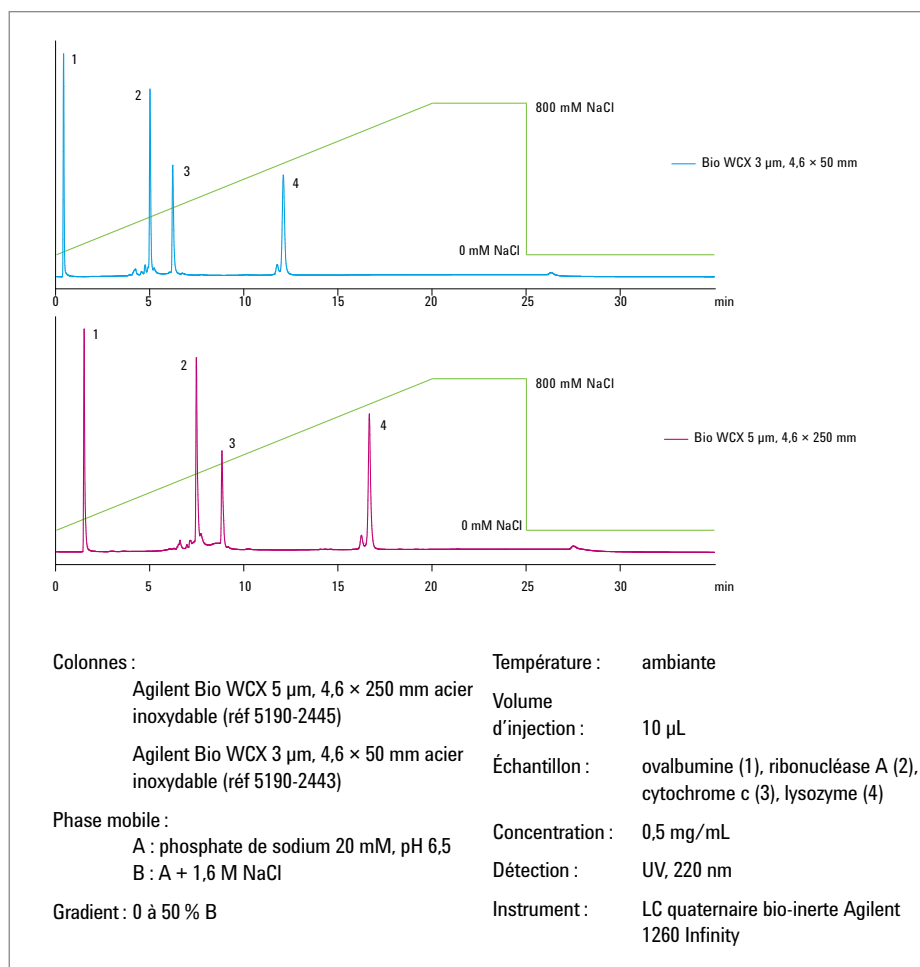
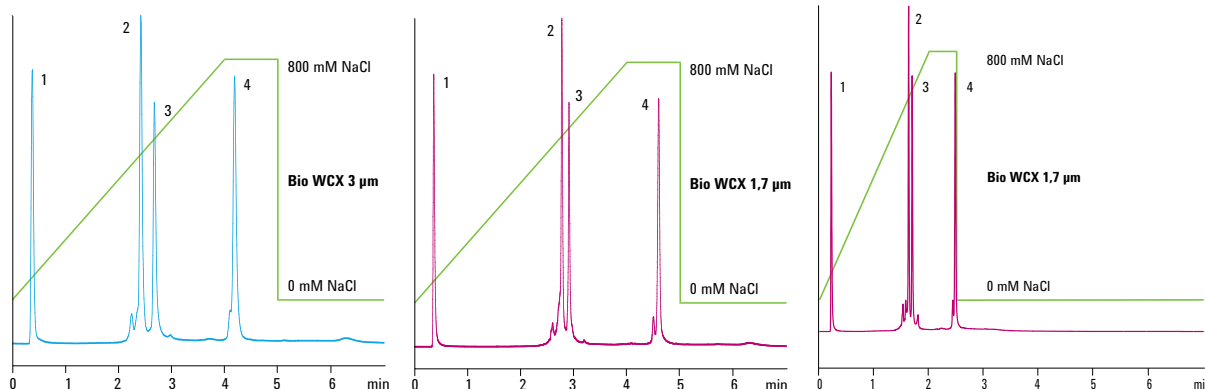


Figure 2. Séparation de protéines sur une colonne Agilent Bio WCX 4,6 × 50 mm, 3 µm par rapport à une colonne Agilent Bio WCX 4,6 × 250 mm, 5 µm (débit 1,0 mL/min). Des temps d'analyse plus rapides ont été obtenus avec une granulométrie inférieure et des colonnes plus courtes ; les échantillons sont élués de la plus longue colonne en 17 minutes et en seulement 12 minutes de la colonne la plus courte.



Les granulométries plus petites augmentent la résolution



Gauche et milieu : séparation des protéines sur une colonne Agilent Bio WCX 3 µm par rapport à une colonne Agilent Bio WCX 1,7 µm (débit 1,0 mL/min).

Droite : en augmentant le débit à 1,7 mL/min, nous avons réduit le temps de séparation à **moins de 3 minutes**. (Une colonne Agilent Bio WCX a été utilisée.)

Colonnes :

Agilent Bio WCX 3 µm, 4,6 × 50 mm acier inoxydable
(réf 5190-2443)

Agilent Bio WCX 1,7 µm, 4,6 × 50 mm acier inoxydable
(réf 5190-2441)

Phase mobile :

A : phosphate de sodium 20 mM, pH 6,5

B : A + 1,6 M NaCl

Gradient : 0 à 50 % B

Température : ambiante

Volume

d'injection : 10 µL

Échantillon :

ovalbumine (1), ribonucléase A (2), cytochrome c (3),
lysozyme (4)

Concentration : 0,5 mg/mL

Détection : UV, 220 nm

Instrument : LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

Figure 3. Réduisez le temps d'analyse en augmentant le débit, sans sacrifier la forme de pic et la résolution.

Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides,
rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

SIMPLIFIEZ LE FLUX IEX AVEC LE LOGICIEL BUFFER ADVISOR

L'utilisation de gradients à quatre composants mélangés dynamiquement avec notre **logiciel Agilent Buffer Advisor** permet d'obtenir une méthode robuste en s'appuyant sur les principes du plan d'expérience. Buffer Advisor réduit considérablement le temps de préparation du tampon, notamment lors de préparations manuelles de tampons pour les gradients à deux composants prémélangés. Le gain de précision qu'il offre à vos préparations renforce la robustesse de la méthode dans le cas de transferts vers d'autres laboratoires.

Buffer Advisor fournit à l'utilisateur une vaste gamme de systèmes de tampons prévalidés pour la chromatographie d'échange d'anions et cations. Notre logiciel propose également des recettes pour préparer les solutions de base les plus adaptées. Grâce à sa fonction d'optimisation du pH, les gradients gagnent en exactitude et précision par rapport aux solutions tampon préparées manuellement. Buffer Advisor recalcule le gradient à quatre composants et ajuste les concentrations des composants acides et basiques afin de maintenir constant le pH désiré.

Un test initial de vingt expériences a été effectué à partir de quatre éluants de phase mobile seulement plutôt que quarante solutions différentes. Le logiciel mélange automatiquement les tampons pour créer les pH et forces ioniques souhaités. Le tableau des gradients peut alors être programmé dans le quaternaire.

L'ensemble des 20 expériences a été terminé en 15 heures de fonctionnement non surveillé et les résultats optimaux ont été sélectionnés. Les expériences ont requis moins de 1 L d'éluant à un débit de 1,0 mL/min avec un gradient de 0 à 500 mM NaCl.

Automatisation du développement de méthode pour des séparations de variante de charge optimisées

Colonnes :	Agilent Bio WCX 3 μ m, 4,6 x 50 mm acier inoxydable (réf 5190-2443) Agilent Bio SCX 3 μ m, 4,6 x 50 mm acier inoxydable (réf 5190-2423)
Phase mobile :	A : Eau B : 1,5 M NaCl C : 40 mM NaH_2PO_4 D : 40 mM Na_2HPO_4 Des solutions tampon dans la plage de pH et la force souhaitées ont été créées en combinant des proportions prédéfinies de C et D comme déterminé par le logiciel Buffer Advisor.
Gradient :	Conditions des chromatogrammes présentés : pH 5,0 à 7,0, 10 à 25 mM de force ionique 0 à 500 mM NaCl, 0 à 15 minutes 500 mM NaCl, 15 à 20 minutes Plan d'expérience pH 5,0 à 7,0 0 à 200 mM, 0 à 250 mM et 0 à 300 mM
Débit :	1,0 mL/min
Température :	ambiante
Volume d'injection :	5 μ L
Échantillon :	Anticorps monoclonal IgG
Concentration :	2 mg/mL (dans le phosphate de sodium 20 mM, pH 6,0)
Détection :	UV, 220 nm
Instrument :	LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

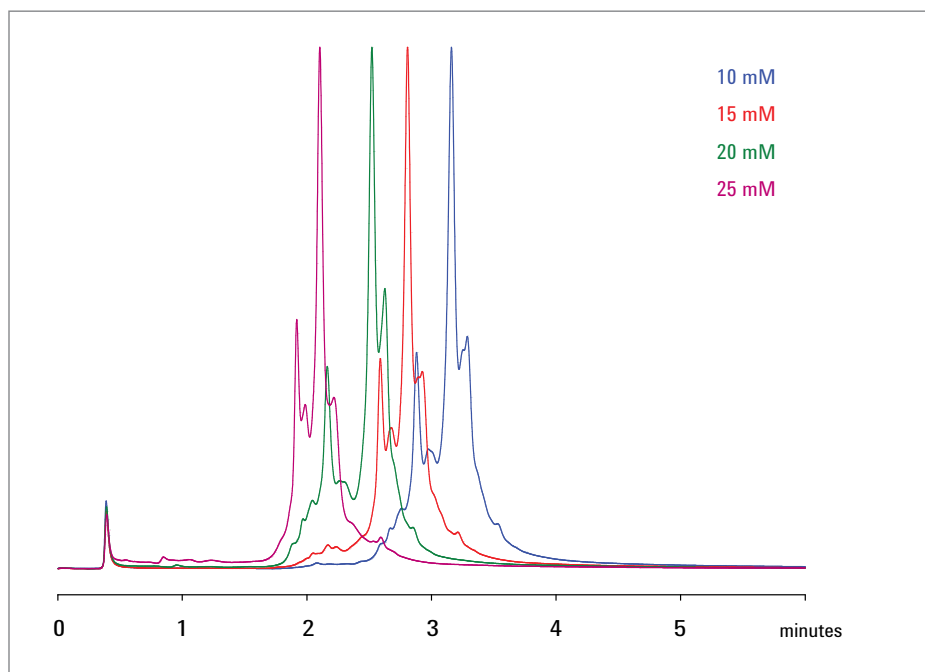


Figure 4. Optimisation de la force ionique à pH 6,5, réalisée à partir de la série de chromatogrammes d'une séparation d'IgG monoclonale.



La **figure 4** présente quatre chromatogrammes issus des vingt expériences, tous obtenus à une seule valeur de pH, 6,5, sélectionnés dans la série de séparations de la colonne Bio SCX 3 μ m. Les facteurs de résolution entre les pics du produit majoritaire et de son principal contaminant, éluant plus tôt, ont été calculés afin de visualiser les résultats de toute la série d'expériences. Les données qui en résultent sont représentées dans les **figures 5a** et **5b** pour les colonnes Bio SCX et Bio WCX, respectivement. La **colonne d'échange de cations forts** donne une méthode plus robuste, car l'échangeur de cations forts présente une charge constante sur une large plage de pH.

Comme on pouvait s'y attendre, l'**absorbant d'échange de cations faibles** n'a pas pu résoudre les pics à pH 5,0, car l'absorbant d'échange de cations faibles n'était pas chargé dans ces conditions et n'a donc pas fonctionné en mode d'échange d'ions. La séparation s'est améliorée avec l'augmentation du pH.

Autre avantage du logiciel Buffer Advisor : sa capacité à mélanger différentes proportions des solutions de base pour créer un gradient de pH linéaire. Ceci permet une séparation similaire, mais des différences de sélectivité sont observées (à comparer avec la **figure 4** par exemple), ce qui peut faciliter la séparation.

Expérience de CE pour le développement de méthodes robustes

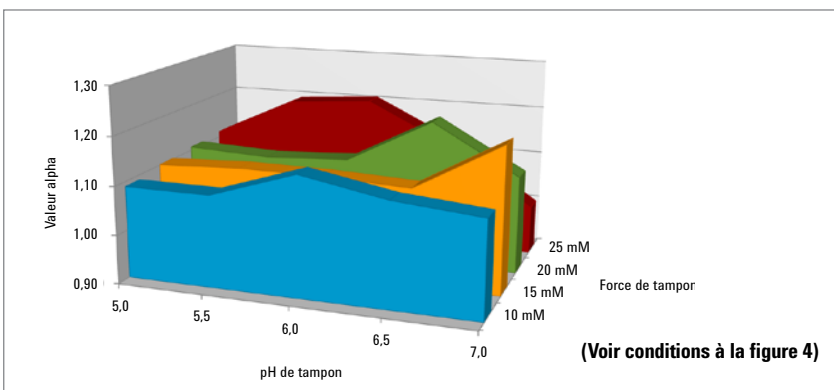


Figure 5a. Courbes de valeur alpha pour colonne Bio SCX 3 μ m, 4,6 x 50 mm.

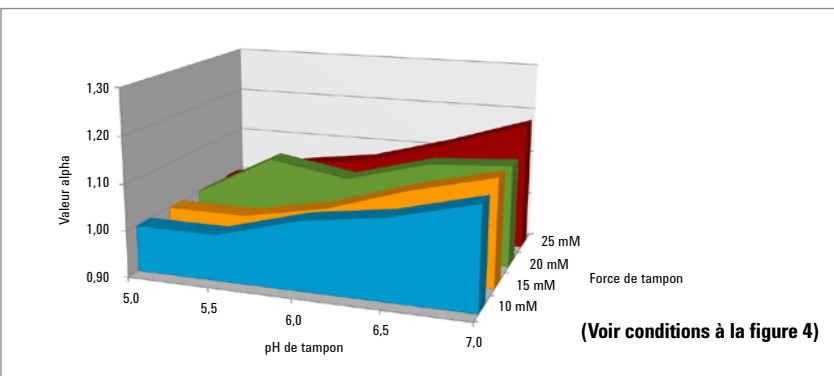


Figure 5b. Courbes de valeur alpha pour colonne Bio WCX 3 μ m, 4,6 x 50 mm.

Économisez temps et argent sur la préparation des tampons



Préparation manuelle des tampons



Mélange dynamique automatique en ligne des tampons

Le logiciel Buffer Advisor d'Agilent vous aide à automatiser la production de tampons. Le mélange dynamique de seulement quatre solutions de base vous évite de préparer et de titrer plusieurs solutions tampon.

Améliorez les performances : Quatre solutions de base permettent d'effectuer plus de 88 analyses, avec un gain de temps évident

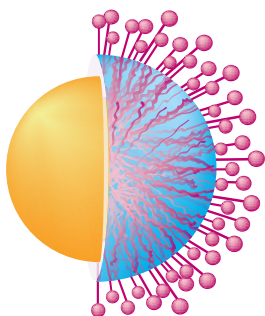
Économisez du temps : la fonction mélange quaternaire permet de mélanger plusieurs solutions de pH différents et, par voie de conséquence, simplifie la préparation des tampons.

Réduisez les coûts : évaluez les conditions d'ajustement du pH avant d'analyser les échantillons afin de réduire le gaspillage d'échantillons et le temps d'analyse.

Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

UNE CONCEPTION ADAPTÉE AUX SÉPARATIONS À HAUT RENDEMENT DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Particule Bio MAb



Colonnes HPLC Agilent Bio MAb : des performances supérieures

- Les particules, la couche hydrophile et le greffage résistent aux pressions élevées, augmentant ainsi la résolution et la rapidité des séparations.
- La couche hydrophile élimine la plupart des interactions non spécifiques.
- Une couche hautement uniforme et dense de groupements échangeurs de cations faibles (WCX) est chimiquement greffée au revêtement polymérique hydrophile.

Utilisez Bio MAb pour identifier la troncature C-terminale sur les chaînes lourdes

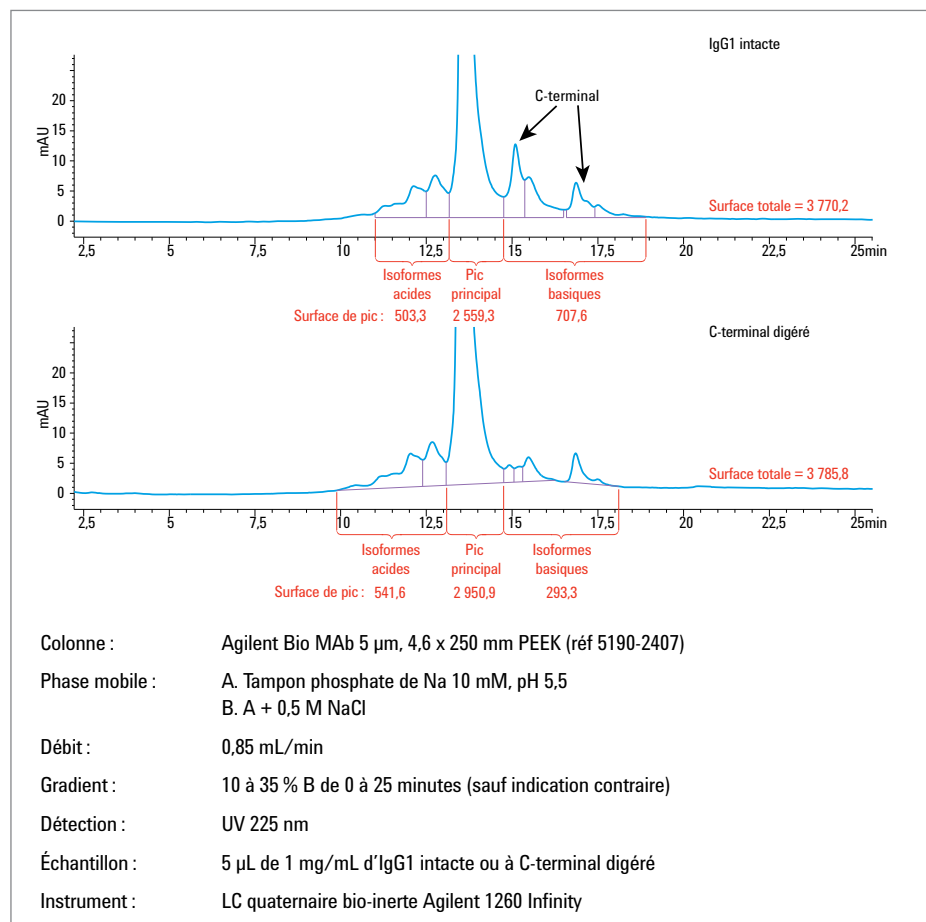


Figure 6. Calcul d'une IgG1 à C-terminal digéré de source A avec une colonne Agilent Bio MAb 5 µm sur le LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity. La colonne est très résolutive, ce qui a donné une meilleure identification de pic et une quantification précise.



Pour être efficace, l'analyse des anticorps exige vitesse et précision. Les colonnes Agilent Bio MAB offrent des avantages uniques qui en font l'outil idéal pour les séparations d'anticorps haute résolution.

- **Précision accrue** : pas d'interactions non spécifiques en raison d'une couche polymérique hydrophile qui recouvre les particules en poly(styrène divinylbenzène) rigides, non poreuses et fortement réticulées
- **Analyses de MAb hautement performantes** : une couche extérieure de greffons échangeurs d'ions plus dense produite par un processus optimisé
- **Robustesse de la méthode** : des performances éprouvées donnant des résultats précis et constants
- **Une gamme de choix pour affiner votre séparation** : une gamme de granulométries pour des séparations d'anticorps à résolution maximale

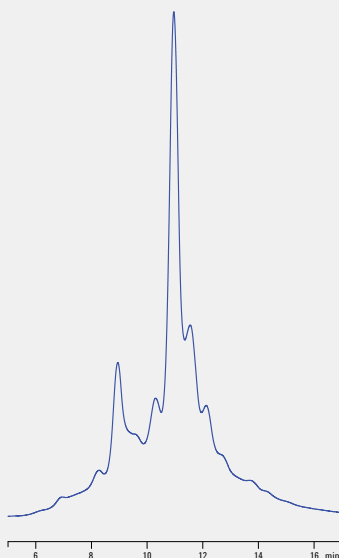
Gradients de pH – une alternative puissante pour l'analyse des isoformes de charge

Une technique alternative aux méthodes conventionnelles d'échange d'ions pour les isoformes de charge s'appuie sur l'utilisation d'un gradient de pH.

Les méthodes d'échange d'ions conventionnelles utilisent un éluant de force ionique croissante pour éluer et séparer les protéines et isoformes de la colonne IEX. Lorsque la salinité augmente, les interactions entre les protéines et la colonne IEX sont interrompues et la séparation est effectuée.

Il est possible d'utiliser une méthode reposant sur le gradient de pH avec la chromatographie d'échange de cations. L'augmentation du pH rend les protéines neutres (ou chargées négativement) et les fait éluer de la colonne. Cette approche gagne en popularité en raison de la haute résolution qui est obtenue mais aussi de la facilité d'utilisation de ces méthodes avec les dernières HPLC.

Le tableau ci-dessous compare les deux méthodes.



Analyse d'un anticorps monoclonal IgG avec un gradient de pH de 6,5 à 7,5 (0 – 20 min), 50 mM, Agilent Bio MAB 5 µm, 4,6 x 50 mm

IEX basé sur la concentration en sel

Avantages	• Méthode avérée • Utilise des instruments HPLC standard • Capacité à collecter directement les fractions
Inconvénients	• Intolérante aux extrêmes de pH et de concentrations en sels rencontrés dans les échantillons • Développement de méthode nécessaire et souvent long

IEX basé sur le pH

Avantages	• Option multiproduits • Tolère les changements de concentration saline et de pH d'échantillon • Utilise l'expertise et les instruments HPLC courants • Capable d'analyser les échantillons en cours de fabrication • Peut être rapide et facile avec des outils tels que le logiciel Buffer Advisor
Inconvénients	• Relativement nouveau

Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

REPRODUCTIBILITÉ ET PRÉCISION

Grâce à leur résine particulière, les colonnes Agilent Bio MAb sont idéales pour la séparation des anticorps monoclonaux en fonction de leur charge. Le logiciel Agilent Buffer Advisor vous aidera à effectuer le gradient de pH.

Les tableaux 1 et 2 illustrent les temps de rétention moyens ainsi que les écarts-types relatifs de surface de six répliques d'une injection d'IgG1. Les colonnes Bio MAb ont joué un rôle clé dans une méthode présentant une excellente reproductibilité et précision, comme l'indiquent les faibles écarts-types relatifs.

Une variation du volume d'injection de $\pm 10\%$ par rapport à la méthode actuelle a provoqué une déviation importante de l'écart-type relatif de surface ; cette déviation était toutefois attendue en raison de la charge sur la colonne échangeuse d'ions. Aucun autre changement significatif du modèle chromatographique n'a été observé suite à des variations délibérées des conditions expérimentales, ce qui indique que la méthode est robuste.

Les colonnes Bio MAb offrent une quantification précise et des méthodes robustes

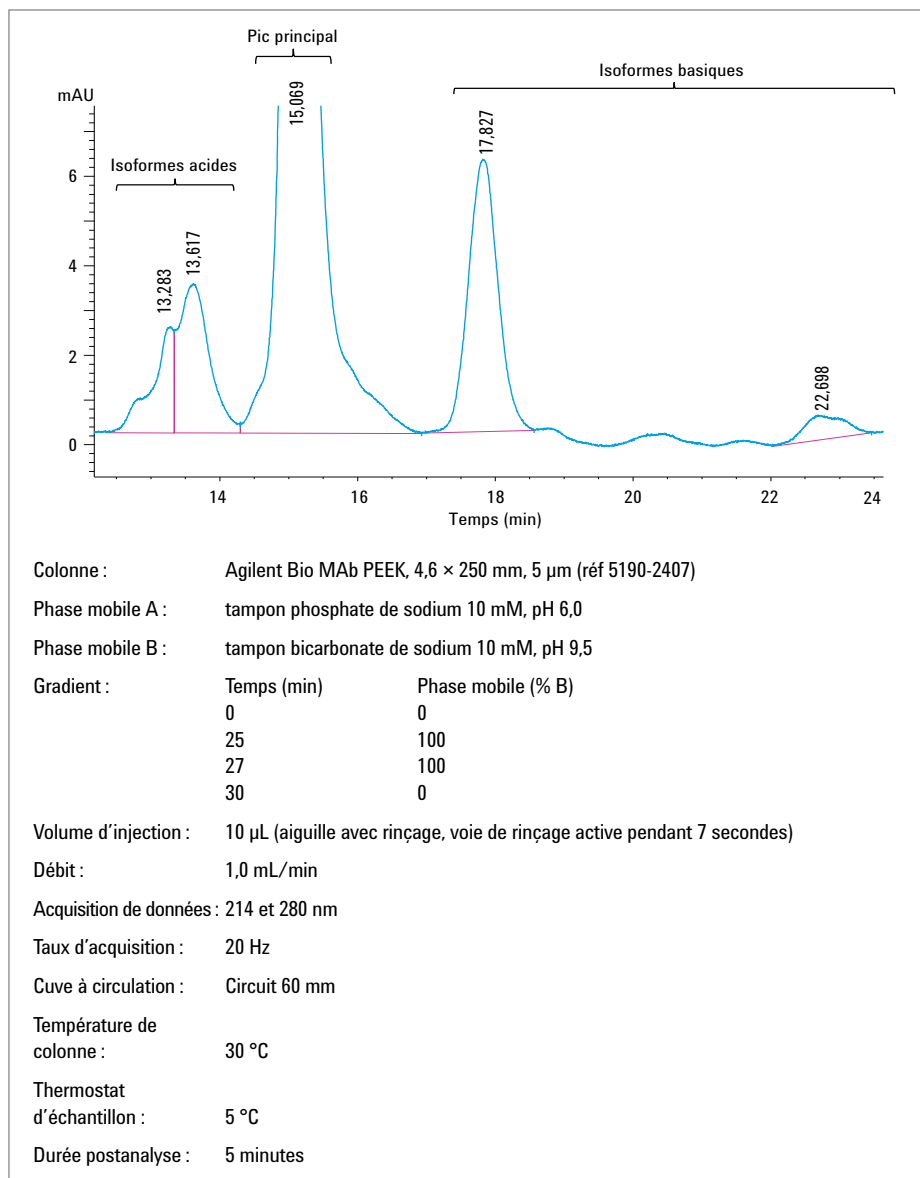


Figure 7. Chromatogramme de la séparation par échange de cation d'une IgG1, réalisée à l'aide d'un gradient de pH et d'une colonne Agilent Bio MAb PEEK, 4,6 x 250 mm, 5 µm.

MISEZ SUR DES PERFORMANCES FIABLES ET ROBUSTES

Nous tenons compte des réalités concrètes de votre laboratoire, qui exigent que votre colonne fournisse une séparation constante, même avec des petites variations de méthode. C'est pourquoi nous testons nos colonnes pour nous assurer qu'elles répondent au plus haut niveau de performance dont vous avez besoin.

Tableau 1. Quantification des isoformes de charge par % de surface, n=6.

	TR (min)A	% surface
Isoformes acides	13,28	9,87
	13,61	
Pic principal	15,058	76,92
Isoformes basiques	17,82	13,21
	22,69	

Tableau 2. Ecart-type relatif du temps de rétention et de la surface de pic (%), n=6 pour le pic principal.

	Temps de rétention	Surface de pic
Moyenne (min)	15,058	1 172
Écart-type relatif	0,1061	1,60

Tableau 3. Évaluation de la solidité de la méthode – paramètres clés variables.

Paramètres	Variation	Déviati on du TR (limite : ± 3,0 %)	Déviati on de surface (limite ± 5,0 %)
		Pic principal	
Variation du volume d'injection (10 µL ± 10 %)	– 1 µL	– 0,19	10,49
	+ 1 µL	0	– 9,89
Variation de la température de colonne (30 °C ± 5 %)	– 5 %	– 1,19	2,73
	± 5 %	0,66	2,13
Variation de pH du tampon (6,0 ± 0,2)	– 0,2	0,199	– 0,68
	+ 0,2	0,99	– 0,08
Variation du débit (1,0 ± 2 %)	– 2 %	0,66	2,73
	± 2 %	0	– 1,10

Pour évaluer la robustesse de cette méthode, quatre paramètres critiques de la méthode optimisée ont été modifiés : volume d'injection, température de colonne, pH de tampon et débit. Les déviations d'écart-type relatif étaient toutes conformes aux attentes.

Test de pH facile et fiable, élaboré pour les chromatographes

Agilent propose désormais toute une gamme de pH-mètres et d'électrodes. Conçus pour les chromatographes, ces pH-mètres offrent une interface intuitive et une robustesse exceptionnelle pour votre laboratoire.

Des électrodes Agilent CrossLab sont disponibles pour les pH-mètres non Agilent.

Pour en savoir plus, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AgilentpH



Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

COLONNES MONOLITHES EN POLYMÈRE POUR LES SÉPARATIONS DE MACRO-BIOMOLÉCULES

Nos colonnes HPLC échangeuses d'ions Bio-Monolith offrent des séparations haute résolution et rapides des anticorps (IgG, IgM), ADN plasmidique, virus, phages et autres macro-biomolécules.

- **Précision supérieure** : risque de contamination plus faible lors de la l'analyse d'échantillons complexes. Un disque monolithe (5,2 x 4,95 mm, 100 µL) à canaux continus élimine le transfert de masse par diffusion
- **Séparations rapides** : l'absence de diffusion, pores et volume mort permet un transport rapide entre les phases mobile et stationnaire
- **Développement de méthode efficace** : les séparations extrêmement rapides baissent les délais et les coûts de développement de méthode. Économisez du temps et du tampon en verrouillant les paramètres de méthode
- **Une gamme de choix pour affiner votre séparation** : inclut les phases d'échange de cations forts ainsi que les phases d'échange d'anions forts et faibles. Les colonnes HPLC Bio-Monolith sont compatibles avec les systèmes HPLC et LC préparatifs, y compris la série Agilent 1200 Infinity

Guide de sélection de colonne HPLC Bio-Monolith d'Agilent

Colonne	Description	Principales applications
Bio-Monolith QA	La phase greffée amine quaternaire (échange d'anions forts) est entièrement chargée sur une plage de pH opérationnelle de 2 à 13, et interagit avec les biomolécules chargées négativement.	• Suivi et contrôle-qualité du procédé d'adénovirus • Suivi et contrôle-qualité de la purification d'IgM • Suivi d'élimination des impuretés d'ADN • Suivi d'élimination d'endotoxine • Pureté HSA
Bio-Monolith DEAE	La phase greffée diéthylaminoéthyle (échange d'anions faibles) offre une meilleure sélectivité pour les biomolécules à charge négative sur une plage de pH opérationnelle de 3 à 9.	• Suivi de procédé et contrôle qualité de la fabrication et la purification des bactériophages • Suivi de procédé et contrôle qualité de la purification de l'ADN plasmidique
Bio-Monolith SO ₃	La phase greffée sulfonyle (échange de cations forts) est entièrement chargée sur une plage de pH opérationnelle de 2 à 13, et interagit avec les biomolécules chargées positivement.	• Séparations analytiques à haute résolution et rapides des grosses molécules, telles que les protéines et anticorps • Analyse rapide d'hémoglobine A1c



Des échantillons ont été prélevés du bioréacteur à 26, 158 et 191 minutes (voir **Figure 8**). Le pic 1 représente les phages, milieu et les cellules hôtes, le pic 2 représente l'ADNg et le pic 3 représente l'ADNg fragmenté. Pendant la prolifération des phages, la concentration d'ADN génomique (ADNg) augmente lorsque les cellules hôtes sont lysées. Lors des dernières phases de fermentation, l'ADNg commence à se dégrader en fragments, qu'il n'est pas possible d'éliminer facilement lors de l'étape de purification. C'est pourquoi il est essentiel d'arrêter le cycle de fermentation avant la dégradation de l'ADN génomique.

Ces échantillons complexes contiennent des débris de cellule pouvant boucher la colonne HPLC et limiter la capacité à surveiller la fermentation rapide. La structure à pores ouverts de la colonne Bio-Monolith DEAE réduit les chances de colmatage et permet une surveillance de procédé en temps réel efficace.

Les colonnes Bio-Monolith DEAE assurent un suivi efficace du procédé pour un rendement de produit maximum

La colonne Bio-Monolith DEAE contrôle la production des phages pendant la fermentation

Colonne :	Bio-Monolith DEAE, 5,2 x 4,95 mm (réf 5069-3636)
Phase mobile :	A : Tampon phosphate 125 mM, pH 7,0 B : Tampon phosphate 125 mM + 1 M NaCl, pH 7,0
Débit :	1 mL/min
Gradient :	100 % tampon A (2,5 min) 0 à 100 % tampon B (10 min) 100 % tampon A (2 min)
Détecteur :	UV à 280 nm
Instrument :	Système HPLC à gradient haute pression, série Agilent 1200 Infinity

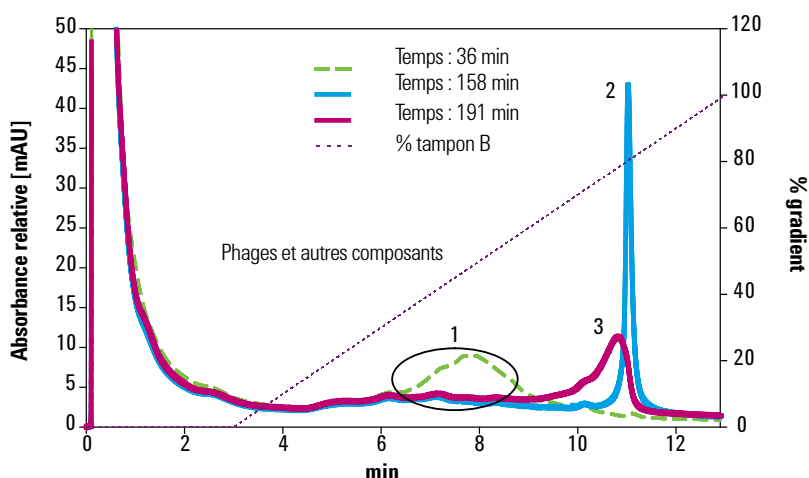


Figure 8. Quand la prolifération des phages progresse, la concentration d'ADN génomique (ADNg) augmente avec la lyse des cellules hôtes. Lors des dernières phases de la fermentation, l'ADNg commence à se dégrader en fragments. Ces fragments d'ADNg sont difficiles à éliminer lors de l'étape de purification, c'est pourquoi il est essentiel d'arrêter le cycle de fermentation avant la dégradation de l'ADN génomique. Le chromatogramme ci-dessus représente trois échantillons prélevés du bioréacteur à 36, 158 et 191 minutes. Le pic 1 représente les phages, le milieu et les cellules hôtes, le pic 2 l'ADNg intact et le pic 3 l'ADNg fragmenté.

Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

SÉPARATIONS FIABLES D'OLIGONUCLÉOTIDES SYNTHÉTIQUES

Nos colonnes PL-SAX sont adaptées aux séparations HPLC par échange d'anions des protéines, peptides et oligonucléotides synthétiques déprotégés. Des conditions de température, solvant organique et pH élevé pour la dénaturation sont utilisées pour les séparations d'oligonucléotides.

- **Longue durée de vie des colonnes :**

La fonction d'échange d'anions forts assure une stabilité chimique et thermique exceptionnelle, même avec des éluants à l'hydroxyde de sodium

- **Excellente performance chromatographique** pour les petites granulométries

- **Options analytiques de bout en bout :**
5 µm pour l'analyse, 10 et 30 µm pour la purification

- **Développement de méthode flexible :**
Echange d'ions sur une large plage de pH. La fonction d'échange d'anions forts – liés de manière covalente à un polymère chimiquement stable et entièrement poreux – étend la plage de pH opérationnelle

- **Adapté à la purification** pour conserver l'activité biologique des protéines

Haute résolution des oligonucléotides

Séparation à haute résolution d'un étalon d'oligonucléotides poly-T, enrichi avec un 10-mère, 15-mère, 30-mère et 50-mère (pics principaux)

Colonne : PL-SAX 1000 Å, 4,6 x 50 mm, 8 µm, (réf PL1551-1802)

Phase mobile : A : 7:93 v/v acétonitrile : 0,1 M TEAA, pH 8,5

B : 7:93 v/v acétonitrile : 0,1 M TEAA, 1 M chlorure d'ammonium, pH 8,5

Gradient : 0 à 40 % B en 10 min, suivi de 40 à 70 % B en 14 min et 70 à 100 % B en 25 min

Débit : 1,5 mL/min

Température : 60 °C

Détecteur : UV, 220 nm

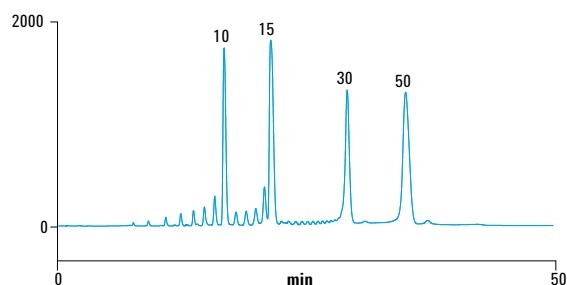


Figure 9. Séparation haute résolution d'oligonucléotides poly-T. Avec le gradient utilisé dans ce cas, une séparation complète du n et du n-1 a été facilement obtenue jusqu'au 15 mère.



Les séparations haute résolution d'oligonucléotides sont possibles avec l'échangeur d'anions forts PL-SAX qui permet de séparer le n-1 du n. La **figure 9** illustre la séparation d'un étalon d'oligonucléotides poly-T contenant un 10 mère, 15 mère, 30 mère et 50 mère (pics principaux). De l'acétonitrile a été ajouté à l'éluant pour supprimer la formation de structures secondaires qui auraient un effet négatif sur la séparation.

La stabilité chimique de la phase stationnaire PL-SAX est démontrée dans notre analyse de choline kinase (voir **figure 10**) dans laquelle l'activité enzymatique a bien été maintenue. Dans cette analyse, l'échantillon de 75 mL de choline kinase partiellement purifiée, provenant du cytosol de foie, contient approximativement 1 mg d'enzyme à une masse moléculaire de 160 000.

Dans la **figure 11**, l'enzyme amyloglucosidase a été fractionnée à partir du filtrat de culture cellulaire d'*Aspergillus niger*. L'enzyme existe sous deux formes avec des masses moléculaires de 99 kD et 112 kD (pics 1 et 2, respectivement), qui ont la même composition d'acides aminés mais un contenu en glucides différent. Avec la colonne PL-SAX 4000 Å 4,6 x 50 mm, 8 µm, il est possible de purifier 3,6 mg des isoenzymes ou 20 mg d'enzyme totale en moins de deux minutes.

Purifiez des protéines biologiquement actives

Analyse de choline kinase sur PL-SAX 4000 Å

Colonne : PL-SAX, 4,6 x 50 mm, 8 µm (réf PL1551-1803)

Phase mobile : A : 20 mM Tris 5 % éthylène glycol, pH 7,5
(Les éléments ci-après sont nécessaires pour maintenir l'activité enzymatique)
1,0 mM acide éthylène glycol tétra-acétique
2,0 mM β-mercaptoéthanol
0,2 mM fluorure de phénylméthylsulfonyle
B : A + 1 M KCl

Débit : 3,0 mL/min

Détecteur : UV, 280 nm

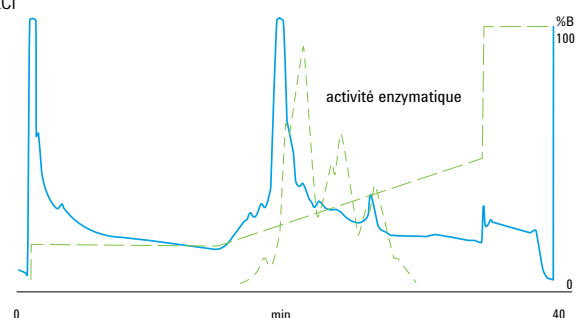


Figure 10. Dans cette analyse de choline kinase, l'activité enzymatique a été maintenue et des protéines actives étaient toujours présentes à la fin de la séparation.

Maximisez la capacité d'échantillon

Colonne : PL-SAX 4000 Å, 4,6 x 50 mm, 8 µm (réf PL1551-1803)

Gradient : Linéaire de 0 à 100 % B en 2 min

Éluant A : 0,01M Tris HCl, pH 8

Débit : 4,0 mL/min

Éluant B : A + 0,5M NaCl, pH 8

Détecteur : UV, 280 nm

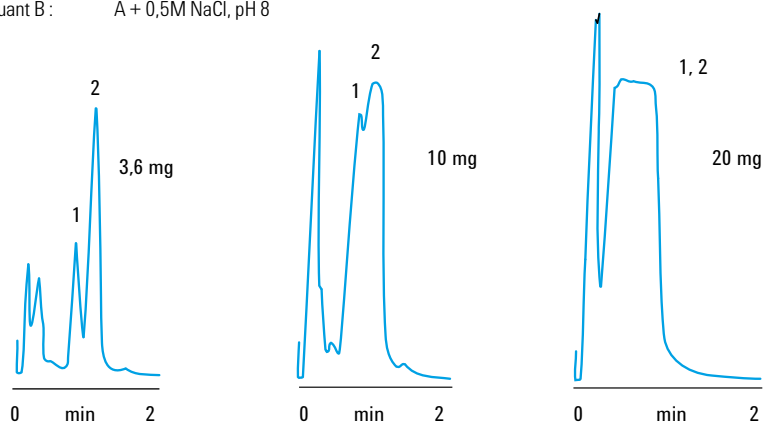


Figure 11. Purification rapide d'amyloglucosidase à différentes concentrations enzymatiques. Une colonne Agilent PL-SAX 4000 Å 8 µm a permis de purifier 3,6 mg des isoenzymes – ou 20 mg de l'enzyme totale – en moins de deux minutes.

Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

SÉPAREZ ET PURIFIEZ DIVERSES BIOMOLÉCULES

La PL-SCX est une matrice PS/DVB macroporeuse dotée d'un revêtement très hydrophile et d'une fonction d'échange de cations forts. Le processus de fabrication est contrôlé afin de fournir une densité optimale des groupes d'échange de cations forts pour analyser, séparer et purifier une vaste gamme de biomolécules, des petits peptides jusqu'aux grandes protéines.

- **Haute résolution** : la phase 5 µm offre des séparations fiables à plus haute résolution, tandis que les phases 10 et 30 µm sont généralement utilisées pour la LC moyenne pression.
- **Une gamme de choix pour affiner votre séparation** : deux diamètres de pore (1000 Å et 4000 Å), qui fournissent de bonnes caractéristiques de transfert de masse pour une gamme de masses moléculaires
- **Stabilité exceptionnelle**, pour une longue durée de vie de colonne

Une stabilité chimique exceptionnelle envers la plus large plage d'éluants et de protocoles de purification

Colonne : PL-SCX 1000 Å, 4,6 x 50 mm, 8 µm, (réf PL1551-1802)

Éluant A : 0,02 M KH_2PO_4 , pH 6

Éluant B : A + 0,5 M NaCl, pH 6

Gradient : Linéaire de 0 à 100 % B en 20 min

Détection : UV, 280 nm

Solution de rinçage (env. 40 volumes de colonne)	Facteur R_2 (pics 2 et 3)	Capacité de protéines (mg lysozyme/mL vol. de col.)
Analyse initiale	1,5	33
0,2 M HCl	1,7	31
0,2 M NaOH	2,0	33
6 M urée	1,6	33
1 % TFA	1,6	33
10 % acide acétique	1,7	28
100 % méthanol	1,6	31
0,5 M HCl	1,5	31
2 M NaOH	2,0	33

Tableau 4. Comparaison des séparations de protéines dans une colonne Agilent PL-SCX avant et après le rinçage avec des acides, bases et solvants forts.

Filtres à faible taux d'absorption de protéines Captiva

Nos filtres PES offrent un faible taux d'absorption de protéines constant pour le filtrage des protéines.

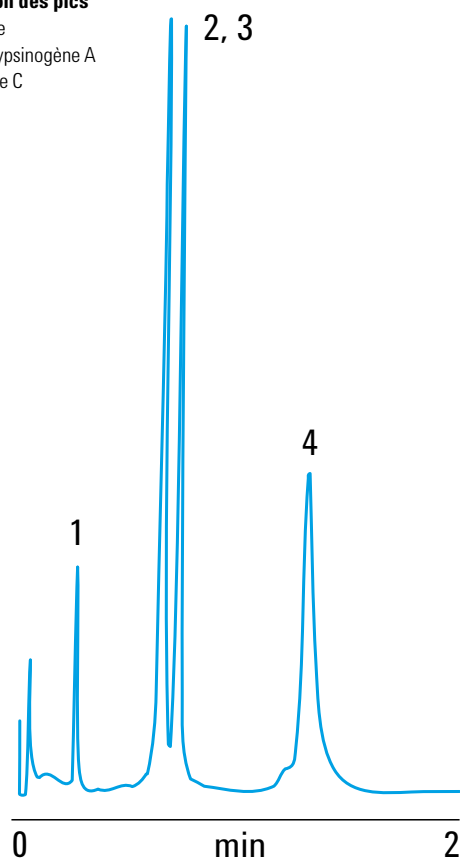
Pour en savoir plus, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/filtration



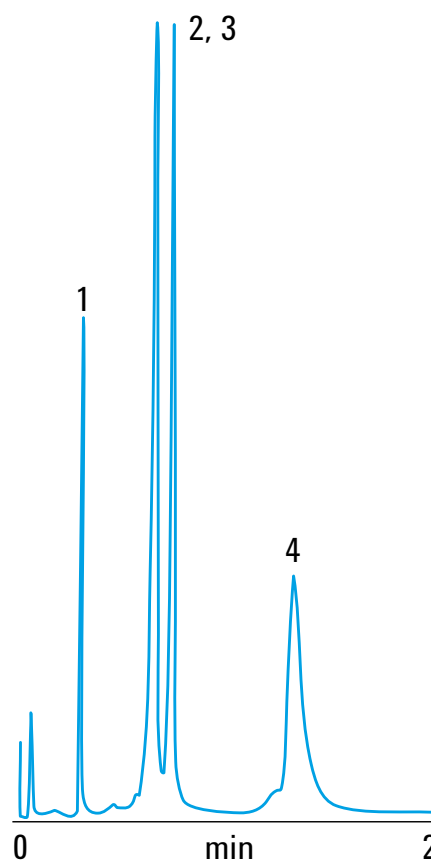


Identification des pics

1. Myoglobine
2. α -chymotrypsinogène A
3. Cytochrome C
4. Lysozyme



Chromatogramme initial d'une séparation de protéines dans une colonne Agilent PL-SCX.



Chromatogramme final de la même solution de protéines dans la même colonne après rinçage avec quarante volumes de colonne d'éluants forts.

Voir conditions page 16

Figure 12. Comme l'illustrent les exemples ci-dessus, la phase PL-SCX est extrêmement stable lorsqu'elle est exposée à des pressions élevées ainsi qu'à des acides et bases forts.

Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides,
rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

INFORMATIONS POUR COMMANDER

Colonnes Agilent Bio IEX pour une large plage de caractérisations de protéines et de peptides

Colonnes HPLC Agilent Bio IEX, PEEK

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

Colonnes HPLC Agilent Bio IEX, acier inoxydable

Dimensions (mm)	Granulométrie (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
4,0 x 10, précolonne	10	5190-2434	5190-2454	5190-2474	5190-2494
4,0 x 10, précolonne	5	5190-2426	5190-2446	5190-2466	5190-2486
4,0 x 10, précolonne	3	5190-2424	5190-2444	5190-2464	5190-2484
4,0 x 10, précolonne	1,7	5190-2422	5190-2442	5190-2462	5190-2482

Vous recherchez des pièces et accessoires pour des bioséparations hautes performances, telles que des capillaires en PEEK revêtus d'acier inoxydable pour la bioinertie et la robustesse haute pression?

Rendez-vous sur le site [agilent.com/chem/LCsupplies](https://www.agilent.com/chem/LCsupplies)

Pour recevoir une copie du catalogue d'accessoires Infinity et d'autres documents importants, consultez le site

[agilent.com/chem/GetGuides](https://www.agilent.com/chem/GetGuides)



INFORMATIONS DE COMMANDE

Colonnes Agilent Bio MAb pour anticorps monoclonaux

Colonnes HPLC Agilent Bio MAb

Dimensions (mm)	Granulométrie (µm)	Bio MAb PEEK	Bio MAb acier inoxydable
21,2 x 250	5		5190-6885
10 x 250	5		5190-6884
4,6 x 250	10	5190-2415	5190-2413
4,6 x 50, précolonne	10	5190-2416	
4,6 x 250	5	5190-2407	5190-2405
4,6 x 50, précolonne	5	5190-2408	
4,6 x 50	3		5190-2403
4,6 x 50	1,7		5190-2401
4,0 x 10, précolonne	10		5190-2414
4,0 x 10, précolonne	5		5190-2406
4,0 x 10, précolonne	3		5190-2404
4,0 x 10, précolonne	1,7		5190-2402
2,1 x 250	10	5190-2419	
2,1 x 50, précolonne	10	5190-2420	
2,1 x 250	5	5190-2411	
2,1 x 50, précolonne	5	5190-2412	

Colonnes Agilent Bio-Monolith pour les séparations de macro-biomolécules

Colonnes HPLC Bio-Monolith d'Agilent

Colonne	Réf.
Bio-Monolith QA	5069-3635
Bio-Monolith DEAE	5069-3636
Bio-Monolith SO ₃	5069-3637



Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides,
rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

INFORMATIONS DE COMMANDE

Colonnes Agilent PL-SAX pour oligonucléotides synthétiques

Colonnes échangeuses d'anions forts PL-SAX

Dimensions (mm)	Granulométrie (µm)	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
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

Phase en vrac échange d'anions forts PL-SAX

Masse	Granulométrie (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

INFORMATIONS DE COMMANDE

Colonnes Agilent PL-SCX pour une large gamme de biomolécules et solutés

Colonnes échangeuses de cations forts PL-SCX

Dimensions (mm)	Granulométrie (µm)	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
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

Phase en vrac échange de cations forts PL-SCX

Masse	Granulométrie (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

Pour en savoir plus sur les séparations de protéines haute résolution et rapides,
rendez-vous sur le site [agilent.com/chem/AdvanceBio](https://www.agilent.com/chem/AdvanceBio)

LC QUATERNAIRE BIO-INERTE AGILENT 1260 INFINITY ANALYSE DE BIOMOLÉCULES INFINIMENT SUPÉRIEURE

Du débit de solvant sans fer et acier aux composants de circuit sans métal, la LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity définit de nouvelles normes en matière de performance et de fiabilité.

Ce système robuste, qui relève avec brio le défi posé par les conditions de solvant difficiles courantes dans les analyses de protéines et produits biothérapeutiques, minimise les problèmes associés aux interactions non-spécifiques. Associé aux colonnes BioHPLC échangeuses d'ions d'Agilent, il vous permet d'obtenir le meilleur temps de résolution.

Système 100 % bioinerte

Tous les capillaires et raccords dans l'échantillonneur automatique, le compartiment de colonne et les détecteurs sont entièrement sans métaux, et les biomolécules sont uniquement en contact avec de la céramique ou du PEEK. Ceci vous aide à éviter les écueils d'asymétrie des pics, de faible rendement et de baisse de durée de vie des colonnes en minimisant les interactions secondaires des protéines et peptides avec les surfaces métalliques.

De réelles performances UHPLC

Plage de pression allant jusqu'à 600 bars, capable de gérer les plus hautes pressions exigées par les nouvelles technologies de colonnes avec de plus petites particules. L'association parfaite pour toutes les colonnes SEC et IEX avec des diamètres de particule pouvant descendre jusqu'à 1,7 μm .



Technologie de capillaires et raccords pour un fonctionnement robuste et sûr

Avec la LC bio-inerte 1260 Infinity, Agilent fait appel à la une technologie de capillaires et raccords pour associer la bioinertie sans métal et le fonctionnement haute pression dans une combinaison unique. Trois différents types de capillaires sont utilisés :

- Capillaires en titane très résistants à la corrosion pour les lignes de la pompe
- Capillaires en PEEK revêtu de métal dans l'échantillonneur automatique et le compartiment de colonne
- Capillaires en PEEK dans les parties basse pression du système en aval de la colonne

Les capillaires en PEEK revêtu de métal ont un système de connexion unique pour une bioinertie complète à chaque connexion. La pointe en PEEK interconnectée mécaniquement est très résistante aux tensions latérales et rotatives, ce qui supprime le couple au capillaire tout en serrant le raccord.

Pour en savoir plus, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/LCcapillaries



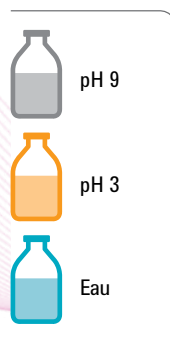
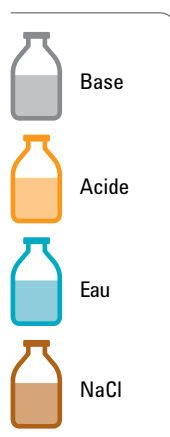
Pour en savoir plus sur le LC bio-inerte Agilent 1260 Infinity, consultez la page agilent.com/chem/1200BioLC

SIMPLIFIEZ VOTRE FLUX DE BIOANALYSE

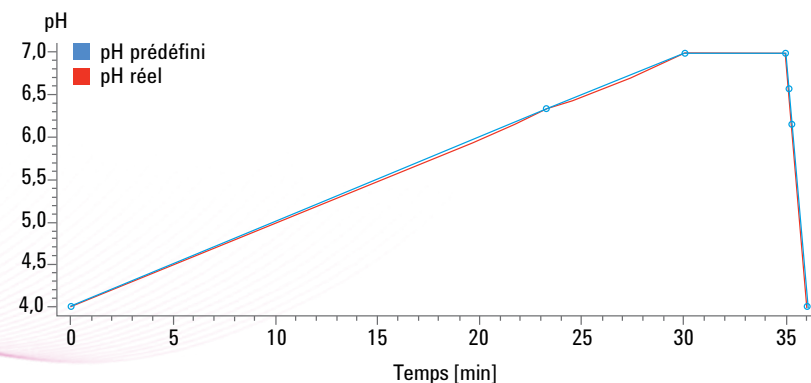
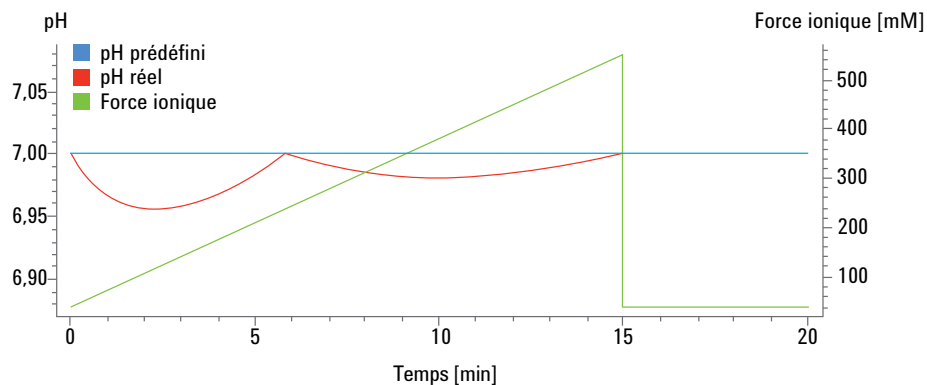
Simplification du mélange de tampon et de l'ajustement du pH

Grâce au principe de mélange de la pompe quaternaire bioinerte 1260 Infinity, le logiciel Buffer Advisor facilite le mélange dynamique des solvants à partir de seulement quatre solutions de base. Résultat : une simplification du flux de bioanalyse et une réduction importante du temps de préparation du tampon.

Une modélisation théorique vous aide tout d'abord à trouver les meilleures conditions de concentrations en sel ou de pH pour votre séparation de protéines. Les conditions de gradient optimisées sont ensuite enregistrées dans un fichier au format XML pour une importation ultérieure dans Agilent OpenLAB CDS. Ce fichier définit le mélange de solvants dans le tableau de la pompe quaternaire de mélange bioinerte 1260 Infinity. Il vous suffit de préparer quatre solutions de base : tampon acide, tampon basique, eau, sel. Pour créer un gradient salin, une quantité croissante de solution saline de la voie D est mélangée aux composants de tampons acides et basiques des voies A et B, ainsi qu'avec de l'eau pour la dilution de la voie C.



Les gradients salins ou de pH sont faciles à créer à partir de solutions de base.



Pour en savoir plus sur le gain de temps que vous apporte le logiciel Buffer Advisor, consultez le site agilent.com/chem/infinity-bufferadvisor

UNE GAMME DE BIOCOLONNES QUI VOUS OFFRE LE PLUS GRAND CHOIX ET CONTRÔLE

Nos colonnes BioHPLC échangeuses d'ions sont élaborées et testées pour assurer une excellente résolution et fournir d'exceptionnelles performances biochromatographiques, ce qui en fait l'outil pour les études d'isoformes de charge.

Notre vaste choix comprend :

- **Des colonnes Agilent Bio IEX** pour les protéines et peptides
- **Des colonnes Agilent Bio MAb** pour les anticorps monoclonaux
- **Des colonnes Agilent Bio-Monolith** pour les systèmes LC préparatifs
- **Des colonnes Agilent PL-SAX** pour les oligonucléotides synthétiques
- **Des colonnes Agilent PL-SCX** pour les biomolécules et solutés

Depuis la purification jusqu'à l'analyse des échantillons, nos colonnes BioHPLC échangeuses d'ions s'intégreront facilement dans votre processus, pour des résultats reproductibles de grande qualité et des transferts de méthodes simples.

Vous pouvez compter sur Agilent pour couvrir tous vos besoins en colonnes BioHPLC, y compris pour l'exclusion stérique, la phase inverse, l'HILIC et les colonnes d'affinité.



Pour plus d'informations

Pour en savoir plus sur nos colonnes BioHPLC échangeuses d'ions, rendez-vous sur le site agilent.com/chem/AdvanceBio

Trouvez un centre de contact Agilent dans votre pays : agilent.com/chem/contactus

États-Unis et Canada :
1-800-227-9770
agilent_inquiries@agilent.com

Europe :
France
+33 (0)810 446 446
Belgique
+32 (0)2 404 92 22
Suisse
+41 (0)848 80 3560
info_agilent@agilent.com

Asie Pacifique :
inquiry_lsca@agilent.com

Inde :
india-lsca_marketing@agilent.com

Faites confiance aux solutions AdvanceBio pour des analyses biopharmaceutiques plus rapides et constantes

Nos colonnes HPLC AdvanceBio ont été élaborées pour fournir des performances constantes et exceptionnelles lors des séparations et caractérisations de peptides et protéines. La science sur laquelle repose cette gamme de colonnes de pointe introduit de nombreux avantages : amélioration de la précision et de la productivité, et élimination des interférences pouvant affecter votre avancée analytique.

Et pour une confiance absolue, les colonnes AdvanceBio subissent des tests rigoureux afin d'assurer d'excellents résultats. Elles sont également appuyées par notre garantie pleine satisfaction de 60 jours.

Ces informations peuvent être modifiées sans avis.

©Agilent Technologies, Inc. 2013
Imprimé aux États-Unis, le 10 décembre 2013
5991-2449FR



Agilent Technologies