

Guide pratique d'Agilent pour

LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE POUR L'ANALYSE DE BIOMOLÉCULES

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

LE GUIDE POUR UNE CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE RÉUSSIE

La séparation chromatographique de biomolécules basée sur leur taille en solution est connue sous le nom de chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Contrairement à d'autres modes de chromatographie, elle repose sur l'absence de toute interaction entre l'analyte et la phase stationnaire de la colonne. C'est une solution idéale pour la séparation et l'analyse de protéines intactes de contaminants pouvant inclure des agrégats, des excipients, des débris cellulaires et d'autres impuretés résultant de la dégradation. La SEC est donc largement utilisée à la fois dans le développement et dans la production pour la caractérisation de molécules de biothérapie.

Dans ce guide, nous discuterons notamment des séparations SEC, de l'effet de la taille des solutés et de la masse moléculaire, des choix de colonne, des considérations importantes liées à la phase mobile et des règles générales pour l'utilisation de la SEC.



UNE SÉPARATION SIMPLE ET FACILE

Avec la SEC, les molécules sont séparées de la plus grande à la plus petite en fonction de leur taille moléculaire en solution. Les molécules de très grande taille sont exclues du garnissage et éluent en premier, dans le volume mort. Les molécules de plus petite taille pénètrent dans les pores à des degrés divers en fonction de leur taille (figure 1), les molécules les plus petites diffusant le plus en profondeur dans la structure des pores et éluant en dernier.

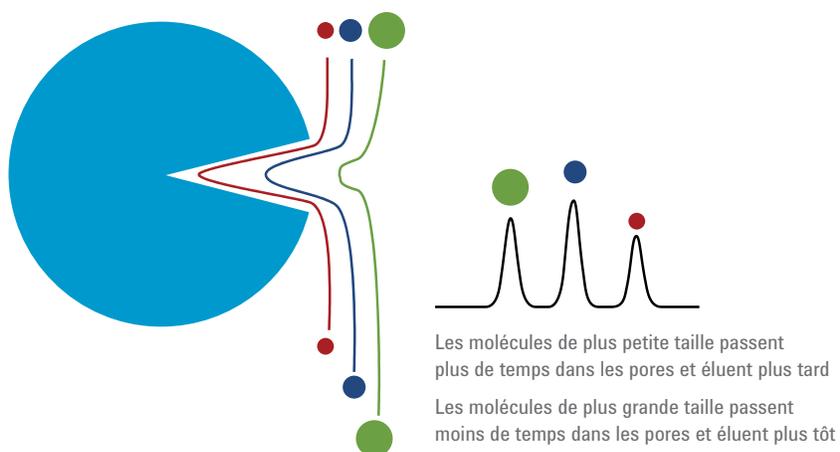
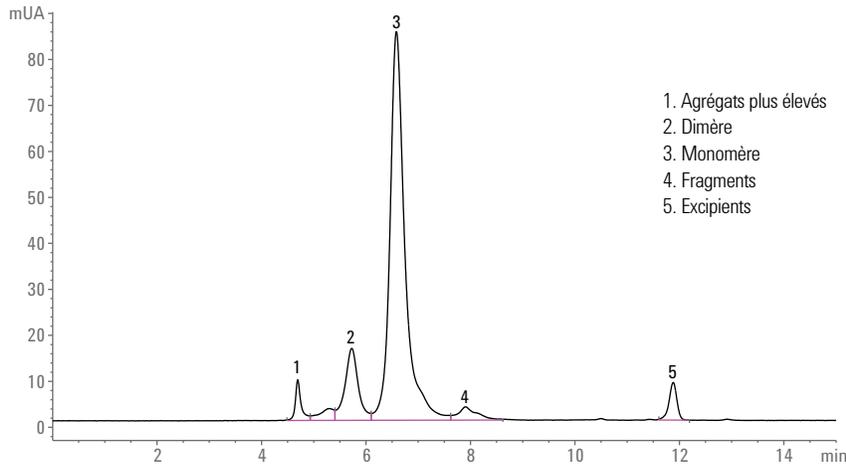


Figure 1 : les molécules pénètrent dans les pores de la phase stationnaire à différents degrés en fonction de leur taille.

En savoir plus sur les biocolonnes d'Agilent pour la SEC sur www.agilent.com/chem/bioHPLC

La SEC est appropriée pour séparer et quantifier des mélanges de protéines, il s'agit donc d'une technique précieuse pour le contrôle qualité dans la fabrication de protéines recombinantes. Cela comprend la mesure des agrégats (dimères, trimères, tétramères, etc.) ou la séparation des excipients et des impuretés de faible masse moléculaire des protéines de masse moléculaire plus élevée (figure 2).

Il est essentiel de comprendre et de contrôler l'agrégation des protéines thérapeutiques, car celle-ci aura une incidence sur l'efficacité et la durée de vie, et pourrait même entraîner une réponse immunogénique potentiellement grave. Les réglementations, par exemple ICH (Q6B), stipulent clairement que les agrégats doivent être séparés du produit souhaité et quantifiés.



Séparation des monomères et dimères d'IgG intacts

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

Instrument : système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

Débit : 1,0 mL/min

Température : ambiante

Détecteur : UV, 220 nm

Injection : 5 µL

Échantillon : IgG polyclonal

Phase mobile : tampon de phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0

Figure 2 : séparation des agrégats et des excipients d'IgG.

L'ordre d'élution suit généralement la masse moléculaire. Les molécules dont la masse moléculaire est la plus élevée éluent en premier. Cependant, le véritable mécanisme de la SEC est basé sur la taille en solution. La plupart des protéines sont compactes, mais certaines molécules protéiques sont cylindriques, elles peuvent donc éluer plus tôt que prévu en raison de leur rayon hydrodynamique supérieur en solution (figure 3). En outre, différentes phases mobiles peuvent modifier l'ordre d'élution en raison des changements de taille en solution (rayon hydrodynamique ou rayon de giration).

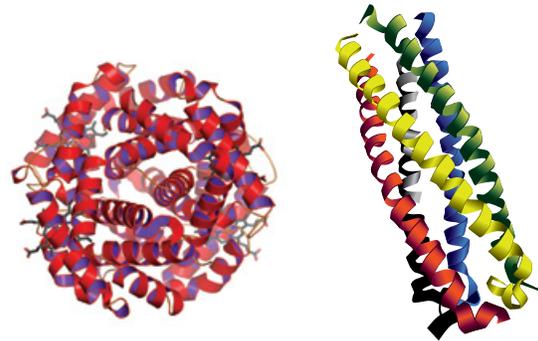


Figure 3 : comparaison de la protéine globulaire compacte par rapport à la protéine cylindrique.

Guide de développement de méthodes SEC-UV/DAD

Choisir des conditions et des colonnes initiales pour la séparation des biomolécules en fonction de leur taille, l'analyse des agrégations, des peptides, des polypeptides et des protéines

Peptides, polypeptides, protéines, anticorps monoclonaux
MM > 0,1 à 1 250 kDa

Peptides, polypeptides, protéines, anticorps monoclonaux
MM > 0,1 à 10 000 kDa

Sélectionner une colonne selon la plage de masses moléculaires et le diamètre des pores

AdvanceBio SEC (2,7 µm)

Diamètre de pore	Plage de MM (kDa)
130 Å	0,1-100
300 Å	5-1 250

Agilent Bio SEC-5 (5 µm)

Diamètre de pore	Plage de MM (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

Conditions initiales recommandées des séparations

Colonne : AdvanceBio SEC ou Agilent Bio SEC-5
Phase mobile : tampon de phosphate 150 mM, pH 7,0*
Gradient : isocratique dans la plage 10 à 30 min
Température : recommandée : 10-30 °C, Maximum : 80 °C

Débit : 0,1 à 0,4 mL/min pour un d.i. de colonnes de 4,6 mm
0,1 à 1,25 mL/min pour un d.i. de colonnes de 7,8 mm

Taille échantillon : ≤ 5 % du volume total de la colonne

*D'autres tampons aqueux à taux de sel élevé ou bas peuvent être utilisés

Pour des informations supplémentaires, consultez la note d'application (en anglais) : *Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins* (publication no. 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/library

Après le chromatogramme initial, des changements supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour améliorer la séparation, maintenir la solubilité des protéines, ou encore diminuer l'interaction de l'échantillon avec le support chromatographique. La force ionique de la phase mobile peut être augmentée ou réduite pour atteindre une séparation optimisée. Le pH peut également être ajusté, en général par unités de ± 0,2. Si une optimisation supplémentaire est requise, la plage vers le haut ou vers le bas doit être étendue. Un changement de température ou l'ajout d'un solvant organique peuvent aussi être envisagés.

Pour les protocoles qui requièrent un ajout de sel, ces tampons sont courants :

Chlorure de sodium 100 à 150 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0
Sulfate de sodium 100 à 150 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0
Urée 50 à 100 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0.
D'autres sels similaires (p. ex. KCl) et du chlorhydrate de guanidine peuvent également être utilisés.

Plage de pH : 2,0-8,5

Les solvants organiques qui peuvent être ajoutés sont les suivants :
5-10 % d'éthanol (ou d'autres solvants similaires tels que le méthanol ou l'acétonitrile) dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0, 5 % de diméthyl sulfoxyde dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0.
Notez qu'il peut être nécessaire de réduire le débit afin de rester sous

la pression maximale de fonctionnement lors de l'utilisation de phases mobiles de viscosité plus élevée.

Température :

Généralement, les séparations SEC sont exécutées entre 10 et 30 °C. La séparation des protéines et des peptides peut requérir une température plus élevée pour améliorer la résolution et le taux de rendement des protéines et des peptides hydrophobes. La SEC peut être exécutée dans une chambre froide afin de préserver l'activité biologique maximale des protéines sensibles à la température.

La température maximale de fonctionnement des colonnes Agilent Bio SEC est de 80 °C.

Il faut noter que des températures plus élevées peuvent dénaturer les protéines.

QUELLE INSTRUMENTATION POUR LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE

Le mécanisme de séparation SEC signifie que le volume d'élution, ou temps de rétention, est absolument essentiel pour l'analyse. Cela nécessite des instruments à haute performance pour garantir la précision et la reproductibilité. Les pompes isocratiques ou les pompes à gradient utilisées en mode isocratique sont appropriées, et par conséquent, les détecteurs à indice de réfraction (RI), ainsi que le détecteur à barrette de diodes ou UV plus classique, peuvent être utilisés. Pour assurer la stabilité de la ligne de base, en particulier lors de l'utilisation d'un détecteur réfractométrique, le dégazage en ligne de la phase mobile et des compartiments thermostatés sont fortement recommandés. Un fonctionnement à températures élevées augmente le coefficient de diffusion, ce qui conduit à une meilleure résolution et reproductibilité, et à une réduction du stress sur la colonne. Par conséquent, les compartiments thermostatés sont essentiels à un système à haute performance.

Fonctionnement robuste et fiable même dans des conditions de solvant difficiles

Les tampons avec de fortes concentrations en sel telles que 2 M de NaCl ou 8 M d'urée et des valeurs de pH extrêmes entre 1 et 13 sont couramment utilisés dans l'analyse de biomolécules, ce qui représente un défi important pour les instruments de LC. La conception spéciale du LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity permet de facilement prendre en charge ces conditions de solvant difficiles. Le titane résistant à la corrosion dans le système de distribution du solvant et les matériaux sans métaux dans le circuit en font un instrument extrêmement robuste, vous permettant de protéger non seulement votre échantillon, mais également votre investissement. Le détecteur est aussi conçu pour les séparations des biomolécules et n'a aucune incidence sur l'analyse des protéines, la forme de pic, et le rendement.

Protégez vos protéines lors de l'analyse

La chaleur peut dénaturer les protéines, il est donc important que l'échantillon soit maintenu à température constante dans l'ensemble du circuit LC. Le passeur automatique d'échantillons bio-inerte d'Agilent avec une boucle d'échantillonnage et une aiguille en céramique inertes peut être refroidi en ajoutant un thermostat. Les échangeurs de chaleur bio-inertes pour le compartiment à colonne thermostaté maintiennent une température constante. Agilent propose un certain nombre de cellules bio-inertes permettant une analyse fiable de votre protéine dans différentes conditions. En savoir plus sur les options de cellule sur www.agilent.com/chem/bioflowcells.



Système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity



Cellule bio-inerte avec une étiquette d'identification par radio fréquence, 10 mm, 13 μ L (réf G5615-60022)

Les solutions logicielles fournissent de nouvelles expertises

Lorsque vous travaillez en SEC, plusieurs options logicielles sont disponibles pour vous aider :

- **Logiciel HPLC** : le logiciel Agilent OpenLAB CDS ChemStation vous aide à obtenir, évaluer et organiser vos données chromatographiques et à effectuer des analyses quantitatives
- **Logiciel GPC/SEC** : disponible dans le cadre du système d'exclusion stérique (GPC/SEC) d'Agilent, il fournit plus d'informations basées sur la masse moléculaire
- **Logiciel Agilent Buffer Advisor** : il vous épargne les étapes fastidieuses et sources d'erreurs du développement de méthodes que sont la préparation des tampons, le mélange de tampons et la recherche du bon pH en mettant à votre disposition un moyen simple et rapide de créer des gradients de sel et de pH



Caractérisation moléculaire complète

La SEC peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire moyenne d'analytes polymériques, y compris des molécules d'origine naturelle (polysaccharides, amidons, etc.) et des polymères synthétiques (polyéthylène glycol ou polyoxyde d'éthylène) (figure 4). Pour les protéines ou les échantillons plus complexes, y compris les vaccins, il est souvent nécessaire d'utiliser une forme plus sophistiquée de traitement des données en utilisant un logiciel dédié. En association avec les détecteurs appropriés, des informations précieuses sur la conformation de l'échantillon peuvent être obtenues. Pour plus d'informations, voir la page 17 concernant les choix de détecteurs.

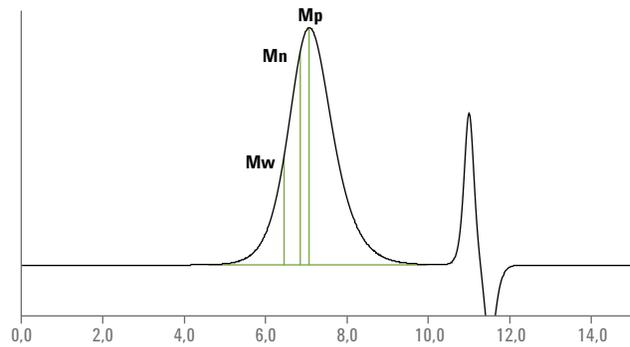
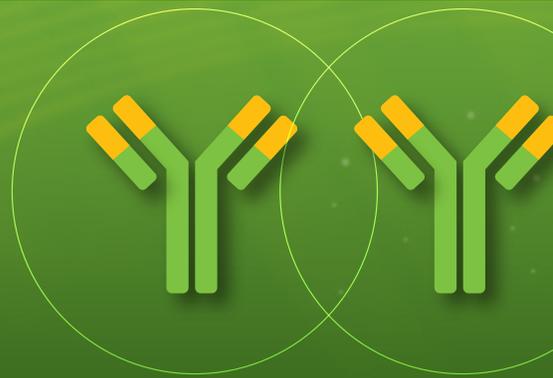


Figure 4 : séparation SEC de polysaccharides indiquant MM, Mn et Mp.

COMPOSANTES DE LA CARACTÉRISATION D'EXCLUSION STÉRIQUE



La préparation d'échantillons

La préparation d'échantillons pour la SEC est similaire à celle utilisée pour les méthodes HPLC d'analyse des protéines. L'aspect le plus important est que l'échantillon doit être soluble dans l'éluant et doit idéalement être dissous dans la phase mobile elle-même. En raison des plus grandes dimensions de la colonne et de la faible vitesse linéaire liée à des débits relativement bas par rapport à d'autres formes de HPLC (voir « taille de la colonne », ci-dessous), des concentrations d'échantillons et des volumes d'injection plus élevés que la normale peuvent être nécessaires. Pour protéger la colonne de dommages possibles, nous recommandons de filtrer ou centrifuger les échantillons avant de les utiliser, afin d'éliminer les particules. Cependant, la filtration ne doit pas être utilisée pour améliorer la mauvaise solubilité de l'échantillon, un autre éluant peut être nécessaire.

Pour une préparation d'échantillons efficace, il est également important de veiller à ce que les méthodes utilisées pour dissoudre l'échantillon ne modifient pas les propriétés de l'échantillon lui-même. Certaines protéines peuvent s'agréger (formant des dimères et des multimères de masse moléculaire plus élevée) ou se dissocier (en formant des sous-unités de masse moléculaire plus faible) dans des conditions de stress. Celles-ci peuvent inclure des cycles de congélation-décongélation, des températures extrêmes, l'application d'ultrasons, ou des concentrations égales. Voir le guide de développement de méthodes à la page 5 pour plus d'informations.

Filtres à faible taux d'absorption de protéines Captiva

Indépendamment de la préparation d'échantillons que vous effectuez, il est conseillé de filtrer votre échantillon avec un filtre à faible taux d'absorption de protéines.

Nos filtres PES offrent un faible taux d'absorption de protéines constant pour la filtration des protéines. Les membranes de filtration PES sont une meilleure option que les membranes PVDF pour la plupart des analyses LC. Les filtres PES d'Agilent ont une compatibilité similaire aux filtres PVDF pour les solvants LC courants et présente un avantage en termes d'absorption de protéines et de propreté. Pour en savoir plus, rendez-vous sur :

www.agilent.com/chem/filtration



Filtres PES Captiva

Diamètre (mm)	Diamètre de pore (µm)	Certification	Boîtier	Référence
4	0,45	LC	Polypropylène	5190-5095
4	0,2	LC/MS	Polypropylène	5190-5094
15	0,2	LC/MS	Polypropylène	5190-5096
15	0,45	LC	Polypropylène	5190-5097
25	0,2	LC/MS	Polypropylène	5190-5098
25	0,45	LC	Polypropylène	5190-5099

Sélection de colonne

Taille de la colonne

Les colonnes SEC sont généralement beaucoup plus grandes que celles employées pour d'autres types de chromatographie et sont utilisées, en comparaison, à des débits faibles ou à des vitesses linéaires lentes. Les dimensions standards de la colonne SEC sont de 7,8 x 300 mm, fonctionnant à 1,0 mL/min, par rapport à une colonne à phase inverse dont les dimensions sont plutôt de 2,1 ou 4,6 x 150 mm et fonctionnant à des vitesses linéaires 2-3 fois plus grandes. Il ne s'agit pas d'un effet de la taille de la colonne, mais du mécanisme de chromatographie d'exclusion stérique.

Avec la SEC, il n'y aucune augmentation de la concentration d'échantillons typiquement observée avec d'autres techniques chromatographiques en raison de l'absorption ou de l'interaction avec la phase stationnaire. En conséquence, les échantillons analysés par chromatographie d'exclusion stérique sont injectés dans des volumes beaucoup plus grands (5-20 µL), souvent à des concentrations élevées (1-4 mg/mL). Les temps d'analyse sont généralement de 10-12 minutes par colonne (en supposant qu'une colonne classique de 7,8 x 300 mm fonctionne à 1,0 mL/min) et les pics sont généralement larges, de telle sorte qu'il n'est pas nécessaire d'avoir des taux de collecte des données élevés. Un logiciel HPLC est utilisé pour la comparaison ou la quantification de l'agrégation protéique. Pour obtenir des informations sur la distribution de la masse moléculaire pour les polymères polydispersés, un logiciel spécifique à la SEC est utilisé.

Il est essentiel de comprendre les propriétés de la colonne que vous avez choisie en utilisant un étalonnage régulier. En incluant une molécule suffisamment grande, trop grande pour pénétrer dans aucun pore, il doit être possible de déterminer la limite d'exclusion de la colonne. De même, en utilisant une très petite molécule, suffisamment petite pour pénétrer toute la structure des pores, il est possible de déterminer la limite de perméation totale de la colonne. Vous devez alors veiller à ce que la séparation que vous essayez d'obtenir se produise entre ces deux limites. Si le chromatogramme de votre échantillon comprend un matériau exclu ou un matériau qui élué au point de perméation totale, cela indique que l'utilisation d'une colonne avec des pores de diamètre différent peut être nécessaire pour votre analyse.



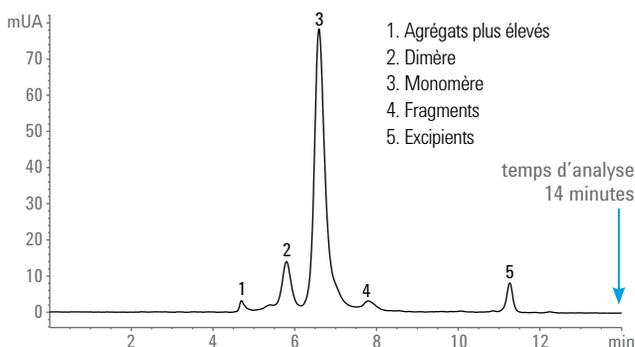
Augmentation de la vitesse des analyses avec des colonnes plus courtes

Il est généralement nécessaire d'utiliser des colonnes de 300 mm de long pour obtenir le degré de résolution dont vous avez besoin pour votre analyse. Cependant, pour améliorer la vitesse de séparation, vous pouvez envisager d'utiliser des colonnes plus courtes. La séparation peut être effectuée en deux fois moins de temps, en utilisant une colonne de 150 mm de long. Toutefois, la résolution sera altérée. Lorsqu'une cadence élevée est nécessaire, des colonnes plus courtes peuvent souvent être utilisées à des débits plus élevés sans risque d'atteindre les limites de contrepression, ce qui réduit encore plus le temps d'analyse. Voir figure 5.

Colonne : **AdvanceBio SEC, 7,8 x 300 mm**

Débit : 1,0 mL/min

Échantillon : IgG polyclonal



Colonne : **AdvanceBio SEC, 7,8 x 150 mm**

Débit : 2,0 mL/min

Échantillon : IgG polyclonal

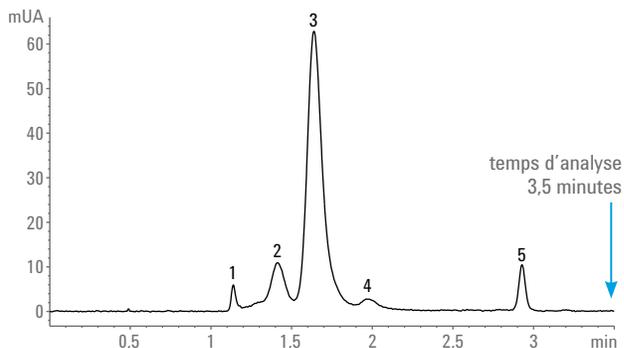


Figure 5 : comparaison d'analyses utilisant des colonnes de 300 mm et des colonnes de 150 mm pour démontrer les gains de temps.

Choix du matériau de la colonne

Choisissez une colonne à exclusion stérique adaptée à votre type et taille de molécule après avoir déterminé la solubilité de l'échantillon et la phase mobile, eau, tampon ou solvant organique, de votre séparation. Des colonnes remplies avec des adsorbants à base de polymères sont fréquemment utilisées pour des molécules polymériques présentant de larges distributions de masses moléculaires, telles que l'héparine, l'amidon ou la cellulose. Les protéines et les molécules de masses moléculaires distinctes sont mieux adaptées pour des phases stationnaires à base de silice (Tableau 1).

Il est important de se rappeler que les protéines contiennent de nombreux acides aminés dont les chaînes latérales présentent des fonctions diverses : acides, basiques, hydrophobes et neutres/hydrophiles. Pour éviter les interactions qui se produisent avec des colonnes de silice, des tampons sont nécessaires dans la phase mobile.

Agilent propose la plage de masses moléculaires appropriée pour ses colonnes et idéalement votre choix de colonne devrait se trouver au milieu de la plage opérationnelle.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Application	Colonnes Agilent	Remarques
Protéines		
SEC-UV/DAD, ou analyse LS des anticorps monoclonaux, protéines et peptides	Agilent AdvanceBio SEC	La dernière technologie innovante qui offre une résolution permettant d'éliminer le besoin pour de nouvelles analyses et une vitesse permettant de réduire le temps d'analyse, afin d'améliorer la productivité du laboratoire
Analyse SEC-MS des anticorps monoclonaux, des protéines et des peptides.	Agilent Bio SEC-3	Fournit des lignes de base stables avec détection MS
Biomolécules et échantillons de grande taille avec composantes de masses multiples	Agilent Bio SEC-5	Nombreuses options de diamètre de pore (100 Å, 150 Å, 300 Å, 500 Å, 1 000 Å et 2 000 Å) couvrant une large gamme d'analytes
Protéines globulaires, anticorps	ProSEC 300S	La colonne pour l'analyse des protéines dans des conditions de salinité élevée
Protéines, protéines globulaires	ZORBAX GF-250/450	Produits classiques qui doivent être utilisés quand les protocoles de la nomenclature de l'USP L35 sont utilisés
Analytes solubles dans l'eau		
Polymères et oligomères de faibles masses moléculaires, oligosaccharides, PEG, lignosulfonates	2 ou 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH 8 µm ✓ PL aquagel-OH 20 5 µm ✓ PL aquagel-OH MIXED-M 8 µm	La série analytique PL aquagel-OH possède une plage de pH comprise entre 2 et 10, est compatible avec les solvants organiques (jusqu'à 50 % de méthanol), est mécaniquement stable jusqu'à 140 bars (2 030 psi) et supporte de faibles pressions de fonctionnement
Biopolymères polydispersés, polysaccharides, dérivés de cellulose	2 ou 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8 µm ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8 µm	
Polymères de MM très élevée, acides hyaluroniques, amidons, gommés	PL aquagel-OH 60/50/40 15 µm en série	

Tableau 1 : Choix du matériau de la colonne en fonction de l'application et de la taille de l'échantillon.



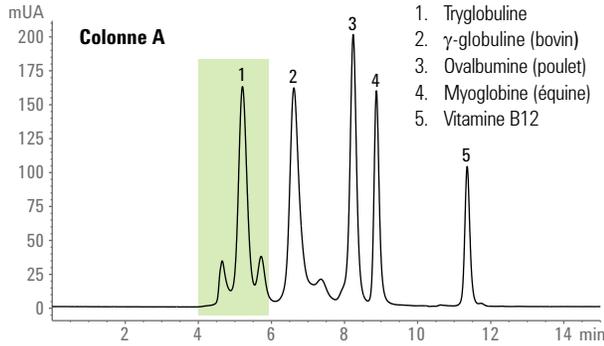
Colonnes Agilent Bio SEC pour les séparations de biomolécules, y compris l'agrégation protéique, et colonnes Agilent GPC pour l'analyse de polymères naturels, y compris la détermination de la masse moléculaire des polysaccharides.

Diamètre de pore

Les protéines sont relativement petites et compactes par rapport à d'autres biopolymères, une colonne initiale avec un diamètre de pores de 300 Å est par conséquent un bon choix. La figure 6 compare la résolution d'un mélange étalon de référence constitué de cinq protéines et un échantillon d'IgG polyclonal sur des colonnes

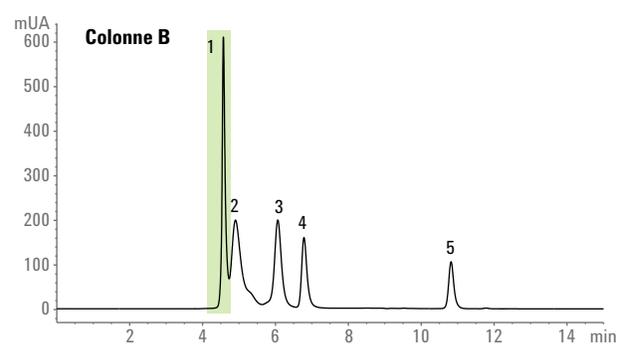
avec des pores de diamètres différents et montre clairement l'effet de la taille des pores sur la résolution. Avec des pores de 300 Å, la plus grande protéine tryglobuline et le dimère IgG sont séparés, mais lorsque le diamètre de pore diminue, les plus grandes protéines sont exclues et aucune séparation ne se produit.

Mélange d'étalons pour la filtration sur gel BioRad



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

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



Instrument : système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

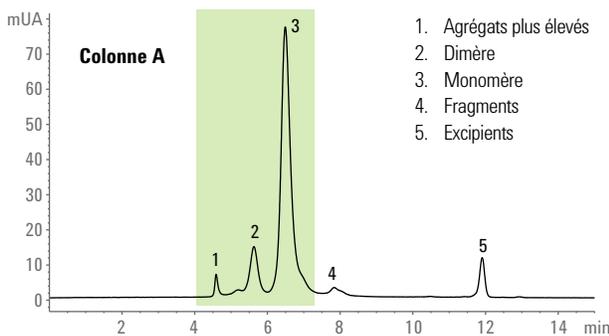
Phase mobile : tampon de phosphate 150 mM, pH 7,0

Débit : 0,35 mL/min

Détecteur : UV, 220 nm

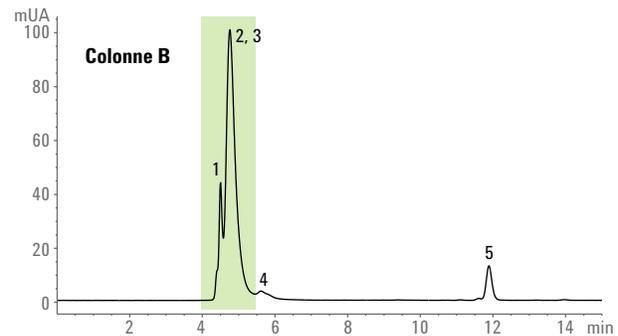
Échantillon : mélange d'étalons de filtration sur gel BioRad

Séparation d'IgG polyclonaux



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

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



Instrument : système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

Phase mobile : tampon de phosphate 150 mM, pH 7,0

Débit : 0,35 mL/min

Détecteur : UV, 220 nm

Échantillon : IgG polyclonal

Figure 6 : comparaison des diamètres de pore sur la résolution des étalons pour la filtration sur gel BioRad et d' IgG polyclonaux. La zone soulignée en vert montre la différence de résolution entre les deux diamètres de pore. Le diamètre de pore plus important est nécessaire pour l'analyse des protéines de plus grande taille.

Évaluation des plages de perméation de la SEC

Avec des protéines, il est important de reconnaître que le mécanisme SEC fonctionne en séparant les solutés en fonction de leur taille en solution et non leur masse moléculaire. Cela est évident si l'on compare le tracé d'étalonnage des protéines/peptides avec celles du pullulane/polysaccharide et PEG/PEO, comme représenté sur la figure 7.

Les étalons pullulane/polysaccharide et PEG/PEO ont fourni des courbes d'étalonnage très similaires, mais la courbe protéine/peptide est décalée et a une forme différente.

Les protéines sont composées de chaînes polypeptidiques complexes qui forment des structures en trois dimensions. Ces structures sont affectées par l'environnement auquel elles sont exposées, tel que le pH ou la force ionique. Les chaînes prendront la forme la mieux adaptée à leurs besoins, c'est pourquoi leur structure et leur taille peuvent varier.

Pour démontrer que le temps d'élution est dû à la taille plutôt qu'à la masse moléculaire, prenez en compte les temps de rétention des étalons de masse moléculaire d'environ 50 000, dans lesquels il y a une différence significative (figure 8). Le polyéthylène glycol est élué juste après 7 minutes, le polysaccharide est élué juste après 7,5 minutes, mais la protéine est éluée à environ 9,5 minutes.

Cela démontre clairement que le mécanisme de séparation SEC est basé sur la taille réelle et non pas sur la masse moléculaire. Par conséquent, lors de l'utilisation de courbes d'étalonnage, il est important de préciser les étalons utilisés. Par exemple, on peut affirmer que l'échantillon d'intérêt a une masse moléculaire de 50 000 équivalente au pullulane/polysaccharide. Voir la page 16 pour les détecteurs de pointe qui permettent de surmonter cet effet relatif.

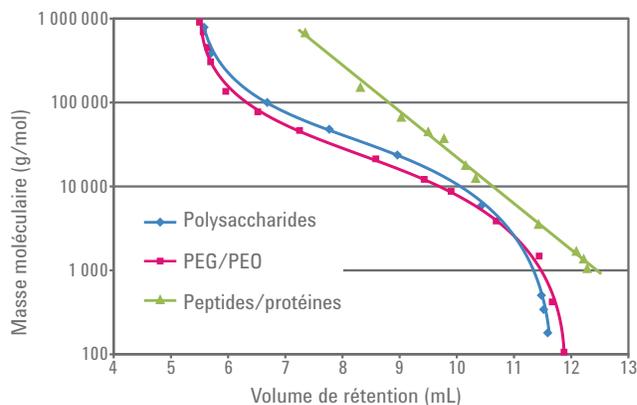


Figure 7 : comparaison des tracés d'étalonnage générés pour trois types d'étalons.

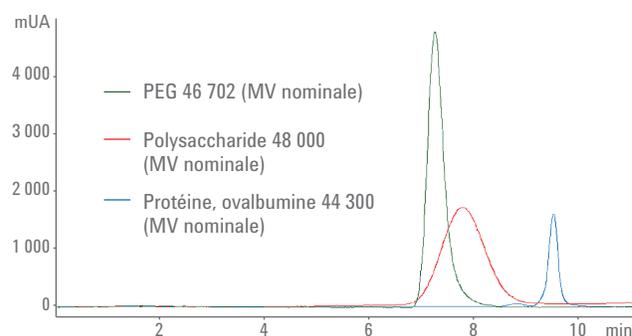


Figure 8 : superposition des chromatogrammes obtenus pour des étalons de masse moléculaire similaire.



Mélange étalon 130 Å AdvanceBio SEC

(réf. 5190-9416 mélange étalon 130 Å AdvanceBio SEC, flacon de 2 mL)

Un mélange de protéines constitué de 5 protéines soigneusement sélectionnées (ovalbumine, myoglobine, aprotinine, neurotensine, angiotensine II) conçu pour l'étalonnage des colonnes d'exclusion stérique 130 Å AdvanceBio d'Agilent. Cet étalon peut être utilisé régulièrement pour étalonner la colonne et garantir une performance optimale du système dans diverses applications de purification et d'analyse de protéines.

Mélange étalon 300 Å AdvanceBio SEC

(réf. 5190-9417 mélange étalon 300 Å AdvanceBio SEC, flacon de 2 mL)

Un mélange de protéines constitué de 5 protéines soigneusement sélectionnées (Tryglobuline, γ -Globuline, Ovalbumine, Myoglobine, Angiotensine II) conçu pour l'étalonnage des colonnes d'exclusion stérique 300 Å AdvanceBio d'Agilent. Cet étalon peut être utilisé régulièrement pour étalonner la colonne et garantir une performance optimale du système dans diverses applications de purification et d'analyse de protéines.



Granulométrie

La granulométrie est également un facteur important dans la sélection de colonne. Les granulométries plus petites permettent d'obtenir une séparation plus efficace, mais au risque de dégrader (cisaillement/déformation) la protéine. La figure 9 montre une comparaison entre les colonnes Agilent 3 µm Bio SEC-3 et 5 µm Bio SEC-5. Si les échantillons et éluants ne sont pas préparés

soigneusement, le risque de contrepression plus élevée et de colmatage des colonnes augmente. Il est recommandé d'effectuer une filtration afin d'éliminer les matières insolubles et les débris. L'utilisation d'une colonne de garde ou d'un filtre en ligne peut également prolonger la durée de vie de la colonne.

Comparaison entre les colonnes Agilent Bio SEC-3 et Agilent Bio SEC-5

Analyse d'anticorps monoclonal

Colonne : **Bio SEC-3, 300 Å**
7,8 x 300 mm, 3 µm
(réf 5190-2511)

Colonne : **Bio SEC-5, 300 Å**
7,8 x 300 mm, 5 µm
(réf 5190-2526)

Instrument : système de LC quaternaire bio-inerte
Agilent 1260 Infinity

Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7

Débit : 1 mL/min

Détecteur : UV, 220 nm

Échantillon : anticorps monoclonal humanisé

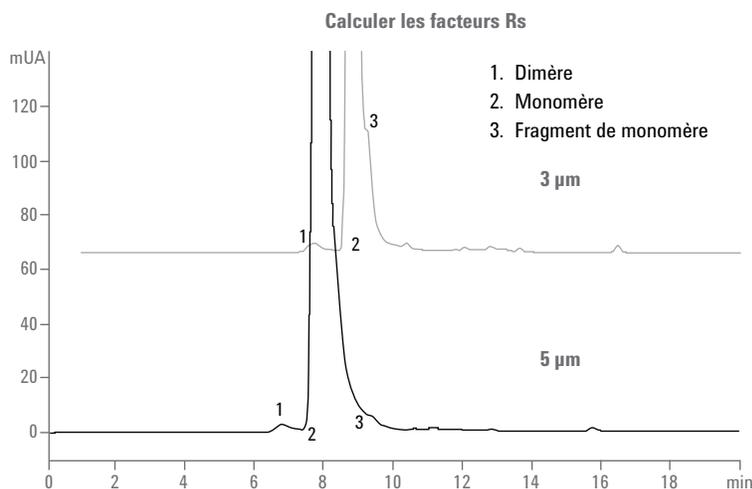


Figure 9 : comparaison des colonnes Agilent Bio SEC-3 et Agilent Bio SEC-5. La colonne 3 µm offre une meilleure séparation.

Diamètre de la colonne

Le diamètre de la colonne peut également être important en fonction de la quantité d'échantillon. Les colonnes de d.i. de 4,6 mm (fonctionnant à 0,35 mL/min) sont utiles en cas de quantités limitées d'échantillon disponible. Mais il est important de réduire au minimum les volumes du système pour l'utilisation de colonnes de petits d.i. afin d'éviter une trop grande dispersion et perte de résolution.

La SEC est considérée comme une technique non dénaturante lorsque des éluants aqueux sont utilisés, elle est donc extrêmement utile pour le fractionnement d'échantillons complexes ou l'isolement d'un composant d'échantillon pour une analyse ultérieure. Les colonnes de diamètre plus important, telles que celles de 21,2 mm que l'on trouve dans la gamme Agilent SEC-3 et SEC-5, permettent d'effectuer des séparations préparatives en laboratoire en utilisant des systèmes HPLC analytiques.



Colonnes Agilent AdvanceBio SEC 7,8 x 300 mm et 4,6 x 300 mm

Paramètres de la méthode

Débit

Pour certaines applications, la vitesse d'analyse est essentielle. Pour réduire le temps d'analyse, une colonne plus courte peut être utilisée, 150 mm contre la longueur conventionnelle de 300 mm, le débit peut être augmenté, ou les deux. Cependant, cela pourrait avoir un effet néfaste sur la résolution, car la SEC repose sur la diffusion vers l'intérieur et vers l'extérieur d'un pore pour créer un chemin différentiel à travers la colonne. Néanmoins, comme le montre la figure 10, il est possible d'obtenir une résolution suffisante pour quantifier un dimère et un monomère d'IgG en moins de 4 minutes en utilisant une colonne de 150 mm à un débit de 2 mL/min.

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

Phase mobile : tampon de phosphate 150 mM, pH 7,0

Débit : 0,5 ; 1,0 ; 1,5 mL/min (52, 102, 152 bars)

Détecteur : UV, 220 nm

Injection : 5 µL

Échantillon : IgG (2 mg/mL)

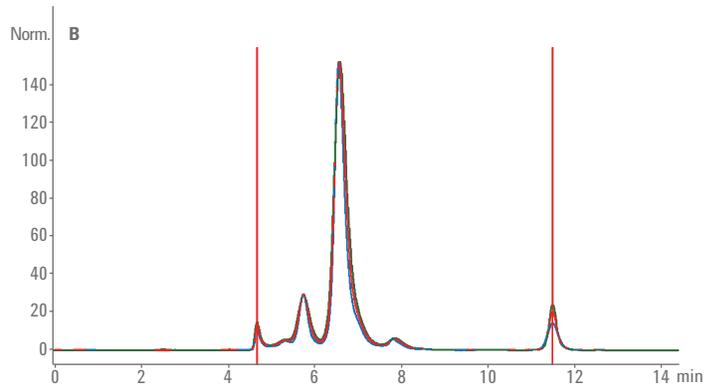
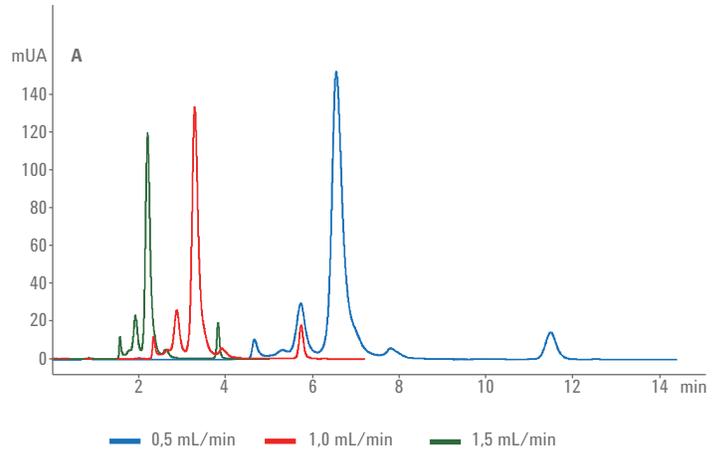


Figure 10 : l'augmentation du débit réduit le temps d'analyse de 12 à 4 minutes (A). Quand les temps de rétention sont normalisés et superposés (B), il est évident que les temps de rétention sont cohérents avec une perte de résolution minimale.

Résolution des anomalies liés à votre méthode SEC

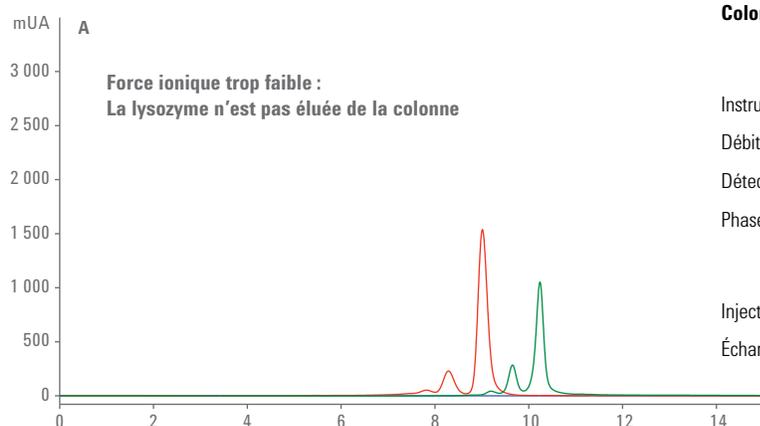
Anomalie	Source	Solution
Rendement inférieur aux valeurs prévues, ou élargissement des pics	Composés hydrophobes	Ajouter une faible quantité (10-20 %) de modificateur organique (acétonitrile ou méthanol) à la phase mobile
Pics qui apparaissent de façon imprévue, en fonction de la masse moléculaire, ou trainée des pics	Interactions ioniques ou protéines basiques	Améliore la force ionique - concentration en sel à intervalles de 50-100 mM ; ajouter au tampon de phosphate
Pics de forme médiocre	Adsorption non spécifique	Augmenter la concentration en sel ou essayer un système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity
Mauvaise rétention/résolution des analytes	Diamètre de pore insuffisant pour la taille des molécules	Vérifier votre diamètre de pore ; voir page 11 pour en savoir plus

Sélection de la phase mobile

Les interactions secondaires peuvent causer des difficultés

Pour surmonter les interactions secondaires indésirables, il peut être nécessaire d'effectuer des tests d'optimisation. De telles interactions peuvent retarder l'élution d'un analyte et donner l'apparence d'une masse moléculaire plus faible. De légères modifications dans la composition de la phase mobile, pH, force ionique ou

modificateurs organiques, peuvent aider à surmonter ces difficultés (figure 11). Il peut également être nécessaire d'affiner le choix du diamètre de pore, d'associer des colonnes en série, de réduire le débit d'analyse, ou de changer la température pour atteindre la séparation souhaitée.



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

Instrument : système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

Débit : 0,35 mL/min

Détecteur : UV, 220 nm

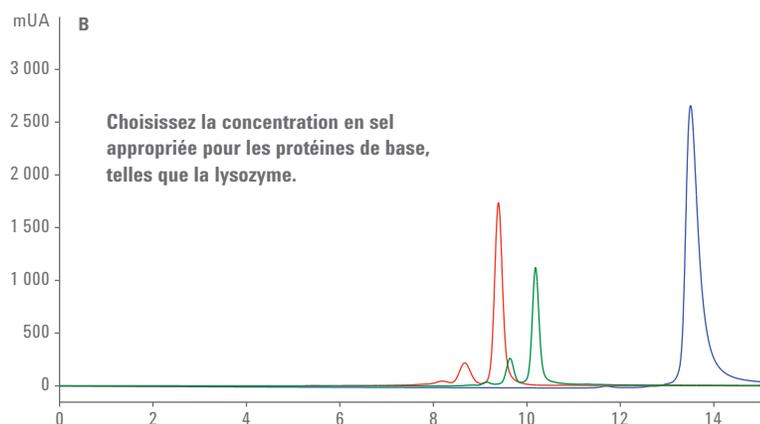
Phase mobile: A: Tampon de phosphate 20 mM, pH 7 + NaCl 50 mM

B: Tampon de phosphate 20 mM, pH 7 + NaCl 100 mM

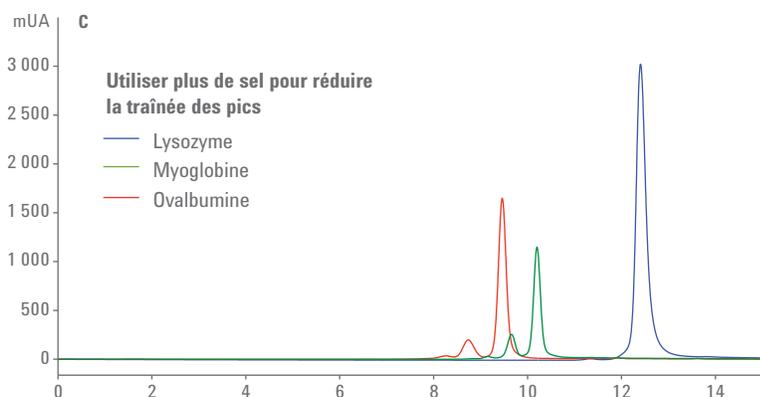
C: Tampon de phosphate 20 mM, pH 7 + NaCl 400 mM

Injection : 5 µL

Échantillon : protéine (Tampon de phosphate 1 mg/mL 20 mM, pH 7)



NaCl 50 mM dans un tampon 20 mM



NaCl 400 mM dans un tampon 20 mM

Figure 11 : effet de trop ou trop peu de force ionique pour réaliser la séparation souhaitée.

Étalonnage

Une fois que vous avez choisi une colonne, il sera nécessaire d'effectuer un étalonnage avec des étalons de masse moléculaire connue. Chaque fois que vous changez de colonne ou apportez des modifications à la phase mobile, vous devrez répéter l'étalonnage. La courbe d'étalonnage est obtenue en traçant le temps de rétention

par rapport à la masse moléculaire (figure 12). Il est particulièrement important de choisir des étalons appropriés à la molécule d'intérêt. Pour une séparation des protéines, utiliser des étalons de masse moléculaire protéique. Les étalons de masse moléculaire pullulane doivent être utilisés pour une séparation de polysaccharides.

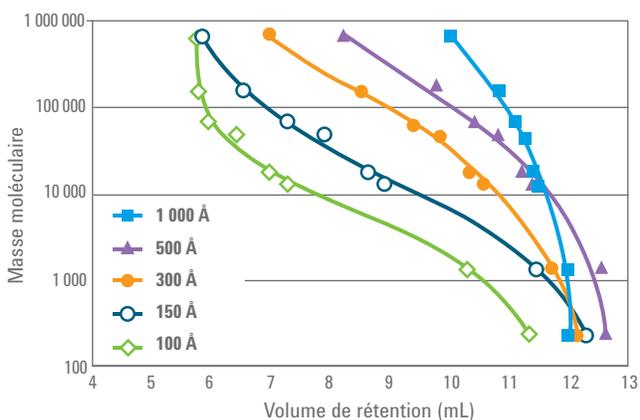
Colonne : Agilent Bio SEC-5
7,8 x 300 mm, 5 µm
(réf 5190-2521)

Instrument : système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0

Débit : 1,0 mL/min

Détecteur : UV



Protéines	MM	Volume de rétention				
		1 000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
Tryglobuline	670 000	10,07	8,23	7,03	5,82	5,77
γ-globuline	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
Ovalbumine	45 000	11,28	10,83	9,89	7,90	6,40
Myoglobine	17 000	11,44	11,28	10,42	8,66	7,05
Ribonucléase A	12 700	11,52	11,41	10,58	8,93	7,32
Vitamine 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

Figure 12 : courbes d'étalonnage obtenues en traçant le temps de rétention par rapport à la masse moléculaire

Idéalement, les étalons doivent être dissous dans la phase mobile et il faut veiller à ce que l'échantillon se soit complètement dissous. Si la solution est trouble, il sera nécessaire de prendre d'autres mesures. La centrifugation ou la filtration doivent être utilisées pour éliminer

les matières insolubles avant l'injection. Cependant, il peut être nécessaire d'examiner des conditions de phase mobile alternatives qui permettront d'améliorer la solubilité de l'échantillon, car les processus physiques pourraient modifier la composition de la masse moléculaire.



Techniques de détection de pointe

D'autres considérations concernant la SEC incluent le choix du détecteur. Les détecteurs UV ou à barrette de diodes (DAD) sont couramment utilisés pour les séparations des protéines. Les meilleurs résultats, c'est à dire la sensibilité la plus élevée, pour les peptides et les protéines seront normalement obtenus à 220 nm. Certaines solutions tampons ou modificateurs organiques peuvent avoir une absorbance de fond trop importante pour des longueurs d'onde faibles, auquel cas 254 nm ou 280 nm peuvent être nécessaires. Un inconvénient de la détection UV est que certaines molécules ne possèdent pas de chromophore, mais puisque les analytes sont élués de manière isocratique, il est possible d'utiliser un détecteur réfractométrique à la place.

L'ajout de la détection de pointe à dispersion de lumière augmente les performances de la SEC de manière significative. La dispersion statique de lumière détermine des masses molaires exactes, indépendamment des étalonnages de colonne et des interactions indésirables, et est complétée par la dispersion dynamique de lumière pour étudier la taille moléculaire. La dispersion de lumière a augmenté la sensibilité de larges fragments permettant la découverte d'agrégation à des quantités bien inférieures (figure 13). Il est important de choisir un détecteur à faible volume mort pour assurer l'obtention de cette information supplémentaire sans sacrifier la performance chromatographique.

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

Instrument : système de LC quaternaire bio-inerte
Agilent 1260 Infinity avec multi
détecteur GPC/SEC Agilent 1260 Infinity

Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0

Débit : 0,8 mL/min

Température : 30 °C

Détecteur : UV, 280 nm + RI + LS 90°

Injection : 5 µL

Échantillon : anticorps monoclonal dégradé

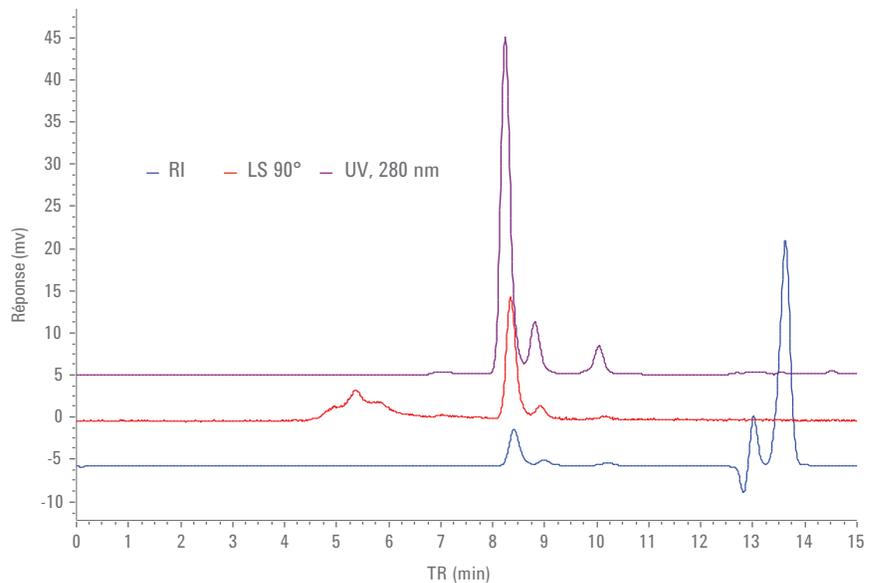


Figure 13 : résultat de l'utilisation de différents détecteurs pour une séparation des protéines.

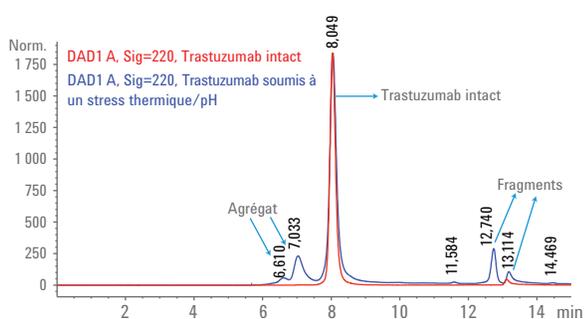
Protéines conjuguées

Les protéines thérapeutiques sont soumises aux phénomènes d'agrégation et de dégradation pendant l'ensemble des stades de développement, tels que l'expression, le repliement, le traitement en aval, la formulation, la stérilisation et le stockage. Bien que des agrégats/produits de dégradation soient présents dans des concentrations extrêmement faibles, ils peuvent avoir un impact important sur la qualité des produits biologiques, conduisant à une perte d'activité, une diminution de la solubilité et une immunogénicité accrue. La SEC est la méthode standard utilisée pour caractériser l'agrégation protéique et est également requise pour la soumission et l'approbation réglementaires.

Pour améliorer la distribution, augmenter la demi-vie et la puissance, les protéines, y compris les anticorps monoclonaux, peuvent être conjuguées. Les polymères solubles dans l'eau,

tels que le polyéthylène glycol, sont conjugués avec la protéine afin de renforcer les activités pharmacologiques, augmenter leur demi-vie dans le sang et réduire l'immunogénicité. Plus récemment, les conjugués anticorps-médicament (CAM) ont fait l'objet d'un intérêt particulier, où les anticorps monoclonaux sont conjugués à un agent cytotoxique pour la distribution ciblée de médicaments et l'augmentation de l'efficacité du traitement. Après la conjugaison, les mêmes études d'agrégation sont nécessaires car le changement dans les caractéristiques de l'échantillon peut poser un défi supplémentaire pour parvenir à une séparation SEC. Les colonnes à absorption non spécifique très faible, comme les AdvanceBio SEC, sont nécessaires à l'analyse à la fois de l'anticorps et du CAM en utilisant des phases mobiles aqueuses.

Voir figure 14.

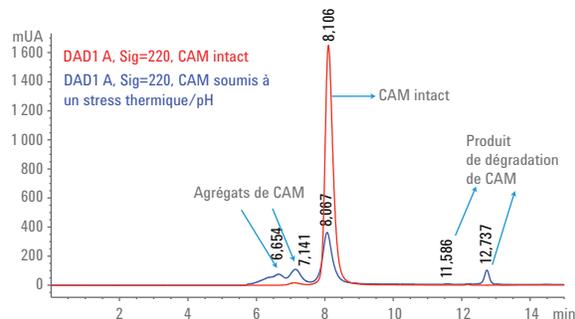


Colonne : **AdvanceBio SEC 300 Å**
7,8 x 300 mm, 2,7 µm

Instrument : système de LC quaternaire bio-inerte Agilent 1260 Infinity

Phase mobile : PBS, phosphate de sodium 50 mM contenant du chlorure de sodium 150 mM, pH 7,4

Température TCC : ambiante



Volume d'injection : 10 µL

Débit : 0,8 mL/min

Détecteur : UV, 220 nm

Figure 14 : la même phase mobile aqueuse est utilisée pour l'anticorps monoclonal et le CAM plus hydrophobe.

Naviguer à votre guise pour obtenir un résultat satisfaisant

www.agilent.com/chem/navigator

Proposant une multitude de biocolonnes et de colonnes pour les petites molécules, le NAVIGATEUR Agilent pour les colonnes de LC et la préparation d'échantillons vous aidera à choisir la colonne la mieux adaptée à votre application.

Le NAVIGATEUR présente quatre options de recherche faciles :

- Par référence, avec des renvois aux colonnes LC et aux produits de préparation d'échantillons pour trouver le meilleur produit de remplacement Agilent



- Par composé en utilisant la liste déroulante
- Par méthode USP
- Par colonne, avec des recommandations basées sur la méthode

Préparation d'échantillons

- Idéalement, les échantillons doivent être dissous dans la phase mobile.
- Si l'échantillon est trouble, il peut être nécessaire de modifier les conditions de la phase mobile.
- Une filtration ou une centrifugation peuvent être utilisées pour rendre les échantillons plus limpides, mais ces procédés peuvent modifier la composition de la masse moléculaire de l'échantillon.
- Pour dissoudre un échantillon, il est parfois possible de chauffer légèrement, d'agiter au vortex, ou d'appliquer des ultrasons, toutefois ces procédés doivent être appliqués avec prudence, car ils peuvent modifier la composition de la masse moléculaire.
- Des précautions doivent également être prises pour assurer que l'échantillon ne subit aucune modification pendant le stockage.
- Les échantillons doivent être analysés dès que possible après leur préparation.
- La croissance bactérienne peut se développer rapidement dans des solutions tampons.
- Les échantillons préparés à forte concentration peuvent également changer au fil du temps, ce qui peut mener à l'apparition d'agrégats ou même de précipités.



Sélection de colonne

- Pour garantir l'intégrité de l'échantillon, une chromatographie SEC est effectuée lentement sur des colonnes longues.
- Les longueurs de colonnes sont généralement de 250 ou 300 mm.
- Le débit normal est de 1,0 mL/min sur une colonne au d.i. de 7,5 ou 7,8 mm et de 0,35 mL/min sur une colonne au d.i. de 4,6 mm.
- Les colonnes sont souvent montées en série pour augmenter la résolution dans les applications de biopolymères.
- Des granulométries plus petites sont utilisées pour augmenter la résolution dans les applications de protéines.
- Les séparations effectuées sur des colonnes de 150 mm avec des granulométries plus petites peuvent réduire le temps d'analyse.

Choix du matériau de la colonne

- Il ne doit y avoir aucune interaction non spécifique entre les analytes et la colonne.
- Des adsorbants à base de silice sont utilisés pour l'analyse des peptides et des protéines.
- Des adsorbants à base de polymères sont utilisés pour l'analyse de biopolymères.



Paramètres des colonnes

- **Diamètre de pore** : il dépend de la plage de masses moléculaires de l'échantillon pour éviter l'exclusion des composants de l'échantillon et maximiser le volume dans la région de séparation requise.
- **Granulométrie** : utiliser des particules plus petites pour obtenir une meilleure résolution (mais une contrepression plus élevée).
- **Longueur de colonne** : faire un compromis entre la résolution et le temps d'analyse.
- **D.i. de colonne** : utiliser des colonnes de diamètres plus petits pour réduire la consommation de solvant et le volume d'injection.

Phase mobile

- La phase mobile doit contenir un tampon/sel pour surmonter les interactions ioniques, mais une quantité trop élevée peut causer des interactions hydrophobes.
- Ne pas modifier l'analyte pour éviter toute dégradation/agrégation, etc.
- Utiliser une phase mobile rapidement après sa préparation, car la prolifération bactérienne est rapide dans un tampon dilué conservé à température ambiante.
- Le cycle de vie du tampon est de moins de 7 jours, à moins qu'il soit réfrigéré.
- Filtrer avant utilisation pour éliminer les particules dans l'eau (moins probable) ou dans des sels de tampons (plus probable).
- Des tampons de phosphate de pH élevés (en particulier à température élevée) peuvent considérablement réduire la durée de vie de la colonne lors de l'utilisation de colonnes à base de silice.

En savoir plus sur les biocolonnes d'Agilent pour la SEC sur

www.agilent.com/chem/bioHPLC

En partenariat avec vous pour obtenir d'excellents résultats

Les défis croissants exigent de meilleures réponses. Nos solutions permettent aux scientifiques dans le domaine biopharmaceutique d'innover dans la recherche médicale, d'accélérer la découverte de nouveaux médicaments et de renforcer leur confiance tout au long des processus de développement et de fabrication.

En savoir plus sur les solutions d'Agilent pour le secteur biopharmaceutique

www.agilent.com/chem/togetherbiopharma

En savoir plus sur

www.agilent.com/chem/BioHPLC

Retrouvez le centre d'assistance clientèle
Agilent local de votre pays sur

www.agilent.com/chem/contactus

France

0810 446 446

customercare_france@agilent.com

Europe

info_agilent@agilent.com

Asie et Pacifique

inquiry_lsca@agilent.com

Utilisation en recherche uniquement. Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis. Agilent Technologies décline toute responsabilité pour les erreurs pouvant apparaître dans la présente brochure ainsi que pour tout dommage direct ou indirect lié à la fourniture, à la performance ou à l'utilisation de ce matériel.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
imprimé aux États-Unis, le 1er novembre, 2015
5991-3651FR



Agilent Technologies