

Note d'application Axcend – Analyse des protéines intactes

ANALYSE DES PROTÉINES INTACTES PAR HPLC EN PHASE INVERSE À L'AIDE D'UN SYSTEME HPLC PORTABLE

[Cliquez ici pour en savoir plus sur la mini HPLC Axcend Focus LC.](#)

INTRODUCTION

Les produits biopharmaceutiques gagnent en popularité. Ces dernières années, leur nombre est passé d'un seul médicament à sept parmi les dix plus vendus. Les produits biopharmaceutiques sont des protéines et des peptides, tels que les anticorps monoclonaux, qui sont génétiquement modifiés à partir de cellules vivantes. La taille de ces molécules varie généralement de 2 à 2 000 kDa.

Comparés aux petites molécules pharmaceutiques, les produits biopharmaceutiques ont des structures plus complexes et des groupes plus réactifs, ce qui entraîne souvent une stabilité plus faible et des propriétés chimiques plus facilement modifiables. Par conséquent, la quantification, l'identification, l'homogénéité, le contenu en impuretés et l'activité de chaque lot de produits biopharmaceutiques doivent être rigoureusement contrôlés avant leur mise sur le marché.

En raison de la complexité des structures des protéines, des techniques analytiques avancées sont nécessaires pour leur caractérisation, parmi lesquelles la chromatographie liquide capillaire (LC) joue un rôle clé.

RÉSUMÉ

Cette note d'application illustre l'utilisation du système HPLC capillaire portable Axcend Focus LC pour l'analyse des protéines intactes. Plus précisément, elle montre la séparation de cinq protéines tests dont la taille varie de 5,8 à 45 kDa sous des conditions de chromatographie en phase inverse (RPLC). D'autres échantillons de protéines peuvent être analysés à l'aide du Axcend Focus LC en adaptant simplement les méthodes d'HPLC en phase inverse conventionnelles au format de colonne capillaire.

Le passage des méthodes HPLC en phase inverse traditionnelles à la chromatographie capillaire en micro- et nano-débit est un processus simple si certaines directives sont respectées.

- Le débit de la phase mobile doit être considérablement réduit.
- Les autres conditions de séparation (phase stationnaire, température, composition de la phase mobile et programme de gradient) restent pratiquement inchangées.
- Si le rapport entre la longueur de colonne (L) et la taille des particules (dp) est maintenu entre +50 % et -25 % (conformément aux recommandations de la Pharmacopée des États-Unis), alors l'ajustement de la méthode doit commencer par une adaptation du débit de la phase mobile afin de conserver la même vitesse linéaire.
- Plus précisément, le débit doit être ajusté en fonction de la surface transversale de la colonne, qui est proportionnelle au carré du rapport des diamètres de colonne.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Instrument utilisé :

- Axcend Focus LC avec détecteur UV (275 nm)

Colonne :

- CoAnn C4, 1,7 μm FPP, 300 Å, 100 mm

Phase mobile :

- Phase A : 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau
- Phase B : 0,1 % de TFA dans l'acétonitrile

Conditions d'analyse :

- Débit : 1,25 $\mu\text{L}/\text{min}$
- Volume d'injection : 0,2 μL
- Concentration de l'échantillon :
 - 0,25 mg/mL pour l'anhydrase carbonique, la myoglobine, l'insuline humaine et l'ovalbumine
 - 0,1 mg/mL pour le cytochrome C (dans l'eau)
- Température de la colonne : 22°C

Programme de gradient :

Temps (min)	Composition B (%)
0	5
1	30
6	40
14	60
15	95
19	95

RÉSULTATS CHROMATOGRAPHIQUES

Analyte	Masse moléculaire (kDa)	Temps de rétention (min)	%RSD du TR*	Facteur de traînée	Largeur du pic à mi-hauteur (min)
Cytochrome C	12,3	5,70	1,92	1,06	0,11
Insuline	5,8	9,35	1,14	0,93	0,17

Analyte	Masse moléculaire (kDa)	Temps de rétention (min)	%RSD du TR*	Facteur de traînée	Largeur du pic à mi-hauteur (min)
Myoglobine	16,7	10,17	0,70	1,67	0,13
Anhydrase carbonique	30	10,67	0,39	1,28	0,16
Ovalbumine	45	12,89	0,85	0,68	0,21

(*n = 6)

CONCLUSION

- L'Axcend Focus LC est parfaitement adapté à la séparation des biomolécules, telles que les peptides et les protéines.
- Le transfert des méthodes conventionnelles vers la chromatographie capillaire doit inclure une adaptation du débit de la phase mobile en fonction de la section de la colonne.
- Les résultats chromatographiques obtenus avec l'Axcend Focus LC montrent une séparation reproductible d'un mélange de cinq protéines testées (de 5,8 à 45 kDa en 14 minutes).
- Des pics bien définis comparables à ceux d'un HPLC classique sont obtenus pour toutes les protéines.
- Une meilleure résolution et une capacité de séparation accrue peuvent être obtenues en utilisant des colonnes capillaires plus longues.

[Cliquez ici pour en savoir plus sur la mini HPLC Axcend Focus LC.](#)