

Guia Agilent para

CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHOS PARA ANÁLISE DE BIOMOLÉCULAS

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

UM GUIA PARA UMA SEC BEM-SUCEDIDA

A separação cromatográfica de biomoléculas com base no tamanho em solução é conhecida como cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC). Diferentemente de outros modos de cromatografia, ela depende da ausência de qualquer interação entre o analito e a fase estacionária integrada na coluna. Isso oferece uma solução ideal para a separação e análise de proteínas intactas de contaminantes que podem incluir agregados, excipientes, restos de células e outras impurezas que surgem da degradação. Portanto, a SEC é amplamente usada tanto no desenvolvimento quanto na fabricação para caracterização de moléculas bioterapêuticas.

Nesse guia, discutimos as separações da SEC, o efeito do tamanho do soluto e do peso molecular, opções de seleção da coluna, importantes considerações de fase móvel, regras gerais para uso da SEC e mais.



A SEPARAÇÃO É DIRETA E DESCOMPLICADA

Com a SEC, as moléculas são separadas da maior à menor em proporção ao seu tamanho molecular em solução. As moléculas muito grandes são excluídas do leito empacotado e eluem primeiro, no volume morto. As moléculas médias poderão penetrar os poros em vários graus dependendo de seu tamanho (Figura 1), e as moléculas menores difundindo-se mais dentro da estrutura dos poros eluem por último.

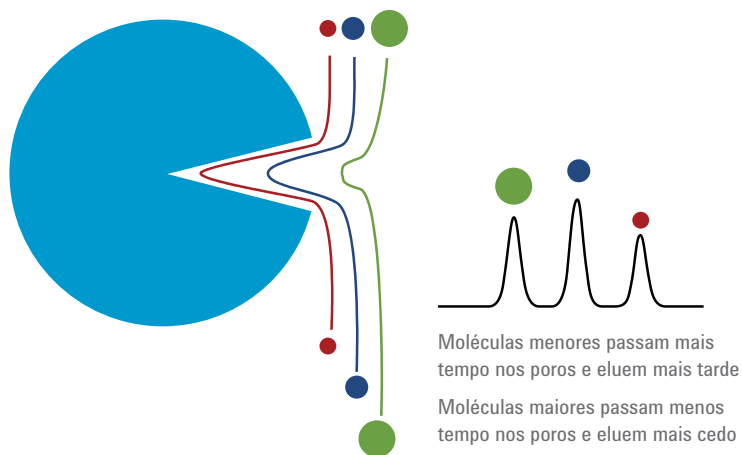


Figura 1: moléculas permeiam os poros da fase estacionária para extensões diferentes dependendo do tamanho.

A cromatografia por exclusão de tamanhos é adequada para separar e quantificar misturas de proteínas e é, portanto, uma técnica valiosa para o controle de qualidade na fabricação de proteína recombinante. Isso inclui a medição de agregados (dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc.) ou a separação de impurezas e excipientes com baixo peso molecular de proteínas com peso molecular maior (Figura 2).

Compreender e controlar a agregação em proteínas terapêuticas é essencial, pois afeta a eficácia e a vida útil e também pode resultar em uma resposta imunogênica potencialmente séria. Regulações como ICH(Q6B) definem claramente que os agregados devem ser resolvidos a partir do produto desejado e quantificado.

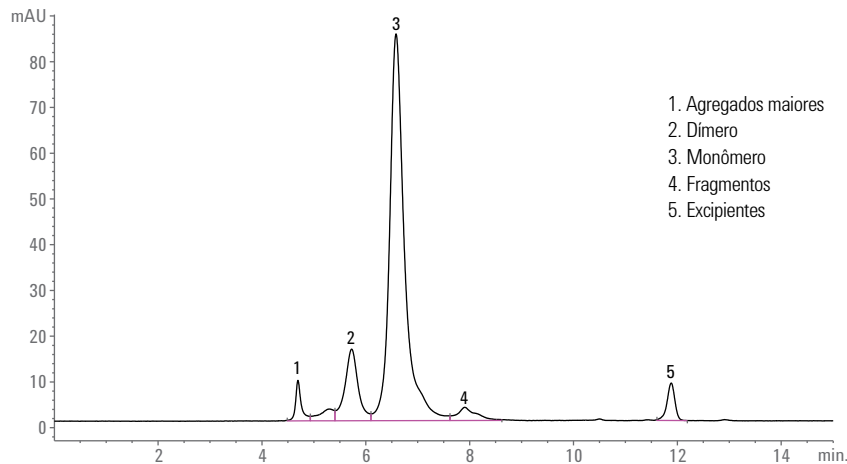


Figura 2: separação de excipientes e agregados de IgG.

Separação de dímeros e monômeros IgG intactos

Coluna: Agilent AdvanceBio SEC, 300Å
7,8 x 300 mm, 2,7 µm
(p/n PL1180-5301)

Instrumento: sistema LC quaternário Agilent 1260
Infinity Bio-inert

Taxa de fluxo: 1,0 mL/min

Temperatura: ambiente

Detector: UV, 220 nm

Injeção: 5 µL

Amostra: IgG policlonal

Conc. de amostra: tampão de fosfato de sódio de 50 mM, pH 7,0

A ordem de eluição segue tipicamente o peso molecular. As moléculas com o maior peso molecular eluem primeiro. No entanto, o mecanismo verdadeiro da SEC é baseado no tamanho em solução. A maioria das proteínas é compacta, mas algumas moléculas de proteína são cilíndricas, então podem eluir mais cedo do que o esperado devido a seu maior raio hidrodinâmico em solução. (Figura 3). Além disso, fases móveis diferentes podem afetar a ordem de eluição devido às alterações no tamanho em solução (raio hidrodinâmico ou raio de giração).

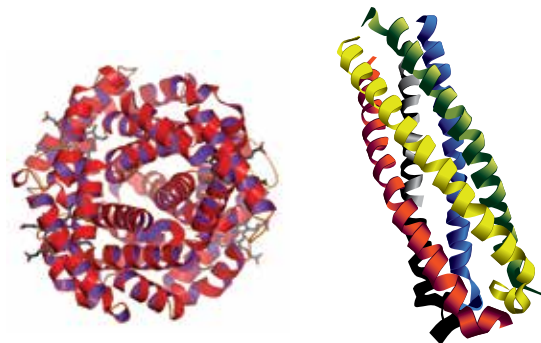


Figura 3: comparação de proteína globular compacta em relação à proteína cilíndrica.

Guia de desenvolvimento de métodos de SEC-UV/DAD

Escolha a coluna e as condições iniciais para a separação por tamanho de biomoléculas e análises de agregação, peptídeos, polipeptídeos e proteínas

Peptídeos, polipeptídeos, proteínas, mAbs
MW >0,1-1.250 kDa

Peptídeos, polipeptídeos, proteínas, mAbs
MW >0,1-10.000 kDa

Selecione a coluna com base na faixa de peso molecular e medida de poro

AdvanceBio SEC (2,7 µm)

Medida de poro	Faixa de PM (kDa)
130Å	0,1-100
300Å	5-1.250

Agilent Bio SEC-5 (5 µm)

Medida de poro	Faixa de PM (kDa)
100Å	0,1-100
150Å	0,5-150
300Å	5-1.250
500Å	15-5.000
1.000Å	50-7.500
2.000Å	>10.000

Condições iniciais de separação recomendadas

Coluna: AdvanceBio SEC ou Agilent Bio SEC-5
Fase móvel: tampão de fosfato de 150 mM, pH 7,0*
Gradiente: isocrática na faixa de 10-30 min
Temperatura: recomendado: 10-30 °C, máximo: 80 °C

Taxa de fluxo: 0,1-0,4 mL/min para colunas com 4,6 mm de DI
0,1-1,25 mL/min para colunas com 7,8 mm de DI

Tamanho da amostra: ≤ 5% do volume total da coluna

*Outros tampões aquosos com salinidade alta e baixa podem ser usados

Para obter informações adicionais, veja a nota de aplicação: *Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins* (publicação nº 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/library

Após o cromatograma inicial, cargas adicionais podem ser necessárias para melhorar a separação, manter a solubilidade da proteína ou diminuir a interação da amostra com os meios cromatográficos. A força iônica da fase móvel pode ser ajustada para mais ou menos força até atingir uma separação otimizada. O pH normalmente também pode ser ajustado em ± 0,2 unidade. Caso otimização adicional seja necessária, a faixa para cima ou para baixo deve ser ampliada. Uma mudança na temperatura ou adição de solvente orgânico também podem ser feitas.

Para protocolos que requerem sal adicional, esses tampões são típicos:
100-150 mM de cloreto de sódio em 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0
100-150 mM de sulfato de sódio em 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0
50-100 mM de ureia em 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0. Outros sais similares (como KCl) e hidrocloreto de guanidina também podem ser usados.

Faixa de pH: 2,0-8,5

As adições potenciais de solvente orgânico incluem:

5-10% de etanol (ou outros solventes similares como metanol ou acetonitrila) em 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0, 5% de DMSO em 50 mM de fosfato de sódio, pH 7,0. Observe que pode

ser necessário reduzir a taxa de fluxo para manter-se abaixo da pressão operacional máxima ao usar fases móveis de maior viscosidade.

Temperatura:

Tipicamente, as separações por SEC são executadas a 10-30 °C. A separação de proteínas e peptídeos pode exigir temperatura mais alta para melhorar tanto a resolução como a recuperação de proteínas e peptídeos hidrofóbicos. A SEC pode ser executada em uma sala fria para manter a máxima atividade biológica de proteínas sensíveis à temperatura.

A temperatura operacional máxima das colunas Agilent Bio SEC é 80 °C. Observe que temperaturas mais altas podem denaturar as proteínas.

CONSIDERAÇÕES DE INSTRUMENTAÇÃO PARA A SEC

O mecanismo de separação da SEC significa que o volume de eluição, ou o tempo de retenção, são absolutamente críticos para a análise. Isso exige instrumentação de alto desempenho para garantir a precisão e a reprodutibilidade. As bombas isocráticas ou bombas de gradiente operando em modo isocrático são apropriadas e, então, detectores de índice refrativo (RI), assim como detectores mais convencionais UV ou DAD, podem ser empregados. Para garantir estabilidade da linha de base, especialmente ao usar um detector de RI, degaseificador on-line da fase móvel e compartimentos termostatizados são altamente recomendados. A operação em temperaturas elevadas aumenta o coeficiente de difusão, o que resulta em uma melhor resolução, melhor reprodutibilidade e menos tensão na coluna. Portanto, os compartimentos termostatizados são essenciais para um sistema de alto desempenho.

Operação robusta e confiável mesmo em condições de solvente desafiadoras

Tampões com altas concentrações de sal como 2 M NaCl ou 8 M de ureia e valores extremos de pH entre 1 and 13 são comumente usadas na análise de biomoléculas, o que representa um desafio significativo para os instrumentos de LC. O design dedicado do LC quaternário 1260 Infinity Bio-inert trabalha sob essas condições de solventes agressivos com facilidade. Titânio resistente à corrosão no sistema de fornecimento do solvente e materiais livres de metais no caminho do fluxo da amostra criam um instrumento extremamente robusto, protegendo não apenas sua amostra, mas também seu investimento. O detector também foi projetado para separações de biomoléculas e não afeta a análise de proteínas, o formato do pico e a recuperação.

Proteja suas proteínas durante a análise

O calor pode denaturar proteínas, por isso é importante que a sua amostra seja mantida em temperatura constante em toda a trajetória de fluxo de LC. O amostrador automático biocompatível da Agilent com loop de amostra inerte pode ser resfriado utilizando-se um termostatizador de amostras acoplado. Trocadores de calor biocompatíveis para o compartimento de coluna termostatizado mantêm a temperatura constante. A Agilent oferece várias celas de fluxo biocompatíveis para permitir a análise confiável de sua proteína em várias condições. Saiba mais sobre as opções de cela de fluxo em www.agilent.com/chem/bioflowcells.



Sistema LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert



Cela de fluxo Bio-inert com etiqueta RFID, 10 mm, 13 µL (p/n G5615-60022)

Soluções de software oferecem novas informações

Ao trabalhar com cromatografia por exclusão de tamanhos, há várias opções de software que oferecem suporte a você:

- **Software HPLC:** o software Agilent OpenLAB CDS ChemStation ajuda você a adquirir, revisar e organizar dados de cromatografia e realizar análise quantitativas.
- **Software GPC/SEC:** disponível como parte do sistema Agilent GPC/SEC, fornecendo mais informações com base no peso molecular
- **Software Buffer Advisor:** elimina as etapas entediante e de desenvolvimento de métodos propensas a erros de preparação de tampão, mistura de tampão e aferição de pH através da criação de gradientes de pH e sal de maneira rápida e fácil.



Caracterização molecular abrangente

A SEC pode ser usada para determinar o peso molecular médio de analitos poliméricos, incluindo moléculas de ocorrência natural (polissacarídeos, amidos, etc) e polímeros sintéticos (polietilenoglicol ou óxido de polietileno) (Figura 4).

Para amostras mais complexas ou de proteínas, incluindo vacinas, frequentemente é necessária uma forma mais sofisticada de análise de dados com software dedicado. Em combinação com os detectores adequados, podem ser obtidas informações valiosas sobre a conformação da amostra. Consulte a página 17 para obter mais informações sobre as opções do detector.

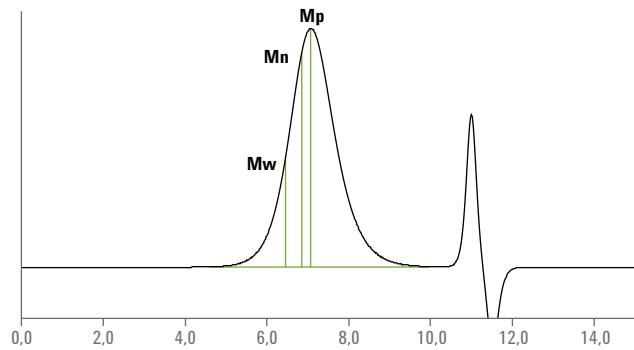
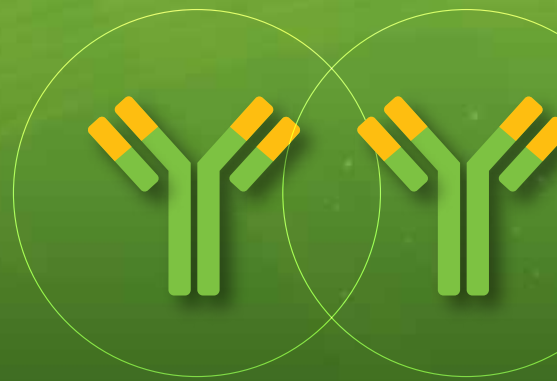


Figura 4: separação da SEC de polissacarídeos mostrando Mw, Mn e Mp.

COMPONENTES DE CARACTERIZAÇÃO DE EXCLUSÃO DE TAMANHOS



Preparo de amostras

O preparo de amostras para a cromatografia por exclusão de tamanhos é semelhante àquele para qualquer análise de proteína para os métodos HPLC. O aspecto mais importante é que a amostra deve ser solúvel no eluente e ser dissolvida de forma ideal na fase móvel. Devido à dimensão da coluna e da baixa velocidade linear como resultado de taxas de fluxos relativamente baixas em comparação a outras formas de HPLC (veja "Tamanho de coluna" abaixo), as concentrações de amostras e os volumes de injeção talvez precisem ser maiores do que o normal. Para proteger a coluna contra possíveis danos, recomendamos que as amostras sejam filtradas ou centrifugadas antes do uso para remover partículas. No entanto, a filtração não deve ser usada para solubilidade de amostras precárias, pode ser necessário encontrar um eluente alternativo.

Para o preparo eficaz de amostras, também é necessário certificar-se de que os métodos usados para dissolver a amostra não alterem as propriedades da própria amostra. Algumas proteínas podem agregar (formando dímeros e multímeros de peso molecular maior) ou dissociar (formando subunidades de peso molecular menor) sob condições de tensão. Isso pode incluir ciclos de congelamento-descongelamento, extremos de temperatura, sonificação ou até mesmo concentração. Veja o guia de desenvolvimento de método na página 5 para obter mais informações.

Filtros de ligação de proteína baixa do Captiva

Independentemente de qual preparo de amostra você estiver realizando, é uma boa ideia filtrar sua amostra com um filtro de ligação de proteína baixa.

Os filtros PES Agilent fornecem ligação de proteína baixa consistente e superior para filtração relacionada à proteína. As membranas do filtro PES são uma opção melhor do que as membranas PVDF para a maioria das análises de LC. O PES Agilent tem compatibilidade semelhante aos filtros PVDF para solventes LC comuns e é superior em termos de ligação à proteína e limpeza. Saiba mais em www.agilent.com/chem/filtration



Filtros PES Captiva

Diâmetro (mm)	Medida de poro (µm)	Certificação	Invólucro	Part Number
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

Seleção de coluna

Tamanho da coluna

As colunas da SEC são normalmente muito maiores do que as usadas para outro tipo de cromatografia e são operadas em taxas de fluxo comparativamente baixas ou em velocidades lineares baixas. As dimensões da coluna padrão para a SEC são 7,8 x 300 mm, operadas a 1,0 mL/min, em comparação a uma coluna de fase reversa que mais provavelmente tenha 2,1 ou 4,6 x 150 mm e são operadas em velocidades lineares 2 ou 3 vezes maiores. Isso não é efeito do tamanho da coluna, mas devido ao mecanismo da SEC.

Com a SEC, não há aumento na concentração de amostras normalmente vistas com outras técnicas de cromatografia devido à absorção ou à interação com a fase estacionária. Portanto, as amostras analisadas pela SEC são injetadas em volumes muito maiores (5-20 µL), frequentemente em altas concentrações (1-4 mg/mL). Os tempos de corrida são normalmente de 10 a 12 minutos por coluna (considerando uma coluna convencional de 7,8 x 300 mm operada a 1,0 mL/min) e os picos são comumente amplos, então as altas taxas de coleta de dados não são necessárias. Para comparação ou quantificação de agregação de proteínas, é usado o software HPLC. Para obter informações de distribuição de peso molecular para polímeros polidispersos, é usado um software de SEC específico.

Compreender as propriedades de sua coluna escolhida através do uso de calibração regular é de essencial importância. Incluindo uma molécula suficientemente grande, uma grande demais para permear qualquer dos poros, deve ser possível determinar o limite de exclusão para a coluna. De maneira semelhante, usar uma molécula muito pequena, pequena o suficiente para permear toda a estrutura do poro, é possível determinar o limite de permeação total da coluna. Você deve, então, certificar-se de que a separação que você está tentando alcançar ocorra entre esses dois limites. Se o cromatograma de sua amostra incluir material excluído ou material que elua no ponto de permeação total, é uma indicação de que talvez você precise usar uma coluna de tamanho de poro diferente para sua análise.



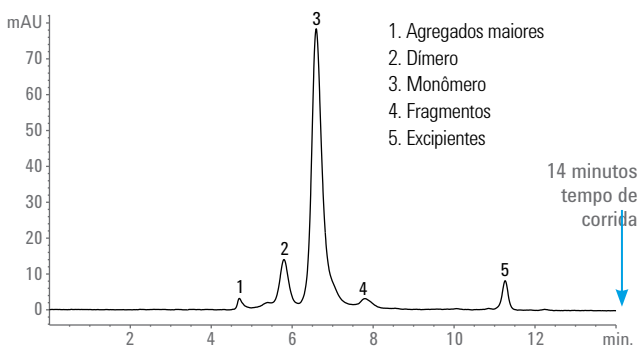
Aumento da velocidade analítica com colunas menores

Normalmente, é necessário usar colunas de 300 mm de comprimento para obter o grau de resolução de que você precisa para a análise. No entanto, para melhorar a velocidade de separação, você pode considerar o uso de colunas de menor comprimento. A separação pode ser conseguida na metade do tempo usando uma coluna de 150 mm de comprimento. No entanto, a resolução será prejudicada. Onde for necessária alta produtividade, colunas menores podem frequentemente ser executadas em taxas de fluxo maiores sem o risco de atingir os limites de pressão de retorno e uma redução adicional no tempo de análise pode ser atingida. Veja a Figura 5.

Coluna: AdvanceBio SEC, 7,8 x 300 mm

Taxa de fluxo: 1,0 mL/min

Amostra: IgG policlonal



Coluna: AdvanceBio SEC, 7,8 x 150 mm

Taxa de fluxo: 2,0 mL/min

Amostra: IgG policlonal

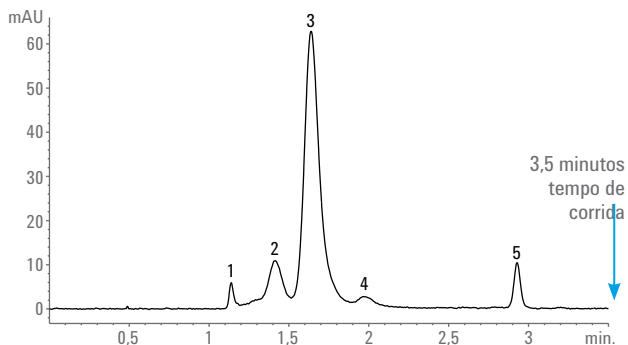


Figura 5: comparação da análise usando colunas de 300 mm em relação a colunas de 150 mm para demonstrar a economia de tempo.

Opções de fase estacionária da coluna

Escolha uma coluna de exclusão de tamanhos adequada para seu tamanho e tipo de molécula após determinar a solubilidade da amostra e a fase móvel – água, tampão ou solvente orgânico – de sua separação. As colunas empacotadas com sorventes a base de polímeros são frequentemente usadas para moléculas poliméricas com distribuições de amplo peso molecular, como heparina, amido ou celulose. As proteínas e moléculas que têm um peso molecular discreto são mais adequadas a fases estacionárias com base de sílica (Tabela 1).

É importante lembrar que as proteínas contêm vários aminoácidos com diferentes funcionalidades de cadeia lateral: ácidas, básicas, hidrofóbicas e neutras/hidrofílicas. Para impedir que ocorram interações com colunas de sílica, são necessários tampões na fase móvel.

A Agilent sugere a faixa de peso molecular para suas colunas e idealmente sua opção de coluna deve cair no meio da faixa operacional.

Cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC)

Aplicação	Colunas Agilent	Observações
Proteínas		
SEC-UV/DAD, ou análise de LS de mAbs, proteínas e peptídeos	Agilent AdvanceBio SEC	A tecnologia inovadora mais recente que fornece resolução para eliminar reanálises de amostras e velocidade para reduzir o tempo de análise, melhorando a produtividade do laboratório.
Análise de SEC-MS de mAbs, proteínas e peptídeos	Agilent Bio SEC-3	Fornecer linhas de base estáveis com detecção de MS
Amostras e biomoléculas grandes com componentes de múltiplos pesos	Agilent Bio SEC-5	Mais opções de medida de poro (100Å, 150Å, 300Å, 500Å, 1000Å e 2000Å) para cobrir uma ampla faixa de analitos
Proteínas globulares, anticorpos	ProSEC 300S	Opção de coluna única para a análise de proteínas em condições de salinidade alta
Proteínas, proteínas globulares	ZORBAX GF-250/450	Produtos obsoletos que devem ser empregados onde protocolos ainda exigem o uso da designação L35 de USP
Analitos solúveis em água		
Polímeros e oligômeros de baixo peso molecular, oligossacarídeos, PEGs, lignossulfonatos	2 ou 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH 8 µm ✓ PL aquagel-OH 20 5 µm ✓ PL aquagel-OH MIXED-M 8 µm	A série PL aquagel-OH Analítica tem uma faixa de pH de 2-10, compatibilidade com solventes orgânicos (até 50% de metanol), estabilidade mecânica de até 140 bar (2030 psi) e baixas pressões operacionais de coluna.
Biopolímeros polidispersos, polissacarídeos, derivados da celulose	2 ou 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8 µm ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8 µm	
Polímeros de PM muito alto, ácidos hialurônicos, amidos, gomas	PL aquagel-OH 60/50/40 15 µm em série	

Tabela 1: opções de seleção de coluna de acordo com a aplicação e tamanho da amostra.



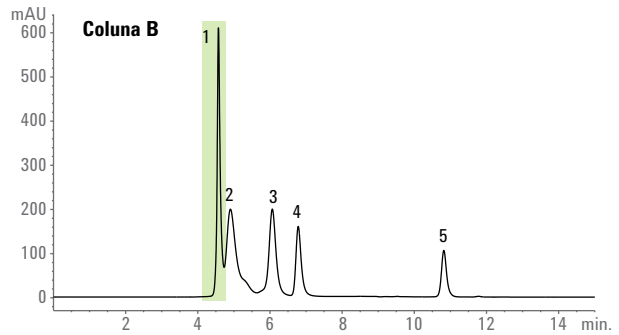
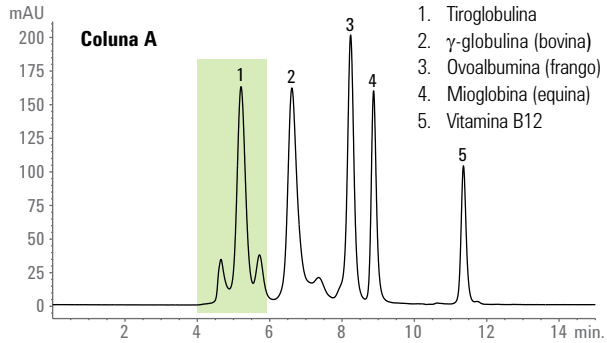
As colunas Agilent Bio SEC para separações de biomoléculas, inclusive a agregação de proteínas e as colunas Agilent GPC para a análise de polímeros naturais, inclusive a determinação de peso molecular de polissacarídeos.

Medida do poro

As proteínas são relativamente pequenas e compactas em comparação a outros biopolímeros, e então a medida do poro de 300Å é uma boa opção para uma seleção de coluna inicial. A Figura 6 compara a resolução de um padrão de referência de mistura de cinco proteínas e uma amostra de IgG policlonal em colunas

com diferentes medidas de poros e mostra claramente o efeito da medida do poro na resolução. Com poros de 300Å, a maior tiroglobulina de proteína e o dímero de IgG são resolvidos, mas conforme a medida do poro diminui, as maiores proteínas são excluídas e não há separação.

Mistura de padrões de filtração em gel BioRad



Coluna A: AdvanceBio SEC 300Å
4,6 x 300 mm, 2,7 μ m (p/n PL1580-5301)

Coluna B: AdvanceBio SEC 130Å
4,6 x 300 mm, 2,7 μ m (p/n PL1580-5350)

Instrumento: sistema LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert

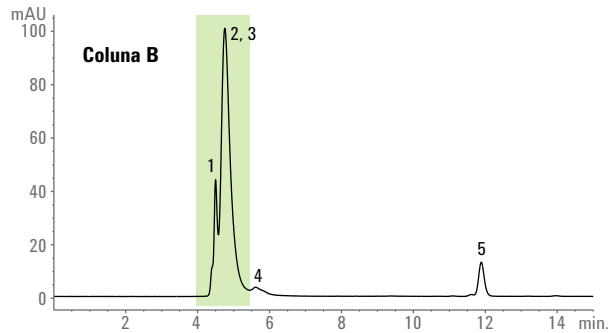
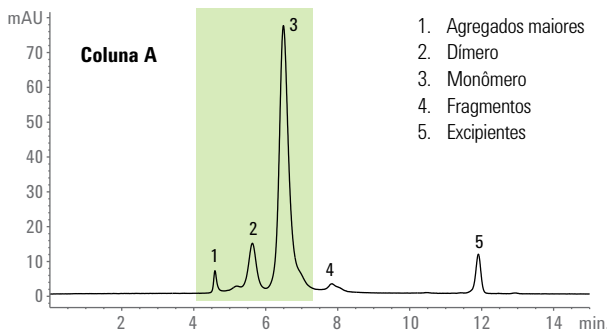
Fase móvel: 150 mM de tampão de fosfato, pH 7,0

Taxa de fluxo: 0,35 mL/min

Detector: UV, 220 nm

Amostra: mistura de padrões de filtração em gel BioRad

Separação de IgG policlonal



Coluna A: AdvanceBio SEC 300Å
4,6 x 300 mm, 2,7 μ m (p/n PL1580-5301)

Coluna B: AdvanceBio SEC 130Å
4,6 x 300 mm, 2,7 μ m (p/n PL1580-5350)

Instrumento: sistema LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert

Fase móvel: 150 mM de tampão de fosfato, pH 7,0

Taxa de fluxo: 0,35 mL/min

Detector: UV, 220 nm

Amostra: IgG policlonal

Figura 6: comparação de medidas de poro na resolução de padrões de filtração em gel BioRad e IgG policlonal. A área destacada em verde mostra a diferença na resolução entre as duas medidas de poro. A maior medida de poro é necessária para a análise das proteínas maiores.

Avaliação de faixas de permeação de SEC

Com proteínas é importante reconhecer que o mecanismo de SEC funciona com a separação de solutos dependendo de seu tamanho em solução e não de seu peso molecular. Isso fica evidente ao comparar o esquema de calibração das proteínas/peptídeos às curvas de PEG/PEO e polissacarídeos/pullulan, como mostrado na Figura 7. Os calibrantes de PEG/PEO e polissacarídeos/pullulan forneceram curvas de calibração bastante semelhantes, mas a curva de proteínas/peptídeos é deslocada e tem um formato diferente.

As proteínas são compostas de cadeias de polipeptídeos complexas que formam estruturas tridimensionais. Essas estruturas são afetadas pelo ambiente ao qual foram expostas, como pH ou força iônica. As cadeias farão o formato mais adequado a elas e, portanto, sua estrutura e seu tamanho podem variar.

Para demonstrar que o tempo de eluição é devido ao tamanho e não ao peso molecular, considere os tempos de retenção de calibrantes com um peso molecular de aproximadamente 50.000, no qual há uma diferença significativa (Figura 8). O PEG elui após apenas 7 minutos, o polissacarídeo elui a apenas um pouco mais de 7,5 minutos, mas a proteína elui a aproximadamente 9,5 minutos.

Isso demonstra claramente que o mecanismo de separação da SEC é baseado no tamanho real e não no peso molecular. Portanto, ao usar curvas de calibração, é importante especificar quais calibrantes foram usados. Por exemplo, é possível afirmar que a amostra de interesse tem um peso molecular equivalente de polissacarídeos/pullulan de 50.000. Veja a página 16 para detectores avançados que superam esse efeito relativo.

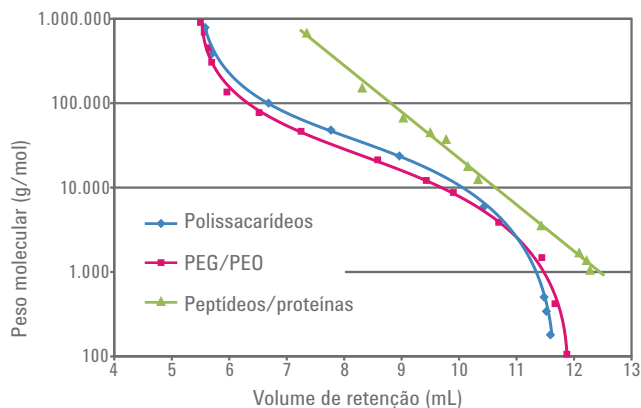


Figura 7: comparação de esquemas de calibração gerados para três tipos de calibrante.

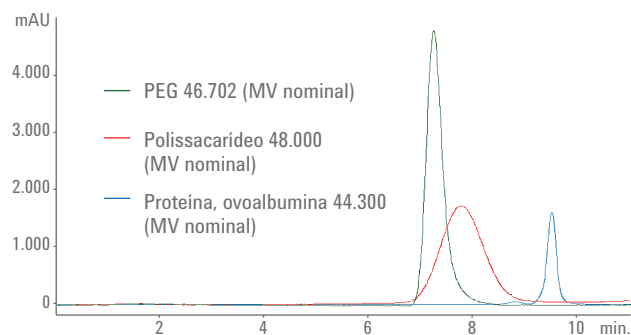


Figura 8: sobreposição de cromatogramas obtidos para calibrantes de peso molecular semelhante.



Padrão de calibração AdvanceBio SEC 130Å (p/n 5190-9416 padrão de calibração de AdvanceBio SEC 130Å, vial de 2 mL)

Uma mistura de proteínas que consiste de proteínas selecionadas cuidadosamente (Ovoalbumina, Mioglobina, Aprotinina, Neurotensina, Angiotensina II) projetada para calibrar as colunas de exclusão de tamanho AdvanceBio 130Å da Agilent. Esse padrão pode ser usado regularmente para calibrar a coluna e garantir o desempenho ideal do sistema em várias aplicações envolvendo análise e purificação de proteínas.

Padrão de calibração AdvanceBio SEC 300Å (p/n 5190-9417 Padrão de calibração AdvanceBio SEC 300Å, vial de 2 mL)

Uma mistura de proteínas que consiste de 5 proteínas selecionadas cuidadosamente (Tiroglobulina, γ -Globulina, Ovoalbumina, Mioglobina, Angiotensina II) projetada para calibrar as colunas de exclusão de tamanho AdvanceBio 300Å da Agilent. Esse padrão pode ser usado regularmente para calibrar a coluna e garantir o desempenho ideal do sistema em várias aplicações envolvendo análise e purificação de proteínas.



Tamanho de partícula

O tamanho da partícula também é uma consideração importante na seleção de colunas. Tamanhos de partículas menores fornecem separação mais eficiente, mas existe o risco de degradação (cisalhamento/deformação) da proteína. A Figura 9 mostra uma comparação entre colunas Agilent 3 µm Bio SEC-3 e 5 µm

Bio SEC-5. Haverá mais risco de pressão de retorno maior e de colunas ficarem bloqueadas se amostras e eluentes não forem preparados com cuidado. A filtração é recomendada para remover restos e materiais insolúveis. O uso de uma coluna de guarda ou filtro em linha também pode ampliar o tempo de vida útil da coluna.

Comparação entre a Agilent Bio SEC-3 e a Agilent Bio SEC-5

Análise de anticorpo monoclonal

Coluna: Bio SEC-3, 300Å
7,8 x 300 mm, 3 µm
(p/n 5190-2511)

Coluna: Bio SEC-5, 300Å
7,8 x 300 mm, 5 µm
(p/n 5190-2526)

Instrumento: sistema LC quaternário Agilent 1260
Infinity Bio-inert

Fase móvel: fosfato de sódio 150 mM, pH 7

Taxa de fluxo: 1 mL/min

Detector: UV, 220 nm

Amostra: anticorpo monoclonal humanizado

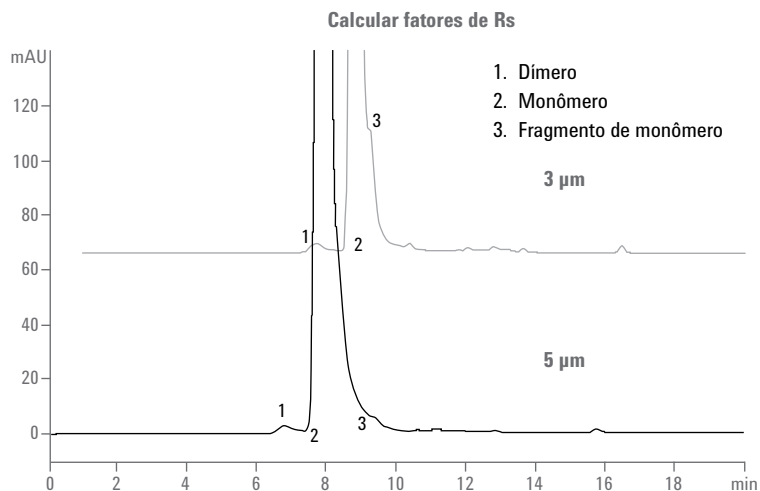


Figura 9: comparação de colunas Agilent Bio SEC-3 em relação a colunas Agilent Bio SEC-5. A coluna de 3 µm oferece melhor separação.

Diâmetro da coluna

O diâmetro da coluna também pode ser importante dependendo da quantidade da amostra. Se apenas quantidades limitadas de material estiverem disponíveis, colunas de DI de 4,6 mm (operadas a 0,35 mL/min) serão úteis. Mas é importante minimizar os volumes do sistema quando usando as colunas de DI menores para evitar dispersão excessiva e perda de resolução.

A SEC é considerada uma técnica de não denaturação quando eluentes aquosos forem usados, e por isso é extremamente útil para o fracionamento de amostras complexas ou isolamento de um componente de amostra para análise adicional. As colunas de diâmetro grande, como 21,2 mm conforme encontrado na faixa de produtos Agilent SEC-3 e SEC-5, significam que as separações de preparação de laboratório podem ser realizadas usando sistemas HPLC analíticos.



Colunas Agilent AdvanceBio SEC 7,8 x 300 mm e 4,6 x 300 mm

Parâmetros de método

Taxa de fluxo

Para algumas aplicações, a velocidade de análise é crucial. Uma coluna menor pode ser usada para reduzir o tempo da análise - 150 mm em relação aos 300 mm convencionais - ou as taxas de fluxo podem ser aumentadas ou ambos. No entanto, isso pode ter um efeito prejudicial na resolução, porque a SEC depende da difusão interna e externa de um poro para criar um caminho diferencial através da coluna. Entretanto, como mostrado na Figura 10, é impossível obter resolução suficiente para quantificar um dímero de IgG em menos de 4 minutos usando uma coluna de 150 mm a uma taxa de fluxo de 2 mL/min

Coluna: AdvanceBio SEC 300Å,
7,8 x 150 mm, 2,7 µm
(p/n PL1180-3301)

Eluente: 150 mM de tampão de fosfato, pH 7,0

Taxa de fluxo: 0,5, 1,0, 1,5 mL/min (52, 102, 152 bar)

Detector: UV, 220 nm

Injeção: 5 µL

Amostra: IgG (2 mg/mL)

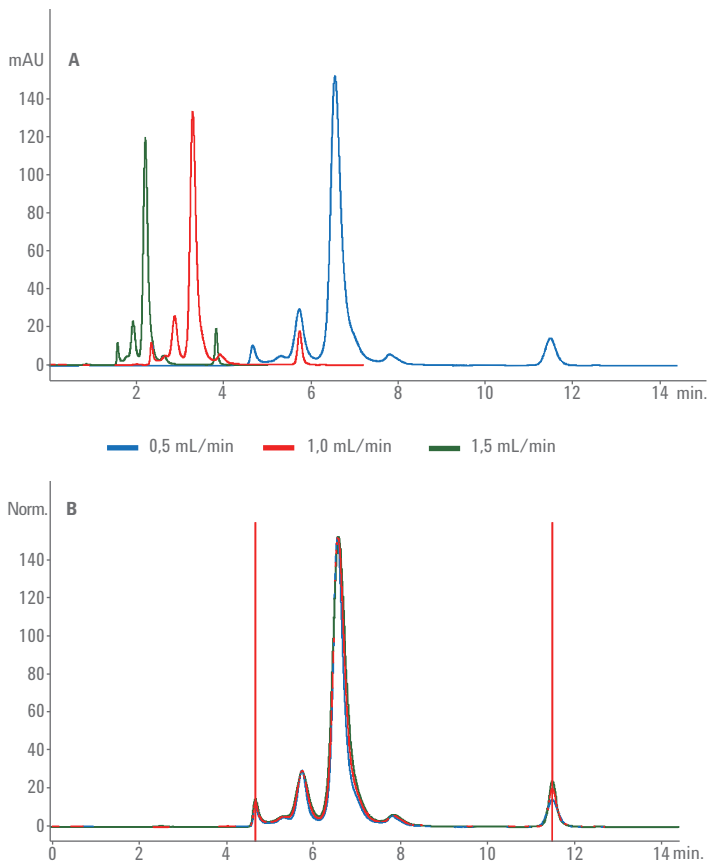


Figura 10: aumentar a taxa de fluxo diminui o tempo de análise de 12 para 4 minutos (A). Quando os tempos de retenção forem normalizados e sobrepostos (B), será evidente que os tempos de retenção são consistentes e que há mínima redução na resolução.

Solução de problemas de seu método SEC

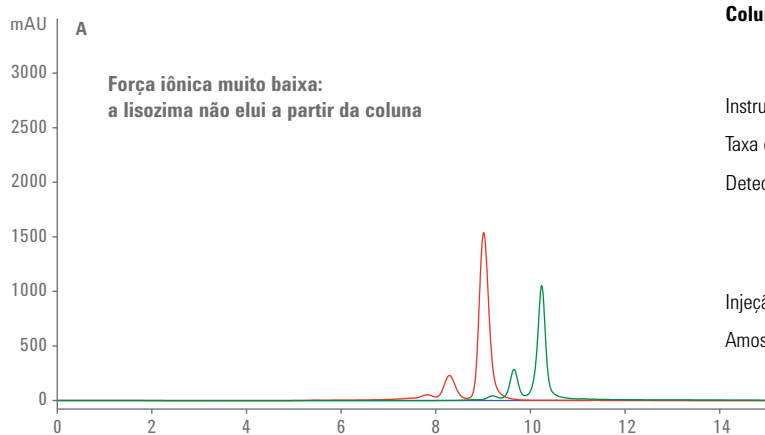
Problema	Fonte	Solução
Recuperação menor do que o esperado ou um alargamento dos picos	Analitos hidrofóbicos	Adicione uma pequena quantidade (10-20%) de modificador orgânico (acetonitrila ou metanol) para a fase móvel
Picos que aparecem quando não deveriam, com base no peso molecular, ou cauda do pico	Interações iônicas ou proteínas básicas	Aumente a força iônica - concentração de sal a intervalos de 50-100mM; adicione ao tampão de fosfato
Formas de pico incorretas	Absorção não específica	Aumente a concentração de sal ou use um Agilent 1260 Infinity Sistema LC quaternário 1260 Bio-inert
Retenção/resolução incorreta de analitos	Medida de poro insuficiente para o tamanho de molécula	Verifique sua medida de poro; veja a página 11 para mais informações

Seleção de fase móvel

Interações secundárias podem causar dificuldades

Para superar interações secundárias indesejáveis, pode ser necessário realizar a otimização de método. Tais interações podem fazer com que um analito elua mais tarde do que o esperado e pode dar a impressão de um peso molecular mais baixo. Pequenos ajustes na composição da fase móvel, pH, força iônica ou modificadores

orgânicos, podem ajudar a superar tais dificuldades (Figura 11). Também pode ser necessário refinar a opção de medida de poro, combinar colunas em séries, reduzir a taxa de fluxo ou alterar a temperatura para atingir a separação desejada.



Coluna: Agilent Bio SEC-3 300Å
4,6 mm x 300 mm, 3 µm
(p/n 5190-2513)

Instrumento: sistema LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert

Taxa de fluxo: 0,35 mL/min

Detector: UV, 220 nm

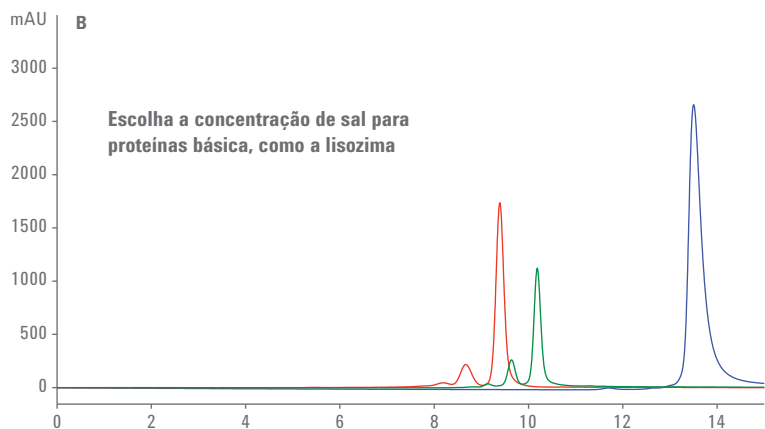
A: tampão de fosfato de 20 mM de eluente, pH 7 + 50 mM NaCl

B: tampão de fosfato de 20 mM de eluente, pH 7 + 100 mM NaCl

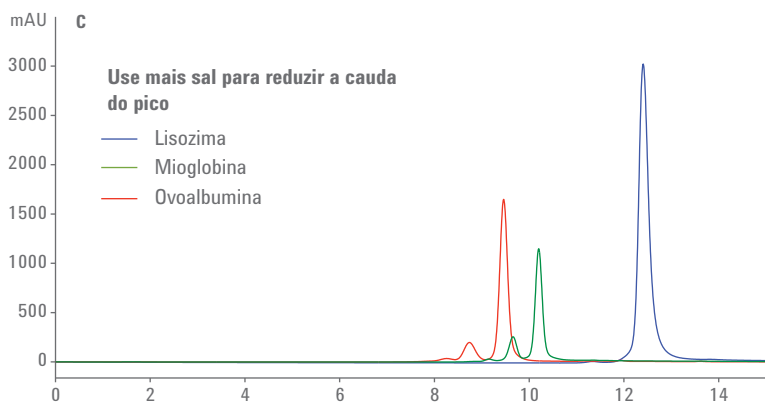
C: tampão de fosfato de 20 mM de eluente, pH 7 + 400 mM NaCl

Injeção: 5 µL

Amostra: proteína (1 mg/mL 20 mM de tampão de fosfato, pH 7)



50 mM NaCl em tampão de 20 mM



400 mM NaCl em tampão de 20 mM

Figura 11: efeito de muita ou pouca força iônica ao atingir sua separação desejada.

Calibração

Quando você tiver optado por uma coluna, será necessário criar uma calibração com padrões de um peso molecular conhecido. Sempre que você alterar sua coluna ou fizer alterações à fase móvel, será necessário repetir a calibração. A curva de calibração é obtida através da representação do tempo de retenção

em relação ao peso molecular (Figura 12). É especialmente importante escolher padrões adequados à molécula de interesse. Para uma separação de proteína, use os padrões de peso molecular de proteínas. Os padrões de peso molecular pullulan devem ser usado para uma separação de polissacarídeos.

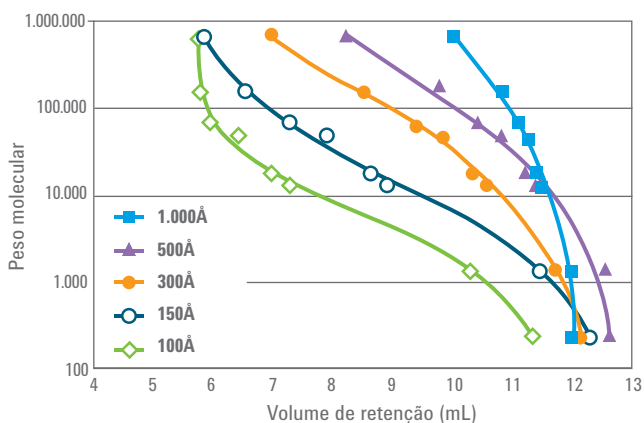
Coluna: Agilent Bio SEC-5
7,8 x 300 mm, 5 µm
(p/n 5190-2521)

Instrumento: sistema LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert

Fase móvel: 150 mM de fosfato de sódio, pH 7,0

Taxa de fluxo: 1,0 mL/min

Detector: UV



Proteínas	MW	Volume de retenção				
		1.000Å	500Å	300Å	150Å	100Å
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
Ovoalbumina	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
Ribonuclease 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 calibração obtidas através da representação do tempo de retenção em relação ao peso molecular.

Idealmente, os padrões devem ser dissolvidos na fase móvel e é necessário ter cuidado para garantir que a amostra tenha sido totalmente dissolvida. Se a solução parecer turva, será necessário tomar uma ação adicional. A centrifugação ou a filtração devem ser

usadas para remover material insolúvel antes da injeção. No entanto, pode ser necessário analisar as condições da fase móvel que melhorarão a solubilidade da amostra, já que os processos físicos podem estar alterando a composição do peso molecular.



Técnicas de detecção avançada

As considerações adicionais da SEC incluem a opção do detector. UV ou arranjo de diodos (DAD) é comumente usado para separações de proteínas. Melhores resultados, ou seja, a maior sensibilidade, para peptídeos e proteínas serão normalmente obtidos a 220 nm. Apesar de algumas soluções de tampão ou modificadores orgânicos poderem ter muita interferência em comprimentos de onda baixos, neste caso, pode ser necessário 254 nm ou 280 nm. Uma desvantagem da detecção de UV é que algumas moléculas não possuem um cromóforo, mas como os analitos são eluídos isocriticamente, é possível usar um detector de RI.

A adição de detecção do espalhamento de luz avançada aumenta significativamente o desempenho da SEC. O espalhamento de luz estática determina as massas molares precisas, independentemente de calibrações de coluna e interações indesejadas e é complementada com espalhamento de luz dinâmica para estudar o tamanho molecular. O espalhamento de luz aumentou a sensibilidade para frações grandes permitindo a descoberta de agregação em quantidades muito pequenas (Figura 13). É importante selecionar um detector com volume morto baixo para garantir que essas informações extra sejam obtidas sem sacrificar o desempenho cromatográfico.

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

Instrumento: Agilent 1260 Infinity Bio-inert
Sistema LC quaternário com
Agilent 1260 Infinity Multi-Detector
GPC/SEC

Fase móvel: fosfato de sódio 150 mM, pH 7,0

Taxa de fluxo: 0,8 mL/min

Temperatura: 30 °C

Detector: UV, 280 nm + RI + LS 90°

Injeção: 5 µL

Amostra: anticorpo monoclonal degradado

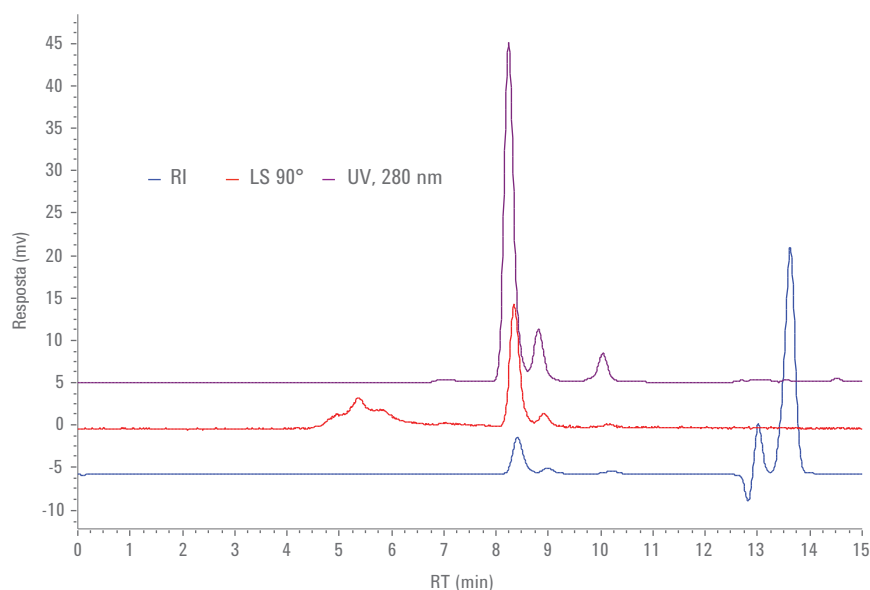


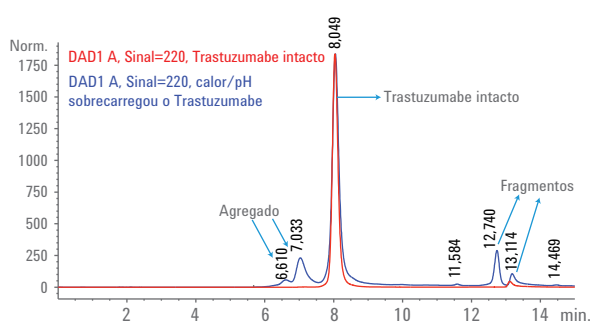
Figura 13: resultados do uso de detectores diferentes em uma separação de proteína.

Proteínas conjugadas

Proteínas terapêuticas são submetidas a agregação e degradação durante todas as etapas de desenvolvimento, como expressão, reconformação, processamento downstream, formulação, esterilização e armazenamento. Apesar de agregados/degradantes estarem presentes em concentrações extremamente baixas, podem ter um grande impacto na qualidade de compostos biológicos, levando a perda de atividade, solubilidade diminuída e imunogenicidade aumentada. A cromatografia por exclusão de tamanhos é o método padrão usado para caracterizar a agregação de proteínas e também é exigida para envio e aprovação regulamentares.

Para melhorar a entrega, aumentar a meia vida e aumentar a potência, as proteínas, inclusive os anticorpos monoclonais, podem

ser conjugados. Polímeros solúveis em água, como polietilenoglicol, são conjugados com a proteína para melhorar as atividades farmacológicas, aumentam sua meia vida na corrente sanguínea e reduzem a imunogenicidade. Mais recentemente, houve interesse em conjugados de medicamentos de anticorpos, ADCs, onde anticorpos monoclonais são conjugados a um agente citotóxico para entrega de medicamentos alvo e eficácia aumentada do tratamento. Após a conjugação, os mesmos estudos de agregação são exigidos porque a alteração nas características da amostra podem representar um desafio maior para conseguir uma separação de SEC. Colunas com ligação não específica muito baixa, como a AdvanceBio SEC, são necessárias para a análise tanto do anticorpo como do ADC usando fases móveis aquosas. Veja a Figura 14.

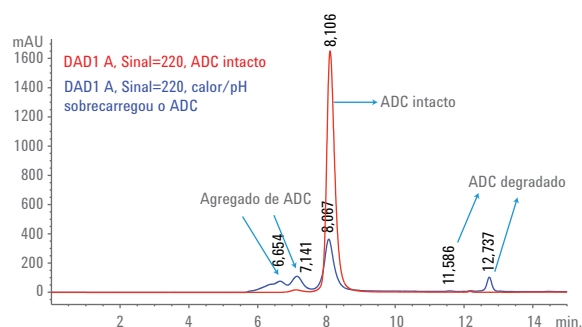


Coluna: AdvanceBio SEC 300Å
7,8 x 300 mm, 2,7 µm

Instrumento: sistema LC quaternário Agilent 1260 Infinity Bio-inert

Fase móvel: PBS, 50 mM de fosfato de sódio contendo 150 mM de cloreto de sódio, pH 7,4

Temperatura de TCC Ambiente



Volume de injeção: 10 µL

Taxa de fluxo: 0,8 mL/min

Detector: UV, 220 nm

Figura 14: a mesma fase móvel aquosa foi usada para o mAb e o ADC mais hidrofóbico.

Navegue até um resultado bem-sucedido

www.agilent.com/chem/navigator

Com uma grande quantidade de biocolunas e colunas de moléculas pequenas, a coluna de LC Agilent e o NAVEGADOR de preparo de amostras ajudarão você a escolher a coluna certa para sua aplicação.

O NAVEGADOR apresenta quatro opções de pesquisa simples:

- Por part number, com referências cruzadas para colunas de LC e produtos de preparo de amostras para encontrar a melhor reposição da Agilent



- Por composto usando a lista suspensa
- Por método de USP
- Por coluna, com recomendações baseadas em método

Preparo de amostras

- Idealmente, as amostras devem ser dissolvidas na fase móvel
- Se a amostra estiver turva, poderá ser necessário alterar as condições da fase móvel
- Podem ser usadas filtração ou centrifugação para clarear as amostras, mas esses processos podem alterar a composição do peso molecular da amostra
- Para dissolver uma amostra, usa-se em alguns casos aquecimento leve, agitação por vórtex ou sonificação, mas deve ser aplicado com cuidado porque isso pode alterar a composição do peso molecular
- Também é necessário ter cuidado para garantir que a amostra não seja alterada durante o armazenamento
- É necessário preparar amostras novas e analisá-las assim que possível
- O crescimento bacteriano pode se desenvolver rapidamente em soluções de tampão
- Amostras feitas em alta concentração também podem ser alteradas com o tempo, resultando em agregação ou até mesmo precipitação



Seleção da coluna

- Para garantir a integridade da amostra, a SEC é realizada lentamente em colunas longas
- Os comprimentos das colunas são normalmente de 250 ou 300 mm
- A taxa de fluxo normal é de 1,0 mL/min em uma coluna de DI 7,5 ou 7,8 mm e 0,35 mL/min em uma coluna de DI 4,6 mm
- As colunas são frequentemente executadas em série para aumentar a resolução em aplicações de biopolímeros
- Tamanhos de partículas menores são usados para aumentar a resolução em aplicações de proteínas
- Separações feitas em colunas de 150 mm com tamanhos de partículas menores podem reduzir o tempo analítico

Opção de fase estacionária da coluna

- Não deve haver interações não específicas entre analitos e a fase da coluna
- Sorbentes com base de sílica são usados para analisar peptídeos e proteínas
- Sorbentes baseados em polímeros são para analisar biopolímeros



Parâmetros da coluna

- **Medida do poro**—depende da faixa de peso molecular da amostra para evitar a exclusão de componentes da amostra e maximizar o volume na região da separação exigida
- **Medida da partícula**—use partículas menores para maior resolução (mas maior pressão de retorno)
- **Comprimento da coluna**—meio-termo entre resolução e tempo de análise
- **Id da coluna**—use colunas menores para consumo reduzido de solvente e menor volume de injeção

Fase móvel

- A fase móvel deve conter tampão/sal para superar interações iônicas, mas muito pode causar interações hidrofóbicas
- Não altere o analito para evitar degradação/agregação, etc
- Prepare uma fase móvel nova e use-a prontamente, pois o crescimento bacteriano é rápido em tampão diluído armazenado a temperatura ambiente
- A vida útil do tampão é de menos de 7 dias, a menos que refrigerado
- Filtre antes de usar para remover partículas em água (menos provável) ou em sais de tampão (mais provável)
- Tampões de fosfato com pH alto (particularmente em temperatura elevada) pode reduzir significativamente a vida útil da coluna ao usar colunas de sílica

Saiba mais sobre as biocolunas da Agilent para SEC em www.agilent.com/chem/bioHPLC

Fazendo parceria com você para obter ótimos resultados

Desafios crescentes exigem melhores respostas. Nossas soluções permitem que cientistas biofarmacêuticos inovem na investigação de doenças, aceleram a descoberta de drogas e apresentam maior confiança durante o desenvolvimento e a produção.

Conheça as soluções Agilent para biofarmácia

www.agilent.com/chem/togetherbiopharma

Saiba mais

www.agilent.com/chem/BioHPLC

Encontre um centro de atendimento ao cliente

Agilent em seu país

www.agilent.com/chem/contactus

Brasil

0800 7281405

chem_vendas@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Ásia e Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com

Somente para uso em pesquisas. As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio. A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Impresso nos EUA, 1º de novembro de 2015

5991-3651PTBR



Agilent Technologies