

Guida pratica di Agilent alla

CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE DIMENSIONALE PER L'ANALISI DI BIOMOLECOLE

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

GUIDA A UNA SEC EFFICACE

La separazione cromatografica di biomolecole sulla base delle loro dimensioni in soluzione è conosciuta come cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC). A differenza di altre tecniche cromatografiche, si basa sull'assenza di qualsiasi interazione tra l'analita e la fase stazionaria impaccata nella colonna. Questo fornisce una soluzione ideale per l'analisi e la separazione delle proteine intatte dai contaminanti, che possono includere aggregati, eccipienti, frammenti di cellule e altre impurezze derivate dalla degradazione. La cromatografia ad esclusione dimensionale è quindi ampiamente utilizzata per la caratterizzazione di molecole bioterapeutiche, sia durante lo sviluppo che la produzione.

In questa guida tratteremo delle separazioni SEC, degli effetti delle dimensioni e del peso molecolare del soluto, delle scelte per la selezione delle colonne, di importanti considerazioni sulla fase mobile, di regole generali per l'utilizzo della SEC e di altro ancora.



SEPARAZIONE SEMPLICE E SENZA COMPLICAZIONI

Con la SEC, le molecole vengono separate dalla più grande alla più piccola in proporzione al loro peso molecolare in soluzione. Le molecole molto grandi sono escluse dal letto impaccato e vengono eluite per prime, nel volume morto. Le molecole più piccole saranno in grado di penetrare nei pori in varia misura a seconda della loro dimensione (Figura 1), con le molecole più piccole che diffondono più in profondità nella struttura dei pori e vengono eluite per ultime.

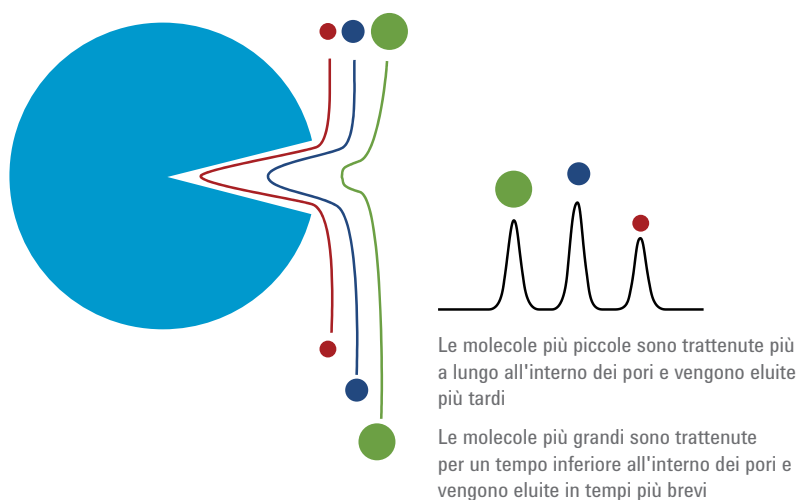


Figura 1: Le molecole penetrano nei pori della fase stazionaria in varia misura a seconda delle loro dimensioni.

Per maggiori informazioni sulle colonne Bio per SEC Agilent, vai su www.agilent.com/chem/bioHPLC

La cromatografia ad esclusione dimensionale è adatta alla separazione e alla quantificazione di miscele proteiche ed è quindi una tecnica utile per il controllo di qualità nella produzione di proteine ricombinanti. Questo include la misura degli aggregati (dimeri, trimeri, tetrameri, etc.) o la separazione degli eccipienti a basso peso molecolare e delle impurezze dalle proteine a peso molecolare maggiore (Figura 2).

Comprendere e controllare l'aggregazione delle proteine terapeutiche è essenziale, poiché questa influenzerà l'efficacia e la durata e potrebbe anche portare a risposte immunogeniche potenzialmente gravi. In base alle linee guida di normative quali ICH(Q6B), gli aggregati devono essere risolti dal prodotto desiderato e quantificati.

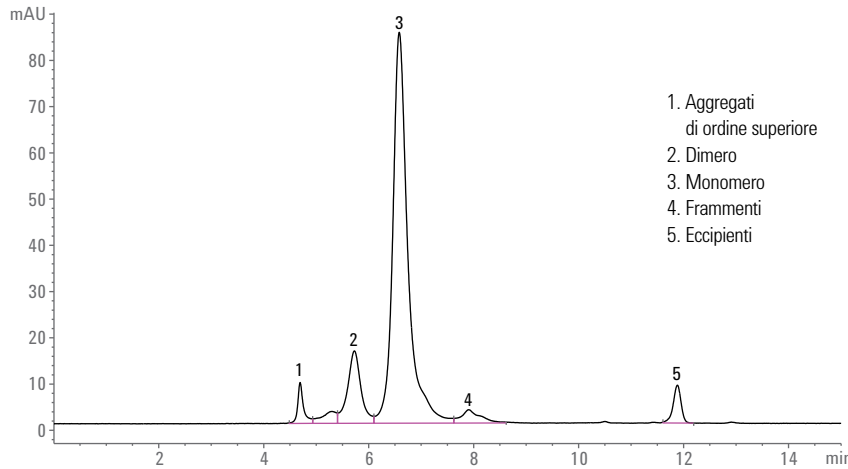


Figura 2: Separazione di aggregati di IgG ed eccipienti.

Separazione di monomeri e dimeri di IgG intatte

Colonna: AdvanceBio SEC Agilent 300Å 7,8 x 300 mm, 2,7 µm (codice PL1180-5301)

Strumento: Sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity

Flusso: 1,0 mL/min

Temperatura: Ambiente

Rivelatore: UV, 220 nm

Iniezione: 5 µL

Campione: IgG policlonali

Fase mobile: 150 mM in tampone fosfato di sodio, pH 7,0

Solitamente, l'ordine di eluizione segue il peso molecolare.

Le molecole con il peso molecolare più alto sono eluite per prime.

In realtà, tuttavia, il meccanismo della SEC si basa sulle dimensioni in soluzione. La maggior parte delle proteine è compatta, ma alcune molecole proteiche sono cilindriche, quindi potrebbero essere eluite prima del previsto a causa del loro maggiore raggio idrodinamico in soluzione (Figura 3). Inoltre, differenti fasi mobili possono influenzare l'ordine di eluizione a causa di cambiamenti nelle dimensioni in soluzione (raggio idrodinamico e raggio di girazione).

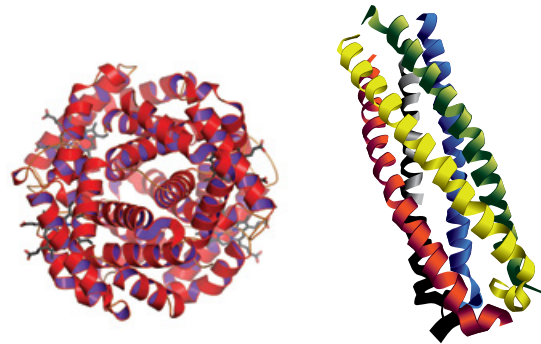


Figura 3: Confronto tra una proteina globulare compatta e una proteina cilindrica.

Guida allo sviluppo di metodi SEC-UV/DAD

Scegli le colonne e le condizioni iniziali per separazione di biomolecole basata sulle dimensioni, analisi di aggregazione, peptidi, polipeptidi e proteine.

Peptidi, polipeptidi, proteine, anticorpi monoclonali
PM >0,1 - 1.250 kDa

Peptidi, polipeptidi, proteine, anticorpi monoclonali
PM >0,1 - 10.000 kDa

Seleziona la colonna sulla base dell'intervallo di peso molecolare e delle dimensioni dei pori

AdvanceBio SEC (2,7 µm)

Dimensioni dei pori	Intervallo di PM (kDa)
130 Å	0,1-100
300 Å	5-1.250

Agilent Bio SEC-5 (5 µm)

Dimensioni dei pori	Intervallo di PM (kDa)
100 Å	0,1-100
150 Å	0,5-150
300 Å	5-1.250
500 Å	15-5.000
1000 Å	50-7.500
2000 Å	>10.000

Condizioni iniziali di separazione consigliate

Colonna: AdvanceBio SEC o Agilent Bio SEC-5
Fase mobile: 150 mM in tamponi fosfato, pH 7,0*
Gradiente: Isocratico nell'intervallo 10 - 30 minuti
Temperatura: Raccomandata: 10-30 °C, massima: 80 °C

Flusso: 0,1 - 0,4 mL/min per colonne con d.i. di 4,6 mm
0,1 - 1,25 mL/min per colonne con d.i. di 7,8 mm

Volume di iniezione: ≤5% del volume totale della colonna

*Si possono usare altri tamponi acquosi ad alto o basso contenuto di sali

Per maggiori informazioni, consulta la nota applicativa: *Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins* (pubblicazione n. 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/library

Dopo la prima iniezione, può essere necessario operare altri cambiamenti per migliorare la separazione, mantenere la solubilità delle proteine o ridurre l'interazione del campione con il sistema cromatografico. La forza ionica della fase mobile può essere regolata, aumentando o abbassando la forza, per ottimizzare la separazione. Anche il pH può essere aggiustato, di solito di ± 0,2 unità. Se è necessaria un'ulteriore ottimizzazione, l'intervallo può essere ampliato verso l'alto o verso il basso. Si può anche programmare una variazione di temperatura o l'aggiunta di un solvente organico.

Per i protocolli che richiedono modificatori, i tamponi tipici sono:

Cloruro di sodio 100-150 mM in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0
Solfato di sodio 100-150 mM in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0
Urea 50-100 mM in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0. Si possono usare anche altri sali di natura simile (es. KCl) o il cloruro di guanidinio.

Intervallo di pH: 2,0 - 8,5

Possibili aggiunte di solventi organici includono:

Etanolo 5-10% (o altri solventi simili, come metanolo e acetonitrile) in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0, DMSO al 5% in fosfato di sodio 50 mM, pH 7,0. Notare che quando si usano fasi mobili a elevata

viscosità potrebbe essere necessario ridurre il flusso per mantenere il sistema al di sotto della pressione massima operativa.

Temperatura:

Tipicamente, le separazioni SEC sono effettuate a 10-30 °C. La separazione di proteine e peptidi può richiedere temperature più elevate per migliorare la risoluzione e il recupero delle proteine e dei peptidi idrofobici. La SEC può essere effettuata in camera fredda, per mantenere la massima attività biologica di proteine sensibili alla temperatura.

La temperatura operativa massima delle colonne Agilent Bio SEC è 80 °C. Notare che temperature più elevate possono denaturare le proteine.

CONSIDERAZIONI SULLA STRUMENTAZIONE PER SEC

Il meccanismo della separazione SEC fa sì che il volume d'eluizione, o il tempo di ritenzione, sia assolutamente critico per l'analisi. Questa richiede una strumentazione ad alte prestazioni, per garantire precisione e riproducibilità, che le pompe isocratiche o le pompe a gradiente adoperate in modalità isocratica possono assicurare, accoppiate a rivelatori a indice di rifrazione (RI), così come i più convenzionali rivelatori UV o DAD. Per garantire la stabilità della linea di base, specialmente quando si usa un rivelatore a indice di rifrazione, si raccomanda vivamente il degassaggio in linea della fase mobile e l'impiego di comparti colonne termostatati. Il funzionamento a temperature elevate aumenta il coefficiente di diffusione, il che porta a una migliore risoluzione, a una maggiore riproducibilità e a una riduzione dello stress sulla colonna. Pertanto, i comparti termostatati sono essenziali per un sistema a prestazioni elevate.

Funzionamento costante e affidabile anche in condizioni separative estreme

Tamponi con elevate concentrazioni di sali come NaCl 2 M o urea 8 M e valori di pH estremi tra 1 e 13 vengono comunemente utilizzati nell'analisi delle biomolecole, e pongono una sfida significativa per gli strumenti LC. Il design dedicato del sistema LC quaternario Bio-Inert serie 1260 Infinity gestisce queste difficili condizioni con facilità. Il sistema di erogazione del solvente in titanio, resistente alla corrosione, e i materiali privi di metalli nel percorso del campione, creano uno strumento estremamente robusto che protegge non solo il tuo campione, ma anche il tuo investimento. Anche il rivelatore è progettato per la separazione di biomolecole e non condiziona l'analisi delle proteine, la forma dei picchi e il recupero degli analiti.

Proteggi le tue proteine durante l'analisi

Il calore può denaturare le proteine, quindi è importante che i campioni siano mantenuti a temperatura costante lungo tutto il percorso del flusso LC. L'autocampionatore Agilent Bio-Inert con loop di campionamento inerte e ago di ceramica può essere refrigerato con un termostato aggiuntivo. Gli scambiatori di calore Bio-Inert per il comparto colonna termostatato mantengono la temperatura costante. Agilent offre una serie di celle a flusso Bio-Inert che permettono un'analisi affidabile delle proteine in diverse condizioni. Per maggiori informazioni sulle opzioni per le celle a flusso, vai su www.agilent.com/chem/bioflowcells.



Sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity



Cella a flusso Bio-Inert con targhetta RFID, 10 mm, 13 µL (codice G5615-60022)

Soluzioni software con nuove informazioni

Quando si lavora con la cromatografia ad esclusione dimensionale, ci sono diverse opzioni di software di supporto:

- **Software per HPLC:** Il software Agilent OpenLAB CDS ChemStation ti aiuta ad acquisire, esaminare e organizzare i dati cromatografici e a realizzare analisi quantitative.
- **Software GPC/SEC:** Disponibile come parte del sistema Agilent GPC/SEC, fornisce maggiori informazioni sulla base del peso molecolare
- **Software Buffer Advisor:** Elimina alcune laboriose fasi di sviluppo del metodo, spesso soggette a errori (preparazione del tampone, aggiunta del tampone e ottimizzazione del pH), creando gradienti di sali e pH in maniera rapida e semplice



Caratterizzazione molecolare completa

La SEC può essere usata per determinare il peso molecolare medio di analiti polimerici, che comprendono molecole presenti in natura (polisaccaridi, amidi, etc.) e polimeri sintetici (polietilenglicole o polietilenoossido) (Figura 4).

Per le proteine e i campioni più complessi, inclusi i vaccini, si richiede spesso un tipo di analisi dei dati più sofisticato, con software dedicati. Se questi sono usati in combinazione con rivelatori appropriati, è possibile ottenere informazioni importanti sulla struttura del campione. Consultare pagina 17 per maggiori informazioni sulla gamma di rivelatori.

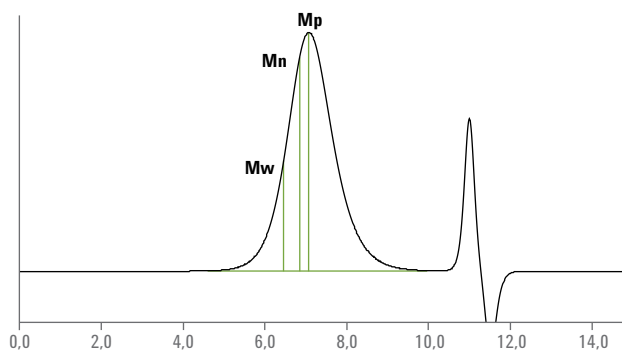
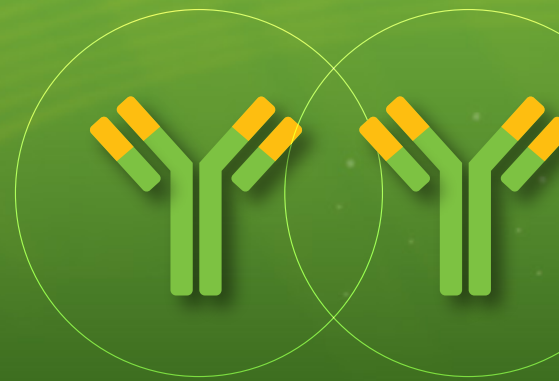


Figura 4: Separazione SEC di polisaccaride con indicazione di Mw, Mn e Mp.

FASI DELLA CARATTERIZZAZIONE AD ESCLUSIONE DIMENSIONALE



Preparazione del campione

La preparazione del campione per la cromatografia ad esclusione dimensionale è simile a quella di qualsiasi analisi proteica per metodi HPLC. L'aspetto più importante è la solubilità del campione nell'eluente; il campione dovrebbe essere disciolto direttamente nella fase mobile. A causa delle maggiori dimensioni delle colonne e della bassa velocità lineare dovuta a un flusso relativamente lento rispetto ad altri tipi di HPLC (vedere "Dimensioni delle colonne" più avanti), potrebbe essere necessario usare delle concentrazioni e dei volumi di iniezione maggiori del normale. Per proteggere la colonna da possibili danni, si raccomanda di filtrare o centrifugare il campione prima dell'uso per rimuovere il particolato. Tuttavia, la filtrazione non dovrebbe essere utilizzata per ovviare alla scarsa solubilità del campione: potrebbe essere necessario trovare un eluente alternativo.

Per una efficace preparazione del campione, è importante anche assicurarsi che le procedure usate per dissolvere il campione non alterino le proprietà del campione stesso. Alcune proteine possono aggregarsi (formando dimeri e multimeri di peso molecolare superiore) o dissociarsi (formando subunità di peso molecolare inferiore) in condizioni di stress. Queste possono includere cicli di congelamento-scongelo, temperature estreme, sonicazione e perfino concentrazione. Consultare la guida allo sviluppo dei metodi a pagina 5 per maggiori informazioni.

Filtri Captiva a basso assorbimento di proteine

Indipendentemente da quale preparazione del campione si sta effettuando, è consigliabile filtrare il campione con un filtro a basso assorbimento di proteine.

I filtri in PES di Agilent presentano un profilo costante e superiore di basso assorbimento delle proteine per filtrazioni di campioni per analisi di proteine. Le membrane di filtrazione in PES sono un'opzione migliore delle membrane in PVDF per la maggior parte delle analisi LC. I filtri in PES di Agilent hanno una compatibilità per i comuni solventi LC simile a quella dei filtri in PVDF e sono superiori in termini di assorbimento e purificazione delle proteine. Per maggiori informazioni, vai su www.agilent.com/chem/filtration



Filtri in PES Captiva

Diametro (mm)	Dimensione dei pori (µm)	Certificazione	Involucro	Codice
4	0,45	LC	Polipropilene	5190-5095
4	0,2	LC/MS	Polipropilene	5190-5094
15	0,2	LC/MS	Polipropilene	5190-5096
15	0,45	LC	Polipropilene	5190-5097
25	0,2	LC/MS	Polipropilene	5190-5098
25	0,45	LC	Polipropilene	5190-5099

Selezione della colonna

Dimensioni della colonna

Le colonne per SEC in genere hanno dimensioni nettamente superiori rispetto alle colonne impiegate in altri tipi di cromatografia e operano a velocità di flusso relativamente basse o a ridotte velocità lineari. Le colonne per SEC hanno dimensioni standard di 7,8 x 300 mm e sono utilizzate a 1,0 mL/min, mentre una colonna a fase inversa solitamente misura 2,1 o 4,6 x 150 mm ed è utilizzata a velocità lineari 2-3 volte maggiori. Questo non è dovuto alle dimensioni della colonna, ma al meccanismo della SEC.

Con la SEC, non c'è l'aumento della concentrazione dei campioni che si osserva tipicamente in altre tecniche cromatografiche, a causa dell'assorbimento o dell'interazione con la fase stazionaria. Pertanto, i campioni analizzati tramite SEC sono iniettati in volumi molto più ampi (5-20 µL), spesso a concentrazioni elevate (1-4 mg/mL). Il tempo di analisi è tipicamente di 10-12 minuti per colonna (considerando una colonna convenzionale di 7,8 x 300 mm, utilizzata a 1,0 mL/min) e i picchi solitamente sono ampi, quindi non è richiesta una elevata velocità di raccolta dei dati. Per il confronto o la quantificazione dell'aggregazione proteica si usa un software per HPLC. Per ottenere informazioni sulla distribuzione del peso molecolare dei polimeri polidispersi, si usa uno specifico software per SEC.

Comprendere le proprietà della colonna prescelta attraverso l'uso di una regolare calibrazione è di fondamentale importanza. Includendo una molecola sufficientemente grande – troppo grande per riuscire a permeare uno dei pori – dovrebbe essere possibile determinare il limite di esclusione per la colonna. Analogamente, usando una molecola molto piccola – abbastanza piccola da permeare tutti i pori della struttura – è possibile determinare il limite di permeazione totale della colonna. Quindi, bisogna accertarsi che la separazione che si sta tentando avvenga entro questi due limiti. Se il cromatogramma del campione include materiali esclusi o materiali che vengono eluiti al punto di permeazione totale, ciò potrebbe indicare la necessità di utilizzare per l'analisi una colonna con pori di dimensioni diverse.



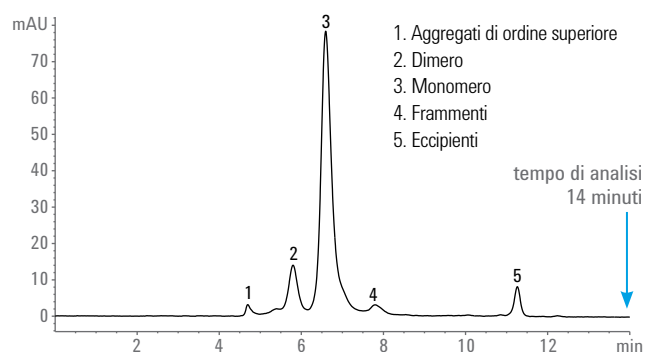
Eseguire analisi più veloci con colonne più corte

Solitamente, è necessario usare colonne di 300 mm di lunghezza per ottenere il grado di risoluzione richiesto per l'analisi. Tuttavia, per migliorare la rapidità della separazione, si può prendere in considerazione l'utilizzo di colonne più corte. Usando una colonna di 150 mm di lunghezza, la separazione può essere completata nella metà del tempo. Tuttavia, la risoluzione sarà inferiore. Quando è richiesta una elevata produttività, le colonne più corte possono essere utilizzate a flussi più elevati senza che si corra il rischio di raggiungere i limiti di contropressione, ottenendo una ulteriore riduzione del tempo di analisi. Vedere Figura 5.

Colonna: AdvanceBio 7,8 x 300 mm

Flusso: 1,0 mL/min

Campione: IgG policlonali



Colonna: AdvanceBio 7,8 x 150 mm

Flusso: 2,0 mL/min

Campione: IgG policlonali

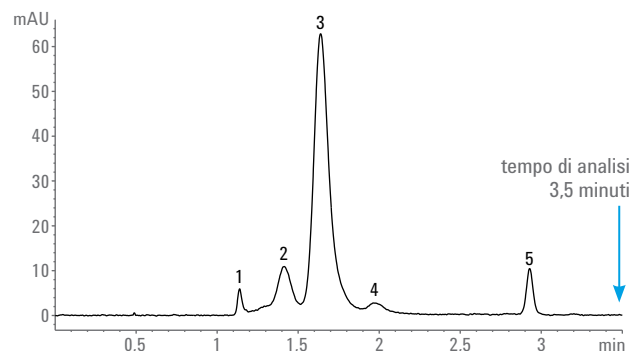


Figura 5: Confronto di analisi eseguite con colonne da 300 mm e colonne da 150 mm, per dimostrare il risparmio di tempo.

Scelta della fase stazionaria della colonna

Scegli una colonna a esclusione dimensionale adatta al tipo e alle dimensioni della molecola da analizzare dopo aver determinato la solubilità del campione e la fase mobile (acqua, soluzione tampone o solvente organico) della tua separazione. Le colonne impaccate con sorbenti a base polimerica vengono spesso utilizzate per l'analisi di molecole polimeriche con un'ampia distribuzione del peso molecolare quali eparina, amido o cellulosa. Le proteine e le molecole che hanno un peso molecolare definito sono più adatte a fasi stazionarie a base di silice (Tabella 1).

È importante ricordare che le proteine contengono numerosi aminoacidi con catene laterali contenenti diversi gruppi funzionali: acidi, basici, idrofobici e neutri/idrofili. Per prevenire interazioni con le colonne in silice, sono necessari dei tamponi nella fase mobile.

Agilent suggerisce il giusto intervallo di peso molecolare per le sue colonne: bisognerebbe scegliere la colonna in modo da utilizzarla nella fascia centrale del suo intervallo di funzionamento.

Cromatografia a esclusione dimensionale (SEC)

Applicazione	Colonne Agilent	Note
Proteine		
Analisi SEC-UV/DAD o LS di anticorpi monoclonali, proteine e peptidi	Agilent AdvanceBio SEC	La più recente e innovativa tecnologia, che garantisce risoluzione per evitare il riprocessamento dei campioni e rapidità per ridurre il tempo di analisi, migliorando la produttività del laboratorio
Analisi SEC-MS di anticorpi monoclonali, proteine e peptidi	Agilent Bio SEC-3	Fornisce linee di base stabili con rivelazione MS
Grandi biomolecole e campioni con componenti a peso multiplo	Agilent Bio SEC-5	Più scelta nella dimensione dei pori (100 Å, 150 Å, 300 Å, 500 Å, 1.000 Å e 2.000 Å) per coprire un ampio spettro di analiti
Proteine globulari, anticorpi	ProSEC 300S	Opzione a colonna singola per l'analisi di proteine in elevate condizioni saline
Proteine, proteine globulari	ZORBAX GF-250/450	Prodotti precedenti che andrebbero utilizzati qualora i protocolli richiedano ancora l'uso della specifica USP L35
Analiti idrosolubili		
Polimeri e oligomeri a basso PM, oligosaccaridi, PEG, ligninsolfonati	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 analitica PL aquagel-OH ha un intervallo pH di 2-10, compatibilità con solventi organici (fino al 50% di metanolo), stabilità meccanica fino a 140 bar (2.030 psi) e basse pressioni operative delle colonne
Polisaccaridi, derivati della cellulosa, biopolimeri polidispersi	2 o 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8 µm ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8 µm	
Polimeri ad altissimo PM, acidi ialuronici, amidi, gomme	PL aquagel-OH 60/50/40 15 µm in serie	

Tabella 1: Selezione delle colonne in base all'applicazione e alle dimensioni delle molecole da analizzare.



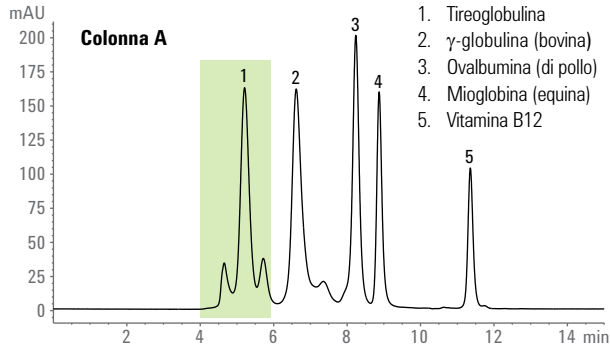
Colonne Agilent Bio SEC per la separazione di biomolecole, inclusa l'aggregazione di proteine, e colonne Agilent GPC per l'analisi di polimeri naturali, come la determinazione del peso molecolare dei polisaccaridi.

Dimensione dei pori

Le proteine sono relativamente piccole e compatte rispetto ad altri biopolimeri, quindi una dimensione dei pori di 300 Å è una buona scelta per la selezione iniziale della colonna. La Figura 6 confronta la risoluzione di una miscela standard di riferimento contenente cinque proteine e di un campione di IgG policlonale su colonne

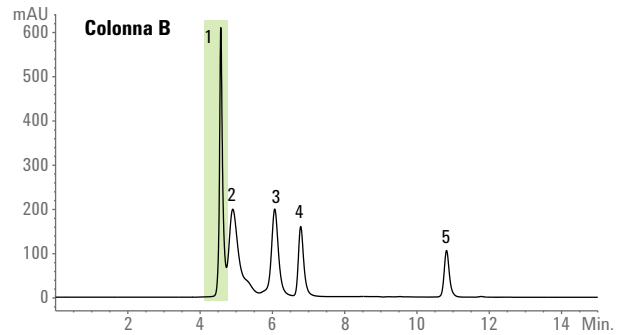
con diverse dimensioni dei pori, mostrando chiaramente l'effetto della dimensione dei pori sulla risoluzione. Con pori di 300 Å, la proteina più grande (tireoglobulina) e il dimero di IgG sono risolti, ma con il diminuire della dimensione dei pori, le proteine più grandi sono escluse e non c'è separazione.

Miscela di standard per filtrazione su gel BioRad



Colonna A: AdvanceBio SEC 300 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 µm (codice PL1580-5301)

Colonna B: AdvanceBio SEC 130 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 µm (codice PL1580-5350)



Strumento: Sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity

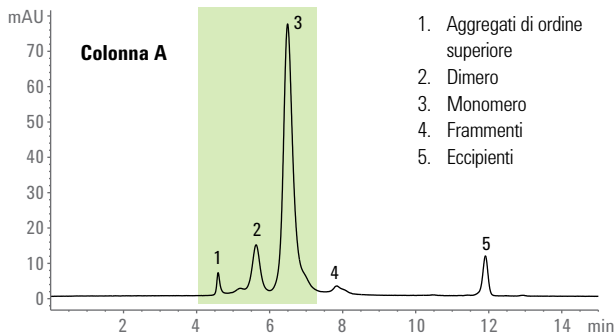
Fase mobile: Tampone fosfato 150 mM, pH 7,0

Flusso: 0,35 mL/min

Rivelatore: UV, 220 nm

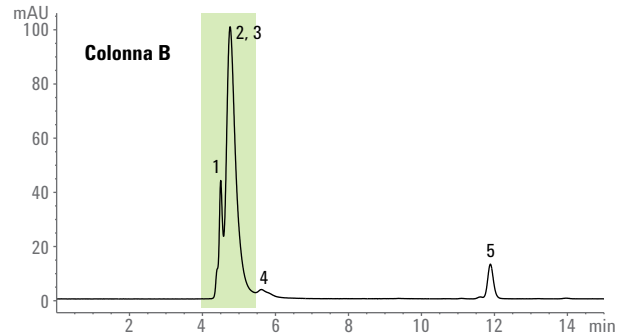
Campione: Miscela di standard per filtrazione su gel BioRad

Separazione di IgG policlonali



Colonna A: AdvanceBio SEC 300 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 µm (codice PL1580-5301)

Colonna B: AdvanceBio SEC 130 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 µm (codice PL1580-5350)



Strumento: Sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity

Fase mobile: Tampone fosfato 150 mM, pH 7,0

Flusso: 0,35 mL/min

Rivelatore: UV, 220 nm

Campione: IgG policlonali

Figura 6: Confronto della risoluzione di standard per filtrazione su gel BioRad e di IgG policlonali per diverse dimensioni dei pori. L'area evidenziata in verde mostra la differenza di risoluzione tra le due dimensioni dei pori. Per l'analisi delle proteine più grandi è necessario utilizzare i pori di dimensione maggiore.

Valutare gli intervalli di permeazione SEC

Con le proteine, è importante capire che il meccanismo della SEC funziona separando i soluti in base alle loro dimensioni in soluzione e non in base al loro peso molecolare. Questo è evidente quando si confrontano i diagrammi di calibrazione di proteine/peptidi con le curve pullulano/polisaccaride e PEG/PEO, come illustrato nella Figura 7. I calibranti pullulano/polisaccaride e PEG/PEO producono curve di calibrazione piuttosto simili, ma la curva proteina/peptide è spostata e ha una conformazione differente.

Le proteine sono composte da complesse catene polipeptidiche che formano strutture tridimensionali. Queste strutture sono influenzate dalle caratteristiche dell'ambiente al quale sono esposte, come il pH o la forza ionica. Le catene assumeranno la conformazione più adatta, quindi la loro struttura e le loro dimensioni possono variare.

Per avere una conferma che il tempo di eluizione è dovuto alle dimensioni piuttosto che al peso molecolare, basta considerare i tempi di ritenzione di calibranti con un peso molecolare di circa 50.000, che differiscono significativamente (Figure 8). Il PEG è eluito appena dopo i 7 minuti, il polisaccaride viene eluito poco dopo i 7,5 minuti, ma la proteina è eluita a circa 9,5 minuti.

Questo dimostra chiaramente che il meccanismo della separazione SEC si basa sulle reali dimensioni e non sul peso molecolare. Pertanto, quando si usano delle curve di calibrazione è importante specificare quali calibranti sono stati usati. Per esempio, si può affermare che il campione di interesse ha un peso molecolare pullulano/polisaccaride equivalente di 50.000. Consultare pagina 16 per i rivelatori avanzati che superano questo effetto relativo.

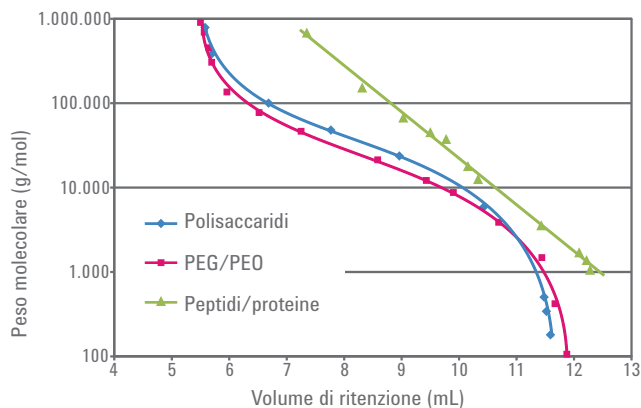


Figura 7: Confronto dei diagrammi di calibrazione generati per tre tipi di calibranti.

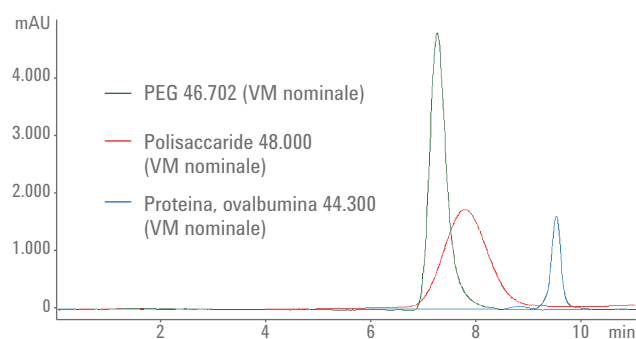


Figura 8: Sovrapposizione di cromatogrammi ottenuti per calibranti di peso molecolare simile.



Standard di calibrazione 130 Å AdvanceBio SEC (codice 5190-9416 Standard di calibrazione 130 Å AdvanceBio SEC, vial 2 mL)

Una miscela proteica comprendente 5 proteine accuratamente selezionate (ovalbumina, mioglobina, aprotinina, neurotensina, angiotensina II) progettata per calibrare le colonne a esclusione dimensionale 130 Å AdvanceBio di Agilent. Questo standard può essere usato regolarmente per calibrare la colonna e garantisce prestazioni del sistema ideali in varie applicazioni che comportano la purificazione e l'analisi di proteine.

Standard di calibrazione 300 Å AdvanceBio SEC (codice 5190-9417 Standard di calibrazione 300 Å AdvanceBio SEC, vial 2 mL)

Una miscela proteica comprendente 5 proteine accuratamente selezionate (tireoglobulina, γ -globulina, ovalbumina, mioglobina, angiotensina II) progettata per calibrare le colonne a esclusione dimensionale 300 Å AdvanceBio di Agilent. Questo standard può essere usato regolarmente per calibrare la colonna e garantisce prestazioni del sistema ideali in varie applicazioni che comportano la purificazione e l'analisi di proteine.



Dimensioni delle particelle

Anche le dimensioni delle particelle sono un fattore importante da considerare nella selezione della colonna. Particelle di dimensioni più piccole forniscono una separazione più efficiente, ma con il rischio di degradare (frammentare/deformare) la proteina. La Figura 9 mette a confronto le colonne Agilent Bio SEC-3 (3 µm) e Bio SEC-5 (5 µm). Il rischio di contropressione elevata e occlusione

delle colonne è più elevato se i campioni e gli eluenti non vengono preparati con attenzione. È consigliata la filtrazione per la rimozione del materiale insolubile e dei frammenti. Anche l'uso di una precolonna o di un filtro in linea può estendere la durata della colonna.

Confronto tra Agilent Bio SEC-3 e Agilent Bio SEC-5

Analisi di anticorpo monoclonale

Colonna: Bio SEC-3, 300 Å
7,8 x 300 mm, 3 µm
(codice 5190-2511)

Colonna: Bio SEC-5, 300 Å
7,8 x 300 mm, 5 µm
(codice 5190-2526)

Strumento: Sistema LC quaternario Bio-Inert
Agilent serie 1260 Infinity

Fase mobile: Fosfato di sodio 150 mM, pH 7

Flusso: 1 mL/min

Rivelatore: UV, 220 nm

Campione: Anticorpo monoclonale umanizzato

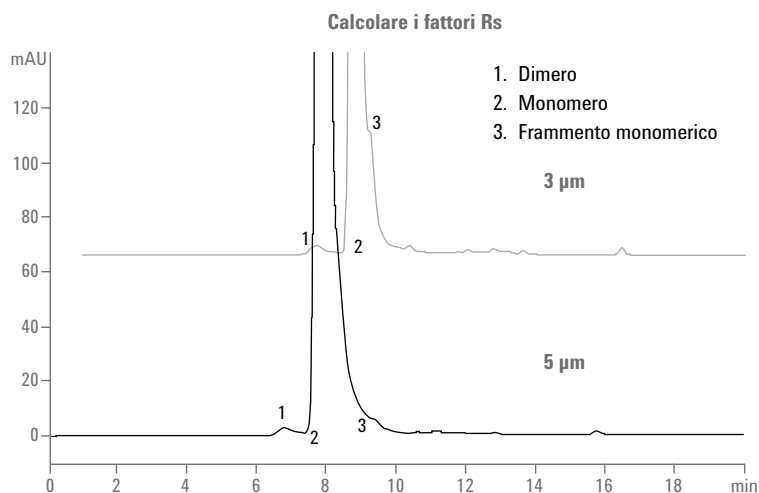


Figura 9: Confronto tra le colonne Agilent Bio SEC-3 e Agilent Bio SEC-5. La colonna da 3 µm permette una separazione migliore.

Diametro della colonna

Anche il diametro della colonna può essere importante, a seconda della quantità del campione. Se sono disponibili solo quantità limitate di materiale, le colonne con diametro interno di 4,6 mm (utilizzate a 0,35 mL/min) possono tornare utili. Ma quando si usano colonne con un piccolo diametro interno è importante ridurre al minimo i volumi del sistema, per prevenire un'eccessiva dispersione e la perdita di risoluzione.

Si ritiene che, quando vengono utilizzati eluenti acquosi, la SEC sia una tecnica non denaturante; quindi questa è estremamente utile per il frazionamento di campioni complessi o per l'isolamento di una componente del campione per analisi successive. Usare colonne di diametro più grande, come quelle da 21,2 mm che si ritrovano nella gamma di prodotti Agilent SEC-3 e SEC-5, significa avere la possibilità di eseguire separazioni preparative in laboratorio usando sistemi HPLC analitici.



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

Parametri del metodo

Flusso

Per alcune applicazioni la velocità di analisi è cruciale. Per ridurre il tempo di analisi si può usare una colonna più corta (150 mm invece dei convenzionali 300 mm), incrementare il flusso o adottare entrambi questi accorgimenti. Tuttavia, questo potrebbe avere un effetto deleterio sulla risoluzione, perché la SEC si basa sulla diffusione verso l'interno e l'esterno dei pori per creare percorsi di lunghezze differenti attraverso la colonna. Ciononostante, come illustrato nella Figura 10, è possibile ottenere una risoluzione sufficiente a quantificare un dimero e un monomero IgG in meno di 4 minuti, usando una colonna da 150 mm a un flusso di 2 mL/min.

Colonna: AdvanceBio SEC 300 Å
7,8 x 150 mm, 2,7 µm
(codice PL1180-3301)

Eluente: Tampone fosfato 150 mM, pH 7,0

Flusso: 0,5, 1,0, 1,5 mL/min (52, 102, 152 bar)

Rivelatore: UV, 220 nm

Iniezione: 5 µL

Campione: IgG (2 mg/mL)

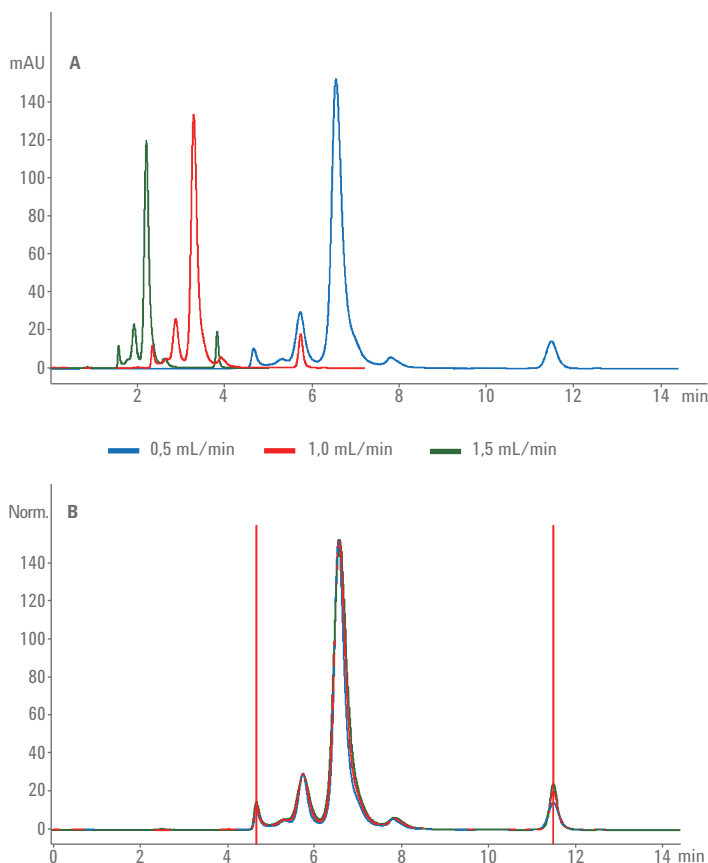


Figura 10: Aumentare il flusso riduce il tempo di analisi da 12 a 4 minuti (A). Quando i tempi di ritenzione vengono normalizzati e sovrapposti (B) risulta evidente che i tempi di ritenzione sono costanti e che la perdita di risoluzione è minima.

Risoluzione dei problemi del tuo metodo SEC

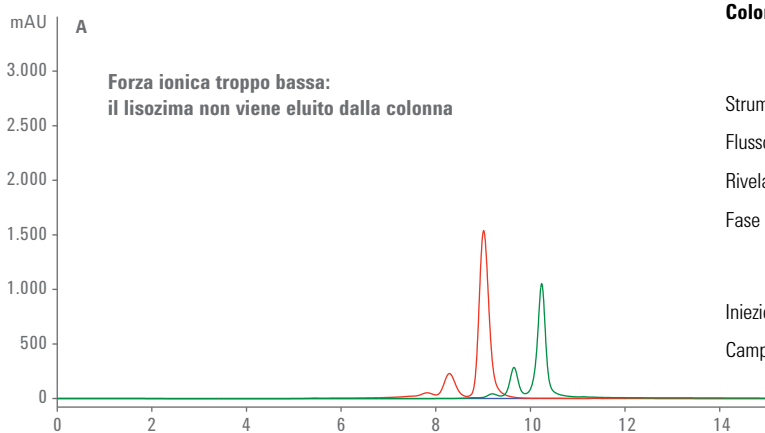
Problema	Causa	Soluzione
Recupero degli analiti inferiore alle attese o allargamento dei picchi	Analiti idrofobi	Aggiungere una piccola quantità (10-20%) di modificatore organico (acetonitrile o metanolo) alla fase mobile
Picchi che appaiono quando non dovrebbero, sulla base del peso molecolare, o scodamento dei picchi	Interazioni ioniche o proteine basiche	Aumentare la forza ionica-concentrazione salina a intervalli di 50-100 mM; aggiungere tampone fosfato
Forma dei picchi non ottimale	Assorbimento non specifico	Aumentare la concentrazione salina o provare un sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity
Ritenzione/risoluzione degli analiti non ottimale	Dimensioni dei pori insufficienti per le dimensioni della molecola	Controllare la dimensione dei pori; consultare pagina 11 per maggiori informazioni

Selezione della fase mobile

Le interazioni secondarie possono causare difficoltà

Per evitare interazioni secondarie indesiderate, può essere necessario effettuare un'ottimizzazione del metodo. Queste interazioni possono portare a un'eluizione dell'analita più tardiva del previsto e potrebbero far supporre un peso molecolare inferiore. Lievi correzioni nella composizione della fase mobile (pH, forza ionica o modificatori

organici) possono aiutare ad aggirare queste difficoltà (Figura 11). Per ottenere la separazione desiderata potrebbe anche essere necessario affinare la scelta delle dimensioni dei pori, combinare in serie le colonne, ridurre il flusso o modificare la temperatura.



Colonna: Agilent Bio SEC-3, 300 Å
4,6 x 300 mm, 3 µm
(codice 5190-2513)

Strumento: Sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity

Flusso: 0,35 mL/min

Rivelatore: UV, 220 nm

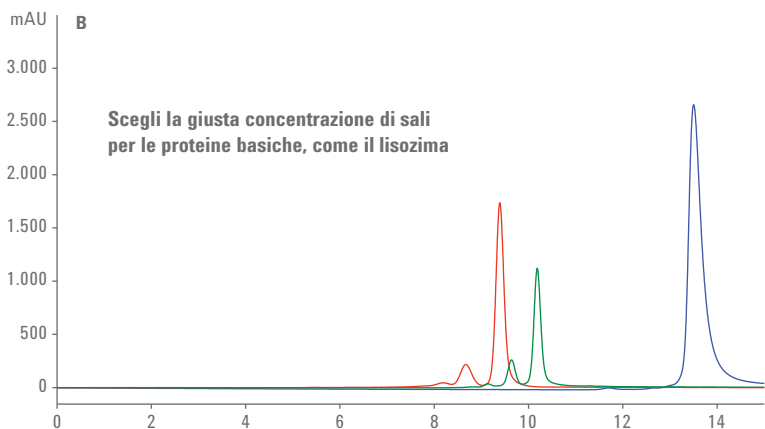
Fase mobile: A: Eluente tampone fosfato 20 mM, pH 7 + 50 mM NaCl

B: Eluente tampone fosfato 20 mM, pH 7 + 100 mM NaCl

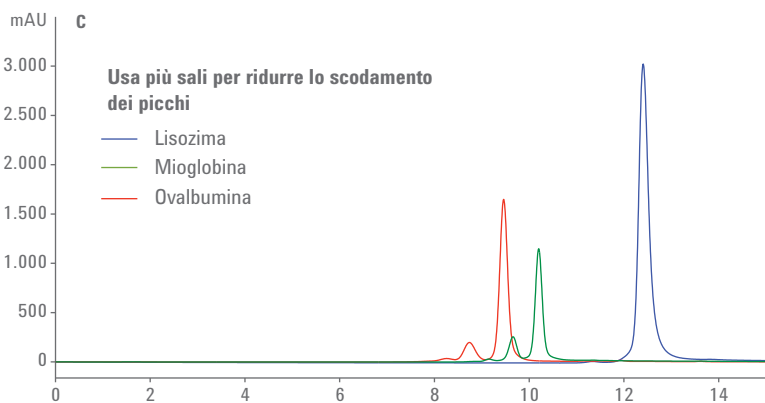
C: Eluente tampone fosfato 20 mM, pH 7 + 400 mM NaCl

Iniezione: 5 µL

Campione: Proteina (1 mg/mL in tampone fosfato 20 mM, pH 7)



NaCl 50 mM in soluzione tampone 20 mM



NaCl 400 mM in soluzione tampone 20 mM

Figura 11: Effetto di una forza ionica troppo alta o troppo bassa sulla ottimizzazione della separazione desiderata.

Calibrazione

Una volta che è stata scelta la colonna, sarà necessario costruire una calibrazione con standard di peso molecolare noto. Ogni volta che si cambia la colonna o si apportano delle modifiche alla fase mobile sarà necessario ripetere la calibrazione. La curva di calibrazione si ottiene rappresentando in un grafico il tempo di ritenzione in funzione del peso molecolare (Figura 12).

È particolarmente importante scegliere standard adeguati per la molecola di interesse. Per una separazione di proteine è opportuno usare standard di peso molecolare proteici. Per la separazione di polisaccaridi si dovrebbero usare standard di peso molecolare a base di pullulano.

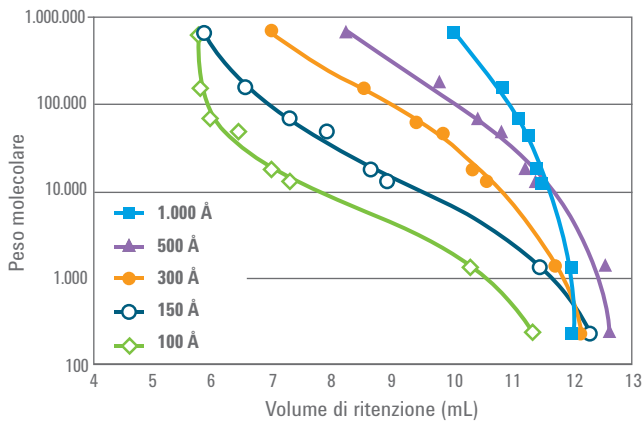
Colonna: Agilent Bio SEC-5
7,8 x 300 mm, 5 µm
(codice 5190-2521)

Strumento: Sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity

Fase mobile: Fosfato di sodio 150 mM, pH 7,0

Flusso: 1,0 mL/min

Rivelatore: UV



Proteine	PM	Volume di ritenzione				
		1.000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
Tireoglobulina	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
Ovalbumina	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
Ribonucleasi 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
Uracile	112	12,08	12,68	12,21	12,13	11,41

Figura 12: Curve di calibrazione ottenute rappresentando in un grafico il tempo di ritenzione in funzione del peso molecolare.

Gli standard dovrebbero essere disciolti nella fase mobile e ci si dovrebbe assicurare che il campione sia completamente disciolto. Se la soluzione appare torbida sarà necessario prendere ulteriori provvedimenti. Per rimuovere materiali insolubili prima dell'iniezione si dovrebbe procedere alla centrifugazione o alla filtrazione

del campione. Tuttavia, potrebbe essere necessario prendere in considerazione condizioni alternative della fase mobile che migliorino la solubilità del campione, poiché i processi fisici potrebbero alterare la valutazione del peso molecolare.



Tecniche avanzate di rivelazione

Altre considerazioni riguardo alla SEC comprendono la scelta del rivelatore. Per le separazioni di proteine si usano comunemente rivelatori UV o a serie di diodi (DAD).

I risultati migliori (cioè la sensibilità più alta) per peptidi e proteine si ottengono normalmente a 220 nm. Tuttavia alcune soluzioni tampone o modificatori organici possono avere un'assorbanza di fondo eccessiva a basse lunghezze d'onda; in questo caso, potrebbe essere necessario usare una rivelazione a 254 nm o 280 nm. Uno svantaggio della rivelazione UV è che alcune molecole non possiedono un cromoforo, ma poiché gli analiti vengono eluiti isocraticamente, è possibile usare in alternativa un rivelatore a indice di rifrazione.

L'aggiunta della rivelazione a dispersione avanzata aumenta significativamente le prestazioni della SEC. La rivelazione a dispersione statica determina masse molari accurate, indipendentemente dalle calibrazioni della colonna e da interazioni indesiderate, e viene integrata con la rivelazione a dispersione dinamica per studiare la dimensione delle molecole. La rivelazione a dispersione ha aumentato la sensibilità per le molecole di grandi dimensioni, rendendo possibile identificare l'aggregazione in quantità molto inferiori (Figura 13). È importante selezionare un rivelatore con un basso volume morto, per garantire che queste informazioni aggiuntive siano ottenute senza sacrificare le prestazioni cromatografiche.

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

Strumento: Sistema LC quaternario Bio-Inert
Agilent serie 1260 Infinity con rivelatore
multiplo GPC/SEC Agilent serie 1260
Infinity

Fase mobile: Fosfato di sodio 150 mM, pH 7,0

Flusso: 0,8 mL/min

Temperatura: 30 °C

Rivelatore: UV, 280 nm + RI + LS 90°

Iniezione: 5 µL

Campione: Anticorpo monoclonale degradato

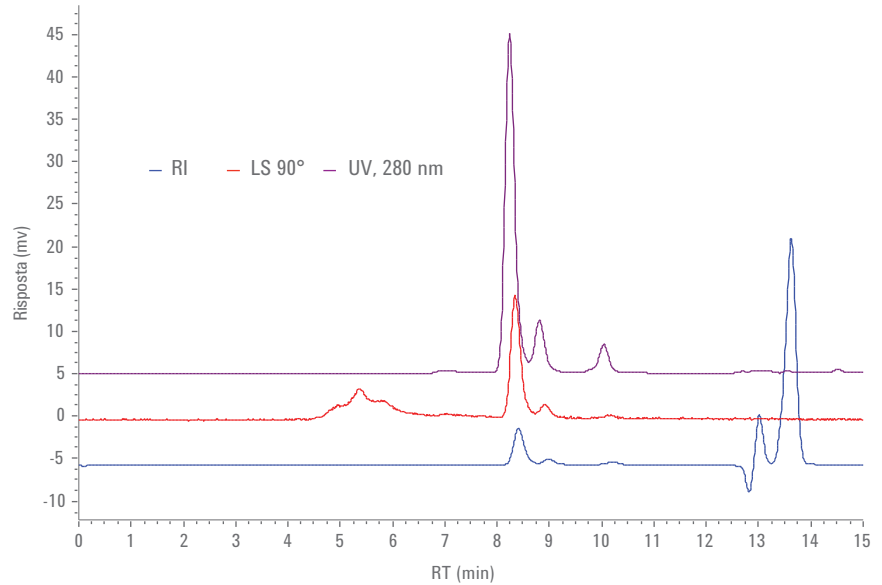
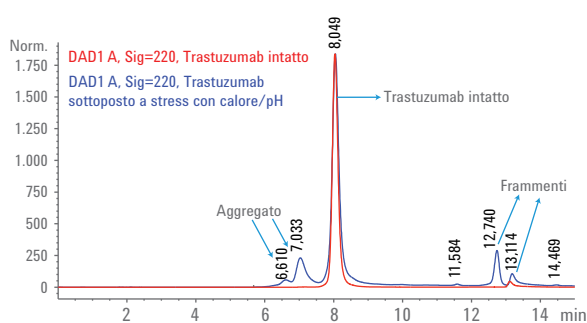


Figura 13: Risultati ottenuti utilizzando diversi rivelatori per una separazione proteica.

Proteine coniugate

Le proteine terapeutiche sono soggette ad aggregazione e degradazione durante tutte le fasi dello sviluppo, quali l'espressione, il refolding, il trattamento, la formulazione, sterilizzazione e conservazione. Nonostante siano presenti in concentrazioni estremamente basse, gli aggregati/composti di degradazione possono avere un grande impatto sulla qualità dei farmaci biologici, portando a perdita di attività, riduzione della solubilità e aumento dell'immunogenicità. La cromatografia ad esclusione dimensionale è il metodo standard usato per caratterizzare l'aggregazione proteica ed è anche un requisito per la richiesta e la concessione di approvazioni da parte delle autorità di regolamentazione.

Per migliorare la distribuzione, prolungare l'emivita e aumentare la potenza, le proteine, inclusi gli anticorpi monoclonali, possono essere coniugate. Polimeri idrosolubili, come il glicole polietilenico, vengono coniugati alla proteina per migliorare le attività farmacologiche, aumentare l'emivita nel circolo sanguigno e ridurre l'immunogenicità. Più di recente, l'attenzione si è concentrata sui coniugati farmaco-anticorpo (antibody drug conjugates, ADC), nei quali anticorpi monoclonali vengono coniugati a un agente citotossico per una distribuzione mirata del farmaco e una maggiore efficacia del trattamento. Dopo la coniugazione, sono richiesti gli stessi studi di aggregazione, poiché la variazione nelle caratteristiche del campione può presentare maggiori difficoltà per il raggiungimento di una separazione SEC. Per l'analisi dell'anticorpo e dell'ADC con impiego di fasi mobili acquose sono necessarie colonne che presentino un legame non specifico con proteine molto basso, come le AdvanceBio SEC. Vedere Figura 14.

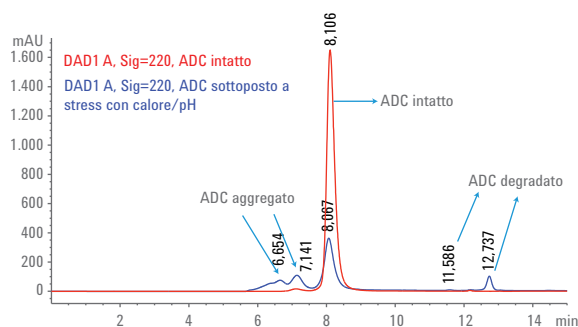


Colonna: AdvanceBio SEC 300 Å
7,8 x 300 mm, 2,7 µm

Strumento: Sistema LC quaternario Bio-Inert Agilent serie 1260 Infinity

Fase mobile: PBS, fosfato di sodio 50 mM contenente cloruro di sodio 150 mM, pH 7,4

Temperatura TCC: Ambiente



Volume di iniezione: 10 µL

Flusso: 0,8 mL/min

Rivelatore: UV, 220 nm

Figura 14: La stessa fase mobile acquosa è stata usata per l'anticorpo monoclonale e per l'ADC, più idrofobico.

Trova la tua strada per ottenere risultati ottimali

www.agilent.com/chem/navigator

Il NAVIGATOR per colonne LC e preparazione dei campioni di Agilent presenta una vasta gamma di colonne Bio e colonne per piccole molecole, e ti aiuterà a scegliere la colonna giusta per la tua applicazione.

Il NAVIGATOR presenta quattro semplici opzioni di ricerca:

- Per codice, con riferimenti incrociati con le colonne per LC e i prodotti per la preparazione del campione, per trovare i migliori prodotti di consumo Agilent



- Per composto, tramite l'elenco a discesa
- Per metodo USP
- Per colonna, con raccomandazioni basate sul metodo

Preparazione del campione

- I campioni dovrebbero essere disciolti nella fase mobile
- Se il campione è torbido, potrebbe essere necessario modificare la composizione della fase mobile
- Per chiarificare i campioni, li si può sottoporre a filtrazione o centrifugazione, ma questi processi potrebbero alterare la composizione del peso molecolare del campione
- Per dissolvere un campione si usano a volte un blando riscaldamento, l'agitazione in vortex o la sonicazione, ma questi trattamenti devono essere impiegati con cautela, perché possono alterare la valutazione del peso molecolare
- Bisogna anche assicurarsi che il campione non si alteri durante la conservazione
- I campioni andrebbero preparati al momento e analizzati il prima possibile
- Una crescita batterica può svilupparsi rapidamente nelle soluzioni tampone
- Anche i campioni preparati a concentrazioni elevate possono alterarsi con il passare del tempo, portando ad aggregazione o addirittura precipitazione



Selezione della colonna

- Per garantire l'integrità del campione, la SEC si esegue lentamente, su lunghe colonne
- La lunghezza delle colonne è tipicamente di 250 o 300 mm
- Il normale flusso è di 1,0 mL/min su una colonna con diametro interno di 7,5 o 7,8 mm e di 0,35 mL/min su una colonna con diametro interno di 4,6 mm
- Spesso le analisi vengono effettuate su colonne in serie, per aumentare la risoluzione nelle applicazioni per biopolimeri
- Per aumentare la risoluzione nelle applicazioni per proteine si usano particelle di dimensioni minori
- Impiegare per le separazioni colonne da 150 mm con particelle di dimensioni minori può ridurre il tempo di analisi

Sceita della fase stazionaria della colonna

- Non dovrebbero esserci interazioni non specifiche tra gli analiti e la fase della colonna
- I sorbenti a base di silice sono usati per l'analisi di peptidi e proteine
- I sorbenti a base di polimero sono adatti all'analisi di biopolimeri



Parametri della colonna

- **Dimensioni dei pori:** dipendono dall'intervallo di peso molecolare del campione per evitare l'esclusione di componenti del campione e ottimizzare il volume nella regione di separazione richiesta
- **Dimensioni delle particelle:** usare particelle più piccole per una maggiore risoluzione (ma con contropressione più elevata)
- **Lunghezza della colonna:** compromesso tra risoluzione e tempo di analisi
- **Diametro interno della colonna:** usare colonne più piccole per ridurre il consumo di solvente e il volume di iniezione

Fase mobile

- La fase mobile dovrebbe contenere tamponi/sali per evitare le interazioni ioniche, ma un eccesso potrebbe portare a interazioni idrofobiche
- Non alterare l'analita per evitare degradazione/aggregazione, ecc.
- Preparare la fase mobile al momento e usarla rapidamente, perché la crescita batterica è rapida nelle soluzioni tampone diluite conservate a temperatura ambiente
- La durata delle soluzioni tampone è inferiore a 7 giorni, a meno che non vengano refrigerate
- Filtrare prima dell'uso per rimuovere il particolato nell'acqua (meno probabile) o nei sali tampone (più probabile)
- Quando si usano colonne in silice, i tamponi fosfato a pH elevato (soprattutto a temperature elevate) possono ridurre significativamente la durata della colonna

Per maggiori informazioni sulle colonne Bio per SEC Agilent, vai su www.agilent.com/chem/bioHPLC

Al tuo fianco per raggiungere grandi risultati

Sfide sempre più impegnative richiedono risposte migliori. Le nostre soluzioni consentono agli operatori nel campo della biofarmaceutica di proporre innovazioni nella ricerca sulle malattie, accelerare lo sviluppo di farmaci e migliorare l'affidabilità dei processi di sviluppo e produzione.

Per maggiori informazioni sulle soluzioni di Agilent per il settore biofarmaceutico, vai su

www.agilent.com/chem/togetherbiopharma

Per maggiori informazioni

www.agilent.com/chem/BioHPLC

Per trovare un centro assistenza
clienti Agilent locale nel tuo paese

www.agilent.com/chem/contactus

Italia

numero verde 800 012 575

customercare_italy@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Solo per scopi di ricerca. Le informazioni, descrizioni e specifiche fornite possono variare senza preavviso. Agilent Technologies non è responsabile di eventuali errori contenuti nel presente documento o di danni incidentali o consequenziali collegati alla fornitura, all'applicazione o all'utilizzo del presente documento.

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Stampato negli Stati Uniti, 1 novembre 2015

5991-3651ITE



Agilent Technologies