

Guía práctica de Agilent sobre

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO PARA EL ANÁLISIS DE BIOMOLÉCULAS

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

GUÍA PARA REALIZAR UNA SEC CON ÉXITO

La separación cromatográfica de biomoléculas en función de su tamaño en disolución se conoce como cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). A diferencia de otros modos de cromatografía, se basa en la ausencia de interacciones entre el analito y la fase estacionaria empaquetada en la columna. Permite una solución idónea para separar proteínas inalteradas de contaminantes, entre los que pueden encontrarse agregados, excipientes, restos celulares y otras impurezas generadas por la degradación, y analizarlas. En consecuencia, la SEC es muy utilizada tanto en el desarrollo como en la fabricación para la caracterización de moléculas bioterapéuticas.

En esta guía, trataremos las separaciones SEC, el efecto del tamaño del soluto y del peso molecular, las opciones existentes para la selección de columna, importantes consideraciones sobre la fase móvil y las reglas generales para utilizar la SEC, entre otros aspectos.



LA SEPARACIÓN ES SENCILLA, SIN COMPLICACIONES

Con la SEC, las moléculas se separan de más grandes a más pequeñas en proporción a su peso molecular en disolución. Las moléculas muy grandes quedan excluidas del lecho empaquetado y son las primeras que eluyen en el volumen muerto. Las moléculas más pequeñas podrán penetrar en los poros en diverso grado, en función de su tamaño (Figura 1), siendo las más pequeñas las que más se difunden en la estructura del poro y las últimas en eluirse.

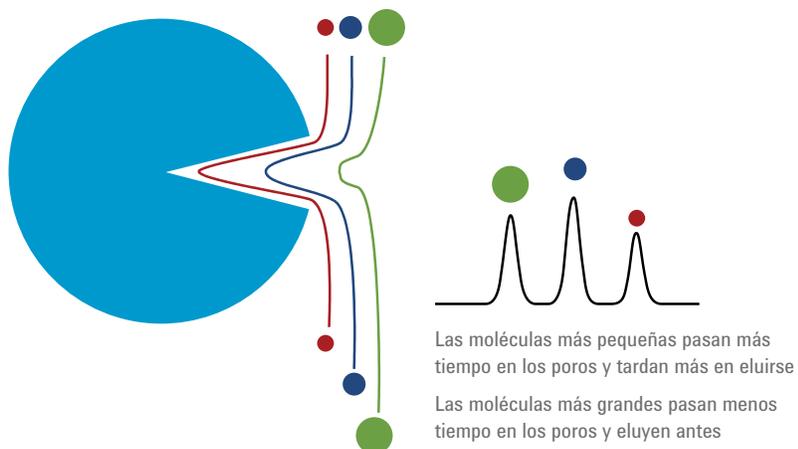


Figura 1: Las moléculas penetran en los poros de la fase estacionaria en distinto grado en función de su tamaño.

Para obtener más información sobre las biocolumnas Agilent para SEC, visite www.agilent.com/chem/bioHPLC

La cromatografía de exclusión por tamaño es adecuada para separar y cuantificar mezclas de proteínas, y en consecuencia es una valiosa técnica de control de calidad en la fabricación de proteínas recombinantes. Esto incluye la medida de agregados (dímeros, trímeros, tetrameros, etc.) o la separación de excipientes e impurezas de bajo peso molecular de proteínas de mayor peso molecular (Figura 2).

Resulta esencial comprender y controlar la agregación en las proteínas terapéuticas, pues ello afecta a la eficacia y vida útil de la columna, y podría incluso originar una respuesta inmunogénica potencialmente grave. Hay normas, como la ICH Q6B, que especifican claramente que los agregados deben resolverse del producto deseado y cuantificarse.

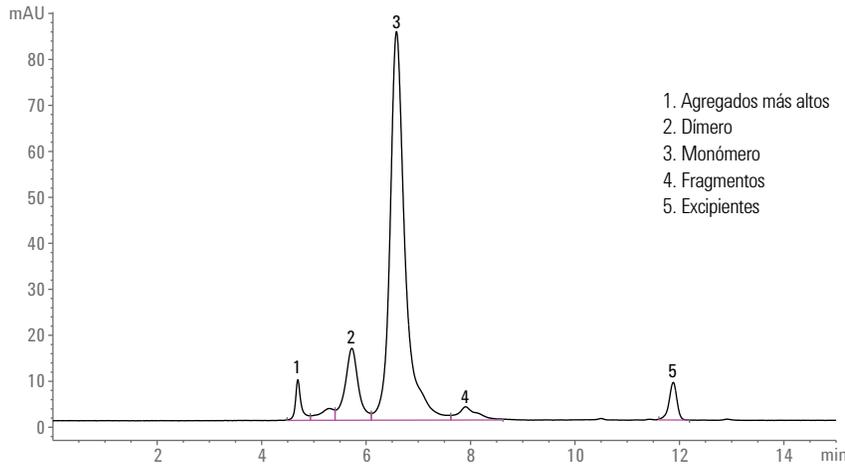


Figura 2: Separación de agregados de IgG y excipientes.

Separación de monómeros y dímeros de IgG inalterados

Columna: Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å, 7,8 x 300 mm, 2,7 µm (ref. PL1180-5301)

Instrumento: Sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

Temperatura: Ambiente

Detector: UV, 220 nm

Inyección: 5 µl

Muestra: IgG policlonal

Fase móvil: tampón fosfato sódico 150 mM a pH 7,0

El orden de elución normalmente sigue al peso molecular. Las moléculas de mayor peso molecular eluyen antes. Sin embargo, el verdadero mecanismo de la SEC se basa en el tamaño en disolución. La mayoría de las proteínas son compactas, pero algunas moléculas proteicas son cilíndricas, por lo que podrían eluirse antes de lo esperado debido a su mayor radio hidrodinámico en disolución (Figura 3). Además, las diferentes fases móviles pueden afectar al orden de elución debido a los cambios de tamaño en disolución (radio hidrodinámico o radio de giro).

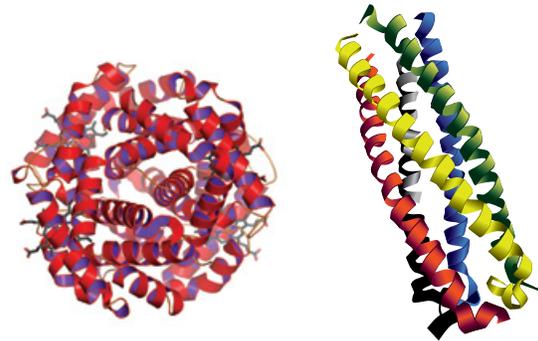


Figura 3: Comparación entre una proteína globular compacta y una cilíndrica.

Guía para el desarrollo de métodos SEC-UV/DAD

Seleccione las columnas y condiciones iniciales para separaciones por tamaños de biomoléculas, agregaciones, péptidos, polipéptidos y proteínas

Péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos monoclonales
PM >0,1-1.250 kDa

Péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos monoclonales
PM >0,1-10.000 kDa

Seleccione la columna en función del rango de pesos moleculares y del tamaño del poro

AdvanceBio SEC (2,7 µm)	
Tamaño de poro	Rango de PM (kDa)
130 Å	0,1-100
300 Å	5-1.250

Agilent Bio SEC-5 (5 µm)	
Tamaño de poro	Rango de PM (kDa)
100 Å	0,1-100
150 Å	0,5-150
300 Å	5-1.250
500 Å	15-5.000
1.000 Å	50-7.500
2.000 Å	>10.000

Condiciones iniciales recomendadas para la separación

Columna: AdvanceBio SEC o Agilent Bio SEC-5
Fase móvil: Tampón fosfato 150 mM, pH 7,0*
Gradiente: Isocrático en el rango 10-30 min
Temperatura: Recomendada: 10-30 °C, Máxima: 80 °C

Velocidad de flujo: De 0,1 a 0,4 ml/min (columnas de 4,6 mm de d.i.)
De 0,1 a 1,25 ml/min (columnas de 7,8 mm de d.i.)

Tamaño de muestra: ≤ 5 % del total del volumen de la columna

*Pueden usarse otros tampones acuosos con concentraciones salinas altas o bajas

Para obtener información adicional, consulte la nota de aplicación: *Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins* (publicación n.º 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/library

Después del cromatograma inicial, podrían ser necesarios cambios adicionales para mejorar la separación, mantener la solubilidad de las proteínas o reducir la interacción de la muestra con los medios cromatográficos. La fuerza iónica de la fase móvil puede aumentarse o reducirse para optimizar la separación. También puede ajustarse el pH, por lo general ± 0,2 unidades. Si fuera necesaria una mayor optimización, podría ampliarse el rango de aumento o disminución. También puede utilizarse un cambio de temperatura o la adición de un disolvente orgánico.

Para aquellos protocolos que requieran una concentración salina adicional, suelen utilizarse los siguientes tampones:

Cloruro sódico 100-150 mM en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0
Sulfato sódico 100-150 mM en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0
Urea 50-100 mM en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. También pueden utilizarse otras sales similares (como KCl) y clorhidrato de guanidina.

Rango de pH: 2,0-8,5

Posibles disolventes orgánicos que se pueden añadir:

Etanol al 5-10 % (u otros disolventes similares, como metanol o acetonitrilo) en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, DMSO al 5 % en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0. Tenga en cuenta que podría ser necesario reducir

la velocidad de flujo para mantenerla por debajo de la presión operativa máxima si se utilizan fases móviles de mayor viscosidad.

Temperatura:

Normalmente, las separaciones SEC se realizan a 10-30 °C. La separación de proteínas y péptidos podría requerir una temperatura superior con el fin de mejorar la resolución y recuperación de proteínas y péptidos hidrofóbicos. La SEC puede realizarse en una sala fría para conservar la máxima actividad biológica de las proteínas sensibles a la temperatura.

La temperatura operativa máxima de las columnas Agilent Bio SEC es de 80 °C.

Tenga en cuenta que temperaturas superiores pueden desnaturar las proteínas.

CONSIDERACIONES INSTRUMENTALES EN SEC

El mecanismo de separación SEC implica que el volumen de elución, o el tiempo de retención, resulta absolutamente esencial para el análisis. Esto requiere instrumentos de alto rendimiento para garantizar la precisión y la reproducibilidad. Son adecuadas las bombas isocráticas o las bombas de gradiente en modo isocrático, por lo que se pueden utilizar los detectores de índice de refracción (RI), así como los detectores UV o DAD, más convencionales. Para garantizar la estabilidad de línea de base, en especial si se utiliza un detector de índice de refracción, se recomienda encarecidamente la desgasificación en línea de la fase móvil y de los compartimentos termostatzados. El trabajo a temperaturas elevadas aumenta el coeficiente de difusión, lo que mejora la resolución y la reproducibilidad y reduce la exigencia de la columna. En consecuencia, los compartimentos termostatzados resultan esenciales en los sistemas de alto rendimiento.

Funcionamiento robusto y fiable, incluso en condiciones extremas de los disolventes

En el análisis de biomoléculas se utilizan con frecuencia tampones con elevadas concentraciones salinas, como NaCl 2 M o urea 8 M, y valores extremos de pH entre 1 y 13, lo que supone un desafío significativo para los instrumentos de LC. Gracias al diseño exclusivo del sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity, las agresivas condiciones de los disolventes no suponen ningún problema. Un titanio resistente a la corrosión en el sistema de bombeo de disolvente y materiales sin metales en la ruta de flujo de muestras crean un instrumento extremadamente robusto, lo que protege sus muestras y también su inversión. El detector también se ha diseñado para separaciones biomoleculares y no afecta al análisis de proteínas, a la forma de pico ni a la recuperación de los analitos.

Proteja sus proteínas durante el análisis

El calor puede desnaturar las proteínas y por ello es importante mantener la muestra a temperatura constante durante toda la ruta de flujo del sistema LC. El muestreador automático bioinerte Agilent con loop de muestra inerte y aguja de cerámica puede refrigerarse con un termostato adicional. Los intercambiadores de calor bioinertes para el compartimento termostatzado de columna mantienen la temperatura constante. Agilent ofrece numerosas celdas de flujo bioinertes para permitir un análisis fiable de proteínas en distintas condiciones. Si desea obtener más información sobre las opciones de celdas de flujo, consulte www.agilent.com/chem/bioflowcells.



Sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity



Celda de flujo bioinerte con etiqueta RFID, 10 mm, 13 µl (ref. G5615-60022)

Las soluciones de software proporcionan nuevas perspectivas

Al trabajar con la cromatografía de exclusión por tamaño, existen diversas opciones de software para ayudarle:

- **Software para HPLC:** el software Agilent OpenLAB CDS ChemStation le ayudará a obtener, revisar y organizar datos cromatográficos y a realizar análisis cuantitativos
- **Software para GPC/SEC:** disponible como parte del sistema GPC/SEC de Agilent, proporciona más información a partir del peso molecular
- **Software Buffer Advisor:** elimina del desarrollo de métodos los pasos de preparación de tampones, mezcla de tampones y control del pH, todos ellos tediosos y propensos a generar errores, creando gradientes salinos y de pH de manera rápida y sencilla.



Amplia caracterización molecular

Se puede utilizar la SEC para determinar el peso molecular medio de analitos poliméricos, como las moléculas naturales (polisacáridos, almidones, etc.) y los polímeros sintéticos (polietilenglicol u óxido de polietileno) (Figura 4).

Para proteínas o muestras más complejas, como las vacunas, suele precisarse una forma de análisis de datos más sofisticada, con un software especializado. En combinación con los detectores adecuados, se puede obtener valiosa información sobre la conformación de la muestra. Consulte la página 17 para obtener más información sobre las opciones de detectores.

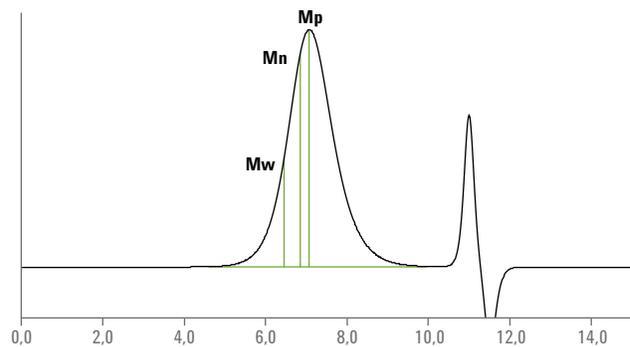
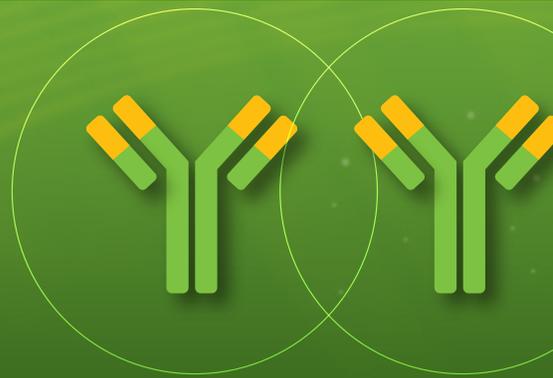


Figura 4: Separación SEC de polisacáridos; se muestran Mw, Mn y Mp.

COMPONENTES DE LA CARACTERIZACIÓN MEDIANTE EXCLUSIÓN DE TAMAÑO



Preparación de muestras

La preparación de muestras para la cromatografía de exclusión por tamaño es similar a la de cualquier análisis de proteínas para métodos HPLC. El aspecto más importante es que la muestra debe ser soluble tanto en el eluyente como (idealmente) en la propia fase móvil. Debido a las mayores dimensiones de la columna y a la baja velocidad lineal como resultado de las velocidades de flujo relativamente reducidas en comparación con otras formas de HPLC (véase "Tamaño de columna", a continuación), las concentraciones de muestras y los volúmenes de inyección podrían tener que ser superiores a lo normal. Para proteger la columna de posibles daños, recomendamos que se filtren o centrifuguen las muestras antes de su uso con el fin de eliminar las partículas. Sin embargo, el filtrado no debe usarse para solucionar una escasa solubilidad de la muestra; en este caso, habría que buscar un eluyente alternativo.

Para conseguir una preparación de muestras eficaz, también es importante asegurarse de que los métodos usados para disolver la muestra no cambien las propiedades de esta. Algunas proteínas podrían agregarse (formando dímeros y multímeros de mayor peso molecular) o disociarse (formando subunidades de menor peso molecular) en condiciones rigurosas. Entre ellas pueden incluirse los ciclos congelación-descongelación, las temperaturas extremas, la sonicación o incluso la concentración. Consulte la guía para el desarrollo de métodos en la página 5 si desea obtener más información.

Filtros de unión de baja proteína Captiva

Independientemente de la preparación de muestra que se esté realizando, siempre es buena idea filtrar la muestra con un filtro de unión de baja proteína.

Los filtros de PES Agilent proporcionan uniones de baja proteína superiores y consistentes para la filtración relacionada con proteínas. Las membranas del filtro de PES son una opción mejor que las membranas de PVDF para la mayoría de análisis de LC. La PES de Agilent tiene una compatibilidad similar a los filtros de PVDF para disolventes de LC comunes; también resulta superior en términos de unión de proteínas y limpieza. Si desea obtener más información, visite www.agilent.com/chem/filtration.



Filtros de PES Captiva

Diámetro (mm)	Tamaño de poro (µm)	Certificación	Carcasa	Referencia
4	0,45	LC	Polipropileno	5190-5095
4	0,2	LC/MS	Polipropileno	5190-5094
15	0,2	LC/MS	Polipropileno	5190-5096
15	0,45	LC	Polipropileno	5190-5097
25	0,2	LC/MS	Polipropileno	5190-5098
25	0,45	LC	Polipropileno	5190-5099

Selección de columnas

Tamaño de columna

Las columnas para SEC habitualmente son mucho más grandes que las utilizadas para otros tipos de cromatografía y funcionan con velocidades de flujo relativamente bajas o velocidades lineales bajas. Las dimensiones estándar de las columnas para SEC son 7,8 x 300 mm, trabajan a 1,0 ml/min; en comparación, las columnas de fase reversa son normalmente de 2,1 o 4,6 x 150 mm y trabajan a velocidades lineales 2-3 veces superiores. Esto no es un efecto del tamaño de columna, sino que se debe al mecanismo de la SEC.

Con la SEC, no se produce el incremento en la concentración de las muestras que suele verse con otras técnicas cromatográficas debido a la absorción o a la interacción con la fase estacionaria. En consecuencia, las muestras analizadas mediante SEC se inyectan en volúmenes mucho mayores (5-20 µl), con frecuencia a altas concentraciones (1-4 mg/ml). Los tiempos de análisis son normalmente de 10-12 minutos por columna (para una columna convencional de 7,8 x 300 mm a 1,0 ml/min) y los picos son normalmente anchos, por lo que no se requieren elevadas velocidades de adquisición de datos. Para la comparación o cuantificación de agregación de proteínas, se utiliza software de HPLC. Para obtener información sobre la distribución de pesos moleculares en polímeros polidispersados, se usa software específico para SEC.

Conocer las propiedades de la columna elegida mediante el uso de una calibración periódica resulta de enorme importancia. Al incluir una molécula lo suficientemente grande (que sea demasiado grande como para penetrar en los poros) debería poder determinarse el límite de exclusión para la columna. De manera similar, el uso de una molécula muy pequeña (que sea suficientemente pequeña como para penetrar en toda la estructura porosa) permite determinar el límite de penetración total de la columna. Posteriormente es necesario asegurarse de que entre estos dos límites tiene lugar la separación que se intenta conseguir. Si el cromatograma de la muestra incluye material excluido o un material que se eluye en el punto de penetración total, es posible que haya que utilizar una columna con un tamaño del poro diferente para el análisis.

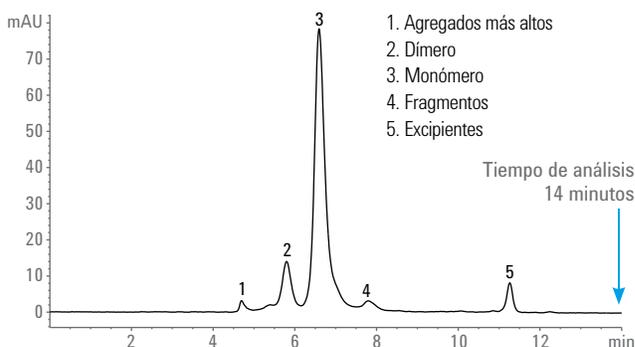


Aumento de la velocidad del análisis con columnas más cortas

Normalmente es preciso utilizar columnas de 300 mm de longitud para obtener el grado de resolución que se necesita en los análisis. No obstante, con el fin de mejorar la velocidad de la separación, se puede considerar el uso de columnas más cortas. La separación puede conseguirse en la mitad del tiempo si se utiliza una columna de 150 mm. No obstante, la resolución empeorará. Si es necesaria una alta productividad, a menudo pueden utilizarse columnas más cortas con velocidades de flujo mayores sin riesgo de alcanzarse los límites de retropresión, con lo que puede conseguirse una reducción adicional en el tiempo de análisis. Consulte la Figura 5.

Columna: AdvanceBio SEC, 7,8 x 300 mm

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min
Muestra: IgG policlonal



Columna: AdvanceBio SEC, 7,8 x 150 mm

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min
Muestra: IgG policlonal

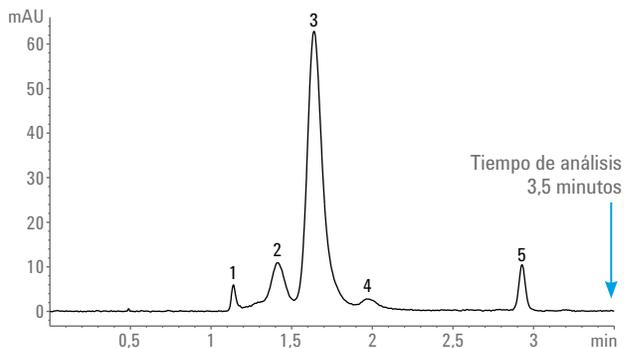


Figura 5. Comparación de análisis utilizando columnas de 300 mm y de 150 mm para demostrar el ahorro de tiempo.

Selección de fases de la columna

Elija una columna de exclusión por tamaño adecuada para su tipo de molécula y tamaño una vez determinada la solubilidad de la muestra y la fase móvil (agua, tampón o disolvente orgánico) de la separación. Las columnas empaquetadas con absorbentes poliméricos se suelen usar para moléculas poliméricas con una distribución amplia de pesos moleculares, como la heparina, el almidón o la celulosa. Las proteínas y moléculas con peso molecular moderado son más idóneas para las fases estacionarias de sílice (Tabla 1).

Es importante recordar que las proteínas contienen numerosos aminoácidos con distinta funcionalidad de la cadena lateral: ácida, básica, hidrofóbica y neutra/hidrofílica. Para impedir que tengan lugar interacciones con las columnas de sílice, son necesarios tampones en la fase móvil.

Agilent sugiere el rango adecuado de pesos moleculares para sus columnas; idealmente, la columna que elija deberá estar en el centro del rango operativo.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Aplicación	Columnas Agilent	Notas
Proteínas		
SEC-UV/DAD, o análisis por LS de anticuerpos monoclonales, proteínas y péptidos	Agilent AdvanceBio SEC	Lo más reciente en cuanto a tecnología innovadora que proporciona resolución para eliminar la necesidad de repetir análisis de muestras y velocidad para reducir el tiempo de análisis, mejorando así la productividad del laboratorio
Análisis SEC-MS de anticuerpos monoclonales, proteínas y péptidos	Agilent Bio SEC-3	Proporciona líneas de base estables con detección MS
Biomoléculas grandes y muestras con componentes de distintos pesos moleculares	Agilent Bio SEC-5	Más opciones de tamaño del poro (100 Å, 150 Å, 300 Å, 500 Å, 1.000 Å y 2.000 Å) para abarcar una gama de analitos mayor
Proteínas globulares, anticuerpos	ProSEC 300S	Opción de columna sencilla para el análisis de proteínas en condiciones de alto contenido de sal
Proteínas, proteínas globulares	ZORBAX GF-250/450	Productos antiguos que deben utilizarse si los protocolos aún precisan el uso de la nomenclatura USP L35
Analitos hidrosolubles		
Polímeros y oligómeros, oligosacáridos, PEG, lignosulfonatos de bajo PM	2 o 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH 8 µm ✓ PL aquagel-OH 20,5 µm ✓ PL aquagel-OH MIXED-M 8 µm	La serie analítica PL aquagel-OH cuenta con un rango de pH de 2-10, compatibilidad con disolventes orgánicos (hasta 50 % de metanol), estabilidad mecánica hasta 140 bar (2.030 psi) y presiones operativas de columna bajas
Biopolímeros, polisacáridos, derivados de celulosa poldispersos	2 o 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8 µm ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8 µm	
Polímeros, ácidos hialurónicos, almidones y resinas de muy alto PM	PL aquagel-OH 60/50/40 15 µm en serie	

Tabla 1: Opciones para la selección de columna según la aplicación y el tamaño de muestra.



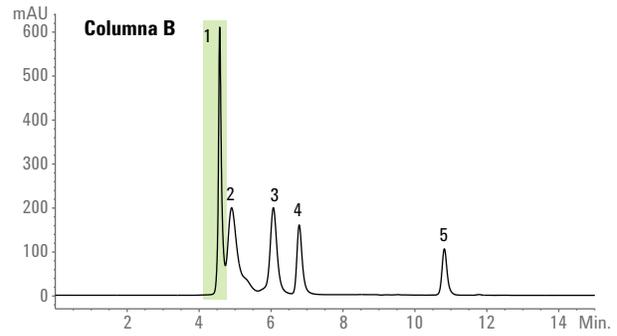
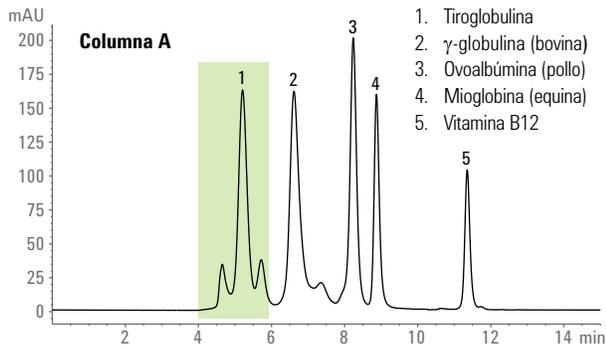
Columnas Agilent Bio SEC para separaciones biomoleculares, incluidas la agregación de proteínas y columnas Agilent GPC para el análisis de polímeros naturales, incluida la determinación del peso molecular de polisacáridos.

Tamaño de poro

Las proteínas son relativamente pequeñas y compactas en comparación con otros biopolímeros, por lo que un tamaño del poro de 300 Å es una buena opción para una selección inicial de columna. En la Figura 6 se compara la resolución de un estándar de referencia con mezcla de cinco proteínas y una muestra de IgG

policlonal en columnas con distinto tamaño de poro; se aprecia con claridad el efecto que tiene el tamaño del poro sobre la resolución. Con poros de 300 Å, se resuelven la tiroglobulina y el dímero de IgG (los más grandes); sin embargo, cuando se reduce el tamaño de poro, las proteínas más grandes se excluyen y no se produce la separación.

Mezcla de estándares de filtración con gel BioRad



Columna A: AdvanceBio SEC 300 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 μ m (ref. PL1580-5301)

Columna B: AdvanceBio SEC 130 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 μ m (ref. PL1580-5350)

Instrumento: Sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity

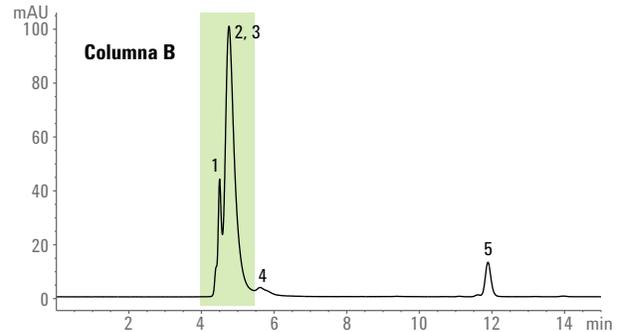
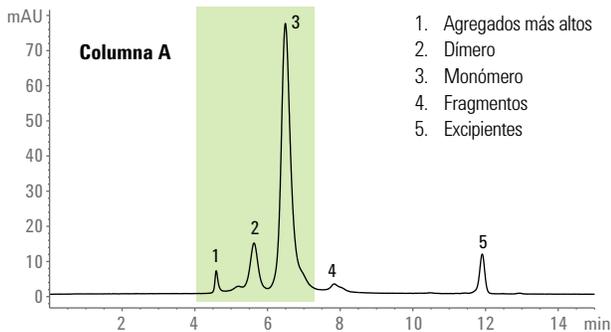
Fase móvil: Tampón fosfato 150 mM, pH 7,0

Velocidad de flujo: 0,35 ml/min

Detector: UV, 220 nm

Muestra: Mezcla de estándares de filtración con gel BioRad

Separación de IgG policlonaes



Columna A: AdvanceBio SEC 300 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 μ m (ref. PL1580-5301)

Columna B: AdvanceBio SEC 130 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 μ m (ref. PL1580-5350)

Instrumento: Sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity

Fase móvil: Tampón fosfato 150 mM, pH 7,0

Velocidad de flujo: 0,35 ml/min

Detector: UV, 220 nm

Muestra: IgG policlonaal

Figura 6. Comparación de tamaños de poro y resolución de estándares de filtración en gel BioRad e IgG policlonaes. El área destacada en verde muestra la diferencia de resolución entre los dos tamaños de poro. Se necesita el tamaño de poro mayor para el análisis de las proteínas mayores.

Evaluación de los rangos de permeabilidad de SEC

Con las proteínas, es importante reconocer que el mecanismo de SEC funciona separando solutos en función de su tamaño en disolución y no de su peso molecular. Esto se hace patente al comparar el gráfico de calibración de las proteínas y péptidos con las curvas de pululano/polisacáridos y PEG/PEO, como se muestra en la Figura 7. Los calibrantes pululano/polisacáridos y PEG/PEO proporcionaron curvas de calibración bastante similares, pero la curva de proteína/péptido aparece desplazada y tiene una forma diferente.

Las proteínas están compuestas por cadenas complejas de polipéptidos que forman estructuras tridimensionales. Estas estructuras se ven afectadas por el entorno al que se ven expuestas, como el pH o la fuerza iónica. Las cadenas adoptarán la forma más idónea para ellos, por lo que su estructura y tamaño pueden variar.

Para demostrar que el tiempo de elución se debe al tamaño y no al peso molecular, considere los tiempos de retención de calibrantes con un peso molecular de aproximadamente 50.000, en los que existe una diferencia significativa (Figura 8). El PEG eluye justo después de 7 minutos, el polisacárido eluye justo por encima de los 7,5 minutos, pero la proteína eluye aproximadamente a los 9,5 minutos.

Esto demuestra claramente que el mecanismo de separación SEC se basa en el tamaño real y no en el peso molecular. En consecuencia, al utilizar curvas de calibración es importante especificar qué calibrantes se han usado. Por ejemplo, se puede indicar que la muestra de interés tiene un peso molecular equivalente de pululano/polisacárido de 50.000. Consulte la página 16 para ver detectores avanzados que permiten superar este efecto relativo.

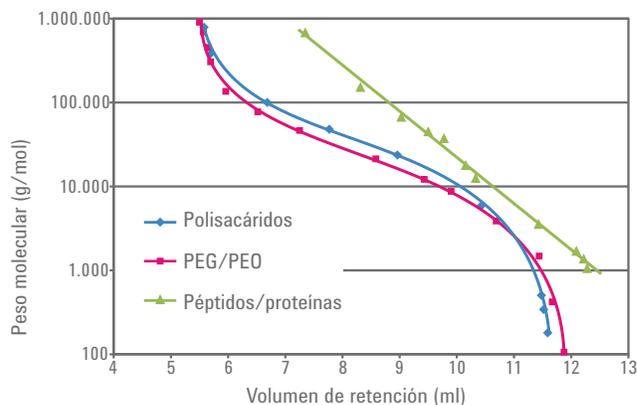


Figura 7. Comparación de gráficos de calibración generados para tres tipos de calibrante.

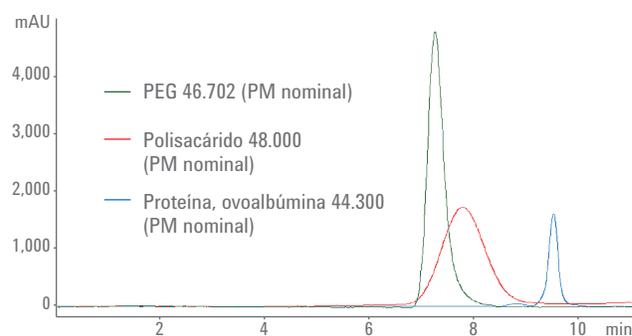


Figura 8. Superposición de cromatogramas obtenidos para calibrantes de peso molecular similar.



Patrón de calibración SEC AdvanceBio 130 Å

(ref. 5190-9416, patrón de calibración SEC AdvanceBio 130 Å, vial de 2 ml)

Mezcla de proteínas que consta de 5 proteínas cuidadosamente seleccionadas (ovoalbúmina, mioglobina, aprotinina, neurotensina, angiotensina II) diseñada para calibrar las columnas de exclusión por tamaño AdvanceBio 130 Å de Agilent. Este patrón se puede usar periódicamente para calibrar la columna y asegurar el rendimiento ideal del sistema en diversas aplicaciones que implican la purificación y el análisis de proteínas.

Patrón de calibración SEC AdvanceBio 300 Å

(ref. 5190-9417, patrón de calibración SEC AdvanceBio 300 Å, vial de 2 ml)

Mezcla de proteínas que consta de 5 proteínas cuidadosamente seleccionadas (tiroglobulina, γ -Globulina, ovoalbúmina, mioglobina, angiotensina II) diseñada para calibrar las columnas de exclusión por tamaño AdvanceBio 300 Å de Agilent. Este patrón se puede usar periódicamente para calibrar la columna y asegurar el rendimiento ideal del sistema en diversas aplicaciones que implican la purificación y el análisis de proteínas.



Tamaño de partícula

El tamaño de la partícula también es una consideración importante para la selección de columna. Los tamaños de partícula menores proporcionan una separación más eficiente, pero con la contrapartida de degradar (cortar/deformar) la proteína. En la Figura 9 se muestra una comparación entre las columnas Agilent Bio SEC-3 y 5 µm Bio SEC-5. Existe un mayor riesgo de mayor

retropresión y de que se bloqueen las columnas si las muestras y los eluyentes no se preparan cuidadosamente. Se recomienda la filtración para retirar materia insoluble y restos. El uso de una precolumna o un filtro en línea también puede prolongar la vida útil de la columna.

Comparación entre Agilent Bio SEC-3 y Agilent Bio SEC-5

Análisis de anticuerpos monoclonales

Columna: Bio SEC-3, 300 Å
7,8 × 300 mm, 3 µm
(ref. 5190-2511)

Columna: Bio SEC-5, 300 Å
7,8 × 300 mm, 5 µm
(ref. 5190-2526)

Instrumento: Sistema LC cuaternario bioinerte
Agilent 1260 Infinity

Fase móvil: fosfato sódico 150 mM, pH 7

Velocidad de flujo: 1 ml/min

Detector: UV, 220 nm

Muestra: Anticuerpo monoclonal humanizado

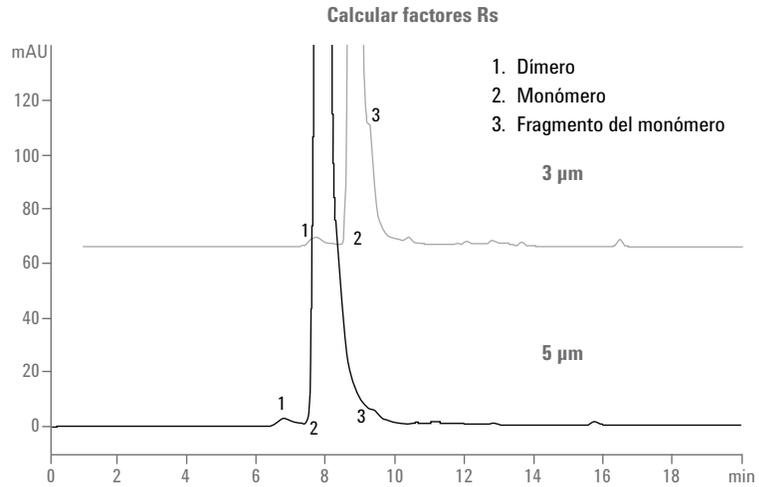


Figura 9. Comparación entre las columnas Agilent Bio SEC-3 y Agilent Bio SEC-5. La columna de 3 µm proporciona una mejor separación.

Diámetro de la columna

El diámetro de la columna también puede tener su importancia, en función de la cantidad de muestra. Si únicamente están disponibles cantidades limitadas de material, resultan de utilidad las columnas de 4,6 mm de d.i. (trabajan a 0,35 ml/min). No obstante, es importante minimizar el volumen del sistema al utilizar las columnas de menor d.i. con el fin de evitar una dispersión excesiva y la pérdida de resolución.

La SEC se considera una técnica no desnaturalizante si se utilizan eluyentes acuosos, por lo que resulta extremadamente útil para el fraccionamiento de muestras complejas o el aislamiento de un componente de la muestra para su posterior análisis. Las columnas de diámetro superior, como las de 21,2 mm que se encuentran en la gama de productos Agilent SEC-3 y SEC-5, consiguen que las separaciones preparativas en laboratorio puedan llevarse a cabo mediante el uso de sistemas HPLC analíticos.



Columnas SEC Agilent AdvanceBio 7,8 x 300 mm y 4,6 x 300 mm

Parámetros del método

Flujo

Para algunas aplicaciones, la velocidad de análisis resulta esencial. Se puede usar una columna más corta para reducir el tiempo de análisis (150 mm en lugar de la convencional de 300 mm) o se pueden aumentar las velocidades de flujo, o ambas opciones. Sin embargo, esto puede afectar negativamente a la resolución, pues la SEC se basa en la difusión hacia el interior y el exterior de un poro para crear rutas de diferente longitud a través de la columna. No obstante, como se muestra en la Figura 10, es posible obtener una resolución suficiente como para cuantificar un dímero y un monómero de IgG en menos de 4 minutos si se utiliza una columna de 150 a una velocidad de flujo de 2 ml/min.

Columna:	AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 x 150 mm, 2,7 µm (ref. PL1180-3301)
Eluyente:	Tampón fosfato 150 mM, pH 7,0
Velocidad de flujo:	0,5, 1,0, 1,5 ml/min (52, 102, 152 bar)
Detector:	UV, 220 nm
Inyección:	5 µl
Muestra:	IgG (2 mg/ml)

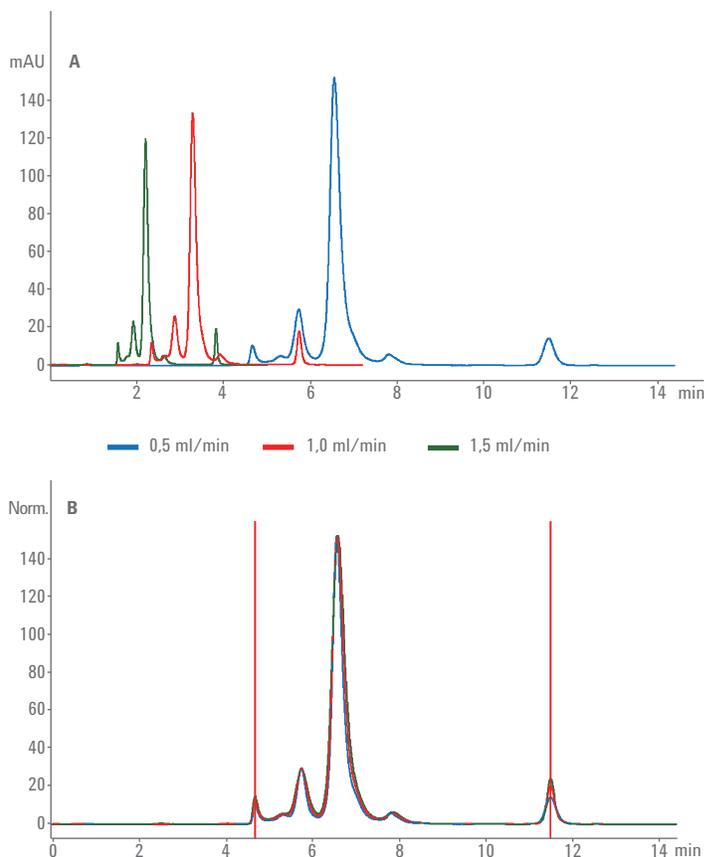


Figura 10. Si se aumenta la velocidad de flujo, se reduce el tiempo de análisis de 12 a 4 minutos (A). Una vez normalizados y superpuestos los tiempos de retención (B), se hace evidente que los tiempos de retención son homogéneos y existe una mínima reducción en la resolución.

Resolución de problemas del método SEC

Problema	Fuente	Solución
Recuperación más baja de lo esperada o ensanchamiento de los picos	Analitos hidrófobos	Añada una pequeña cantidad (10-20 %) de modificador orgánico (acetonitrilo o metanol) a la fase móvil
Aparecen picos que no deberían, a partir del peso molecular, o cola de pico	Interacciones iónicas o proteínas básicas	Aumente la fuerza iónica-concentración salina a intervalos de 50-100 mM; añada al tampón fosfato
Formas de picos deficientes	Adsorción no específica	Aumente la concentración salina o pruebe un sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity
Escasa retención/resolución de los analitos	Tamaño del poro insuficiente para el tamaño de la molécula	Compruebe el tamaño del poro; consulte la página 11 para obtener más información

Selección de la fase móvil

Las interacciones secundarias pueden causar dificultades

Para evitar las indeseables interacciones secundarias, podría ser necesario realizar una optimización del método. Tales interacciones podrían hacer que un analito se eluya más tarde de lo esperado y hacer que parezca de un peso molecular más bajo. Unos ligeros ajustes en la composición de la fase móvil (pH, fuerza iónica o

modificadores orgánicos) pueden ayudar a superar estas dificultades (Figura 11). También podría ser necesario refinar la elección de tamaño del poro, combinar columnas en serie, reducir la velocidad de flujo del análisis o cambiar la temperatura para conseguir la separación deseada.

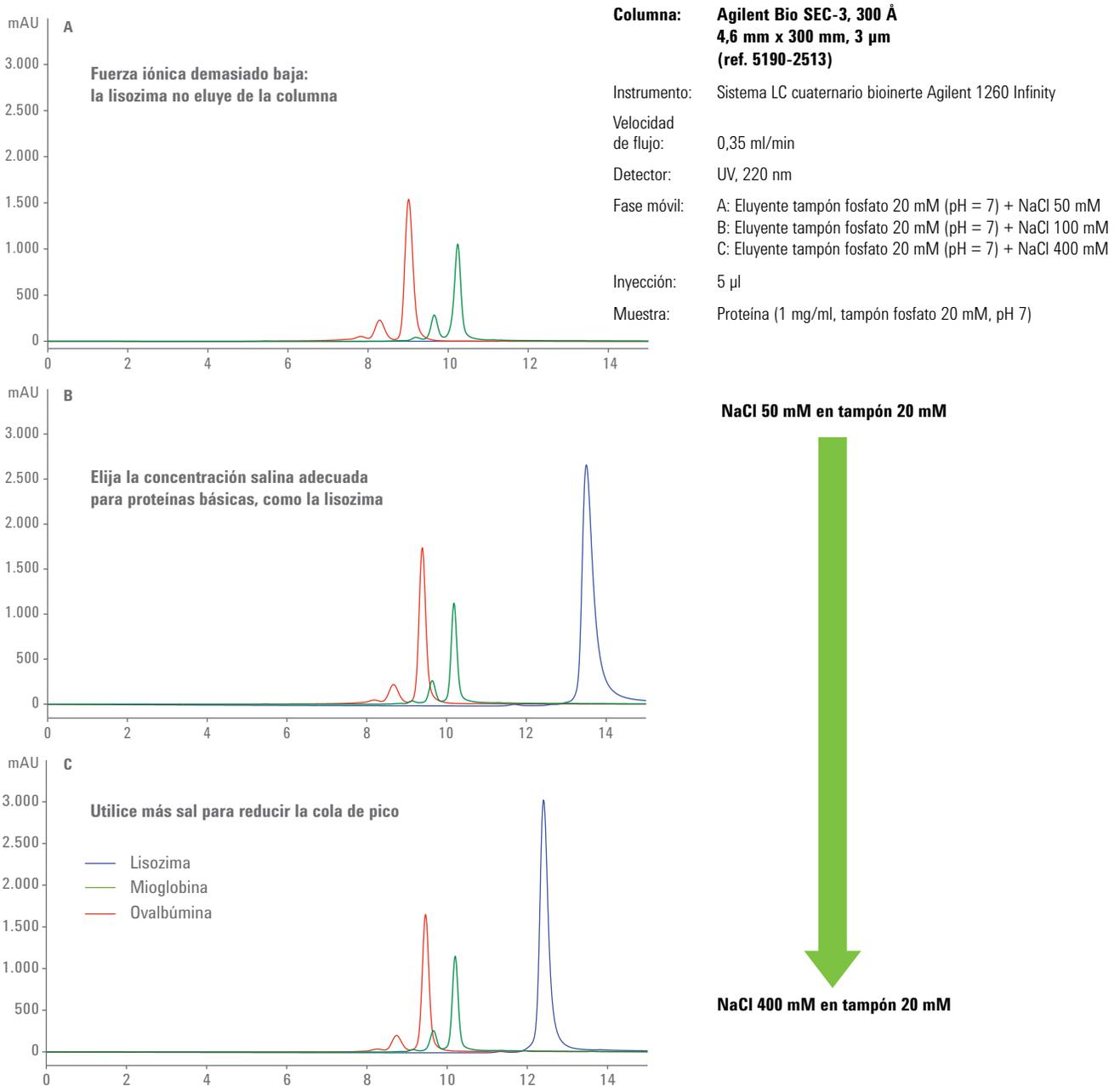


Figura 11. Efecto de una fuerza iónica excesiva o escasa sobre la consecución de la separación deseada.

Calibración

Una vez elegida una columna, será necesario construir una calibración con patrones de peso molecular conocido. Cada vez que cambie la columna o realice modificaciones a la fase móvil, deberá repetir la calibración. La curva de calibración se obtiene representando el tiempo de retención frente al peso molecular (Figura 12). Es particularmente importante seleccionar patrones

adecuados a la molécula de interés. Para la separación de proteínas, utilice patrones con el peso molecular de las proteína. Deben usarse patrones con el peso molecular del pululano para la separación de polisacáridos.

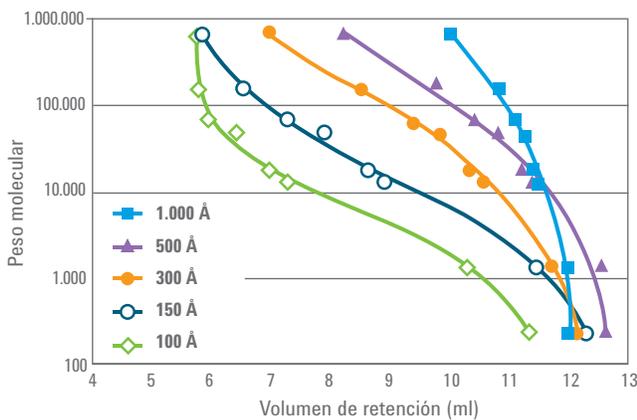
Columna: Agilent Bio SEC-5,
7,8 × 300 mm, 5 µm
(ref. 5190-2521)

Instrumento: Sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity

Fase móvil: 150 mM de fosfato sódico, pH 7.0

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min

Detector: UV



Proteínas	PM	Volumen de retención				
		1.000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
Tiroglobulina	670.000	10,07	8,23	7,03	5,82	5,77
γ-globulina	158.000	10,88	9,80	8,57	6,55	5,79
BSA	67.000	11,13	10,44	9,44	7,29	6,00
Ovalbúmina	45.000	11,28	10,83	9,89	7,90	6,40
Mioglobina	17.000	11,44	11,28	10,42	8,66	7,05
Ribonucleasa A	12.700	11,52	11,41	10,58	8,93	7,32
Vitamina B12	1.350	12,00	12,59	11,78	11,49	10,30
Uracilo	112	12,08	12,68	12,21	12,13	11,41

Figura 12. Curvas de calibración obtenidas representando el tiempo de retención frente al peso molecular.

Idealmente, los patrones deben disolverse en la fase móvil; es necesario asegurarse de que la muestra se haya disuelto en su totalidad. Si la disolución aparece turbia, será necesario tomar otras medidas. Deberá realizarse una centrifugación o filtración para eliminar la materia insoluble antes de la inyección. No obstante,

podría ser necesario buscar unas condiciones alternativas para la fase móvil que mejoren la solubilidad de la muestra, puesto que podría haber procesos físicos que alteren la composición de pesos moleculares.



Técnicas de detección avanzadas

Entre otras consideraciones en SEC se encuentra la elección del detector. En la separación de proteínas suele utilizarse un detector UV o de diodo array (DAD).

Los mejores resultados, es decir, la mayor sensibilidad, para péptidos y proteínas se obtiene normalmente a 220 nm.

No obstante, algunas disoluciones tampón o modificadores orgánicos pueden presentar excesiva absorbancia de fondo a longitudes de onda bajas, en cuyo caso podría ser necesario emplear 254 nm o 280 nm. Un inconveniente de la detección UV es que algunas moléculas carecen de cromóforo; sin embargo, dado que los analitos eluyen isocráticamente, se puede utilizar

en su lugar un detector de índice de refracción (IR).

La adición de la avanzada detección de dispersión de luz (Light Scattering - LS -) aumenta significativamente el rendimiento de la SEC. La dispersión de luz estática determina masas molares exactas, independientemente de la calibración de la columna y de las interacciones indeseadas, y se complementa con la dispersión de luz dinámica para estudiar el tamaño molecular. La dispersión de luz ha aumentado la sensibilidad para las fracciones grandes, permitiendo el descubrimiento de agregación en cantidades muy inferiores (Figura 13). Resulta importante seleccionar un detector con bajo volumen muerto para garantizar la obtención de esta información adicional sin sacrificar el rendimiento cromatográfico.

Columna: Agilent AdvanceBio 300 Å,
7,8 x 300 mm, 2,7 µm

Instrumento: Sistema LC cuaternario bioinerte
Agilent 1260 Infinity con el multidetector
Agilent 1260 Infinity GPC/SEC

Fase móvil: fosfato sódico 150 mM, pH 7,0

Velocidad de flujo: 0,8 ml/min

Temperatura: 30 °C

Detector: UV, 280 nm + RI + LS 90°

Inyección: 5 µl

Muestra: anticuerpo monoclonal degradado

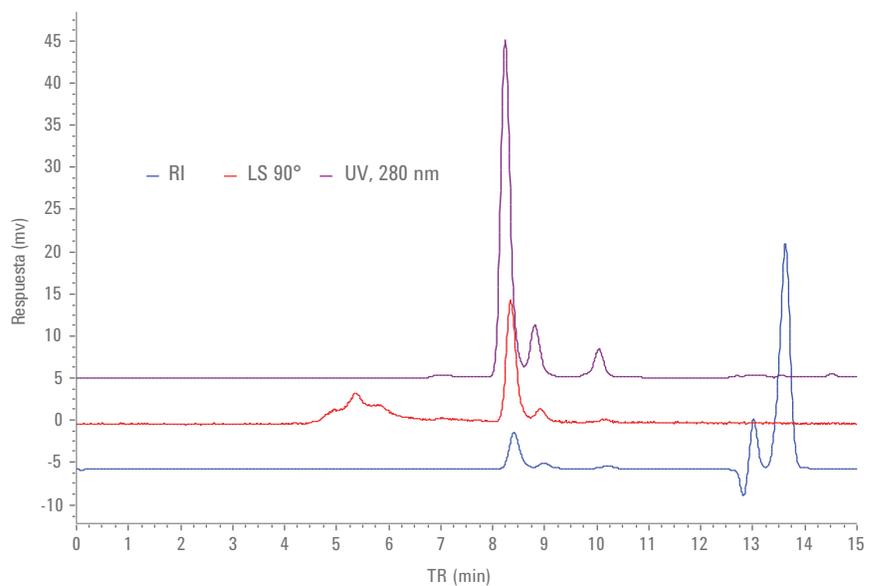
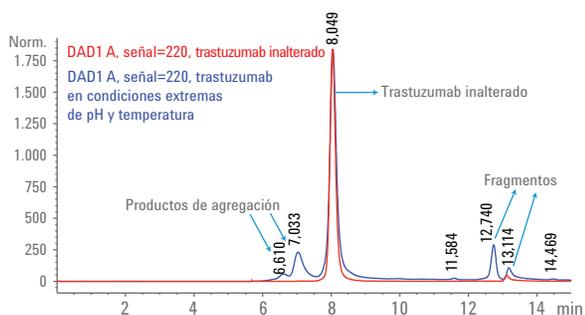


Figura 13: Resultado de utilizar distintos detectores en una separación de proteínas.

Proteínas conjugadas

Las proteínas terapéuticas están sometidas a fenómenos de agregación y degradación durante todas las etapas de su desarrollo, como la expresión, el plegamiento, los pasos de procesamiento posteriores, la formulación, la esterilización y la conservación. Aunque los agregados/degradados estén presentes en concentraciones extremadamente bajas, podrían suponer un enorme impacto sobre la cualidad biológica, originando pérdida de actividad, reducción de la solubilidad y aumento de la inmunogenicidad. La cromatografía de exclusión por tamaño es el método estándar usado para caracterizar la agregación de proteínas, y también es obligatoria para la conformidad y aprobación normativa.

Con el fin de mejorar la prestación, aumentar la vida media y aumentar la potencia, las proteínas, incluidos los anticuerpos monoclonales, pueden estar conjugadas. Los polímeros hidrosolubles, como el polietilenglicol, se conjugan con la proteína para mejorar la actividad farmacológica, aumentar su vida media en el flujo sanguíneo y reducir la inmunogenicidad. Más recientemente, ha aparecido interés en los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), en los que los anticuerpos monoclonales se conjugan con un agente citotóxico para la administración dirigida de fármacos y aumentan la eficacia del tratamiento. Después de la conjugación, se requieren los mismos estudios de agregación, pues la modificación de las características de la muestra puede suponer un mayor desafío para conseguir una separación SEC. Se requieren columnas con muy pocas uniones inespecíficas, como AdvanceBio SEC, para el análisis tanto del anticuerpo como del conjugado anticuerpo-fármaco utilizando fases móviles acuosas. Consulte la Figura 14.

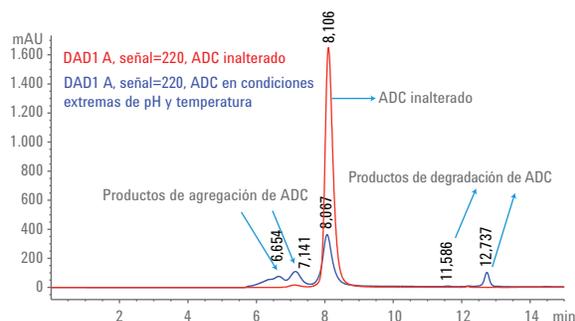


Columna: AdvanceBio SEC 300 Å
7,8 x 300 mm, 2,7 µm

Instrumento: Sistema LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity

Fase móvil: PBS, fosfato sódico 50 mM con cloruro sódico 150 mM, pH 7,4

Temperatura de TCC: Ambiente



Volumen de inyección: 10 µl

Velocidad de flujo: 0,8 ml/min

Detector: UV, 220 nm

Figura 14: Se usó la misma fase móvil acuosa tanto para el anticuerpo monoclonal como para el conjugado anticuerpo-fármaco, más hidrofóbico.

Recorra el camino que le permite obtener resultados de éxito

www.agilent.com/chem/navigator

Con una enorme variedad de biocolumnas y columnas para moléculas pequeñas, las columnas de LC de Agilent y la preparación de muestras NAVIGATOR le ayudarán a elegir la columna adecuada para su aplicación.

NAVIGATOR presenta cuatro opciones de búsqueda sencillas:

- Por n.º de referencia, con remisión a columnas LC y productos de preparación de muestras para encontrar el mejor repuesto de Agilent



- Por compuesto, usando la lista desplegable
- Por método USP
- Por columna, con recomendaciones basadas en el método

Preparación de muestras

- Idealmente, las muestras deben disolverse en la fase móvil
- Si la muestra aparece turbia, podría ser necesario modificar las condiciones de la fase móvil
- Se puede utilizar la filtración o la centrifugación para clarificar las muestras; sin embargo, estos procesos podrían alterar la composición del peso molecular de la muestra
- Para disolver una muestra, en ocasiones se somete a un suave calentamiento, mezcla en vórtex o sonicación; estas técnicas deben aplicarse con precaución, pues podrían modificar la composición de pesos moleculares
- Debe tenerse cuidado para asegurarse de que la muestra no cambie durante su almacenamiento
- Las muestras deberán prepararse frescas y analizarse lo antes posible
- En las disoluciones tampón puede desarrollarse rápidamente crecimiento bacteriano
- Las muestras preparadas en elevadas concentraciones también pueden cambiar con el tiempo, produciendo agregación o incluso precipitación



Selección de columnas

- Para asegurar la integridad de la muestra, la SEC se lleva a cabo lentamente en columnas largas
- Las longitudes de columna suelen ser de 250 o 300 mm
- La velocidad de flujo normal es de 1,0 ml/min en columnas de 7,5 o 7,8 mm de d.i. y de 0,35 ml/min en columnas de 4,6 mm de d.i.
- Con el fin de aumentar la resolución en aplicaciones de biopolímeros, suelen utilizarse columnas en serie
- Se utilizan tamaños de partícula menores para aumentar la resolución en aplicaciones de proteínas
- Las separaciones efectuadas en columnas de 150 mm con tamaños de partículas inferiores pueden reducir el tiempo del análisis

Selección de fases de la columna

- No debería haber interacciones inespecíficas entre los analitos y los medios de la columna
- Se utilizan absorbentes de sílice para analizar péptidos y proteínas
- Se utilizan absorbentes poliméricos para analizar biopolímeros



Parámetros de la columna

- **Tamaño del poro:** depende del rango de pesos moleculares de la muestra para evitar la exclusión de los componentes de la muestra y maximizar el volumen en la región de separación requerida
- **Tamaño de la partícula:** use partículas más pequeñas para aumentar la resolución (aunque también aumentará la retropresión)
- **Longitud de la columna:** equilibrio entre resolución y tiempo de análisis
- **Identificación de columna:** use columnas más pequeñas para reducir el consumo de disolvente y el volumen de inyección

Fase móvil

- La fase móvil debe contener tampón/sal para superar las interacciones iónicas, pero no en exceso para no provocar interacciones hidrofóbicas
- No altere el analito para evitar degradación/agregación, etc.
- Prepare fase móvil fresca y úsela con prontitud, pues el crecimiento bacteriano es rápido en tampón diluido almacenado a temperatura ambiente
- La vida útil del tampón es de menos de 7 días salvo que se refrigere
- Filtre antes de usar para eliminar partículas en agua (menos probable) o en sales de tampón (más probable)
- Los tampones fosfato de pH alto (en particular a temperatura elevada) pueden reducir significativamente la vida útil de la columna si se usan columnas de sílice

Para obtener más información sobre las biocolumnas Agilent para SEC, visite www.agilent.com/chem/bioHPLC

Nos asociamos con usted para obtener unos resultados excelentes

Los retos cada vez más difíciles requieren mejores respuestas. Nuestras soluciones permiten a los científicos biofarmacéuticos innovar en la investigación de enfermedades, acelerar el descubrimiento de fármacos y tener una mayor seguridad durante todo el desarrollo y fabricación.

Descubra más acerca de las soluciones Agilent para biofarmacia

[agilent.com/chem/togetherbiopharma](http://www.agilent.com/chem/togetherbiopharma)

Más información

www.agilent.com/chem/BioHPLC

Encuentre un centro de atención al cliente de Agilent en su país:

www.agilent.com/chem/contactus

España

901 11 68 90

customercare_spain@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia-Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com

Solo para uso en investigación. La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso. Agilent Technologies no se responsabiliza de los errores contenidos en este documento ni de los daños incidentales o emergentes asociados al suministro, la interpretación o el uso de este material.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Impreso en EE. UU., 1 de noviembre de 2015
5991-3651ES



Agilent Technologies