



抗体异构体的HPLC分析

~ TSKgel 色谱柱的应用总结 ~

东曹（上海）生物科技有限公司
Tosoh Bioscience Shanghai Co., Ltd.
2013.03





背景

关于蛋白质(生物药物)的差异性(不均一性)

- 翻译后的修饰（酶的作用等）
 - 磷酸化（脱磷酸化）、糖基化、脂质化、甲基化、乙酰化、多肽部分的酶切等
 - 焦谷氨酸造成的N末端封闭（阻碍氨基酸序列测定）
- 分解（酶的作用・非酶的作用）
 - 蛋白酶的酶解、脱酰胺、氧化等
- 其他
 - 化学修饰（PEG化等）、变性、聚合等



分析抗体异构体的意义

- 抗体药物「Herceptin」中存在7种异构体的研究结果已经被文献所报道
- 异构体出现原因的特定与解析
 - 氨基酸序列的不同（重组、转录异常）
 - 氧化（Met, Trp）、C末端Lys的分解、N末端焦谷氨酸（Glu）,脱酰胺化（Asn）
 - 二硫键结合的有无（还原性、非还原性）、S-S结合力的不同
 - 复合糖链的不同
- 对于抗体药物性能的影响
 - 免疫抑制效果
 - Fc效应功能
 - 发烧等副作用
 - 溶解性、保存稳定性（分解性）
- 分析、检测方法
 - 液相色谱法（多聚体、变异体、多肽・糖链图谱）
 - 等电聚焦电泳
 - 氨基酸组成・序列分析
 - MALDI-TOF MS
 - CD Spectrum分析、NMR分析



高效液相色谱分析的分离模式

1. 尺寸排阻色谱法（SEC）

- 分子尺寸的不同、多聚体、分解片断

2. 离子交换色谱法（IEC）

- 带电性的不同、氨基酸残基的不同、脱氨基化、N末端和C末端的变化

3. 疏水相互作用色谱法（HIC）

- 立体构造（疏水性）的不同、氨基酸残基的不同、多聚体

4. 反相色谱法（RPC）

- 分子量的不同（疏水性）、氨基酸残基的不同

5. 正相色谱法（NPC/HILIC）

- 亲水性的不同、糖链分析、糖链构造的不同

6. 亲和色谱法（AFC）

- 抗体的糖化的差异



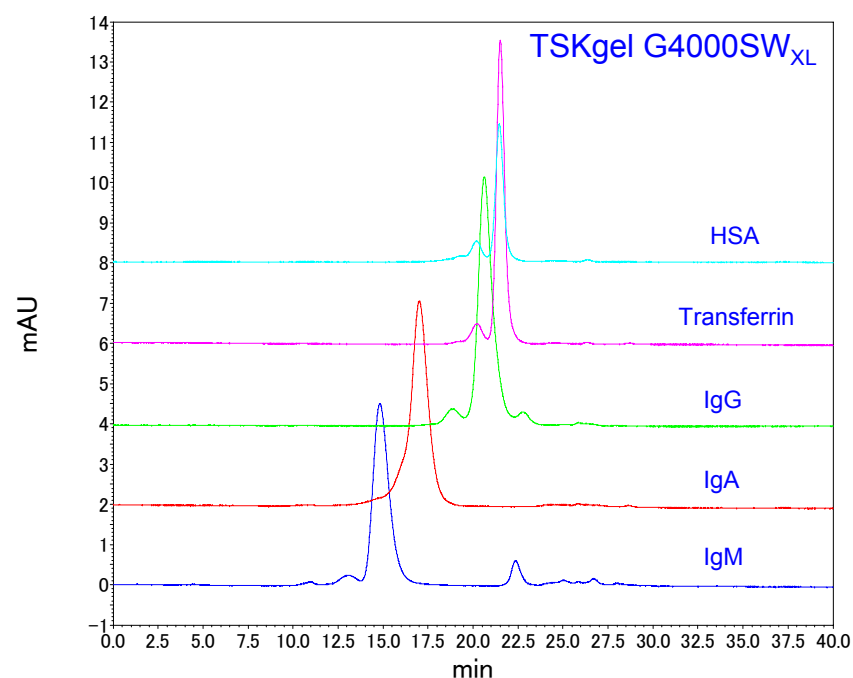
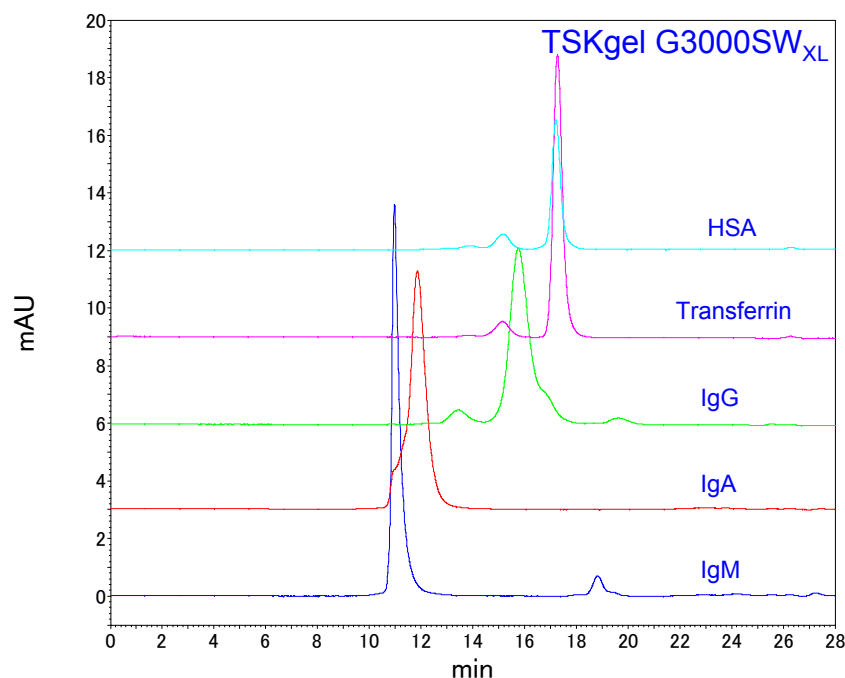
1. 尺寸排阻色谱法(SEC)

Size-Exclusion Chromatography



免疫球蛋白的分离分析

TSKgel G3000SW_{XL}, TSKgel G4000SW_{XL}



色谱条件

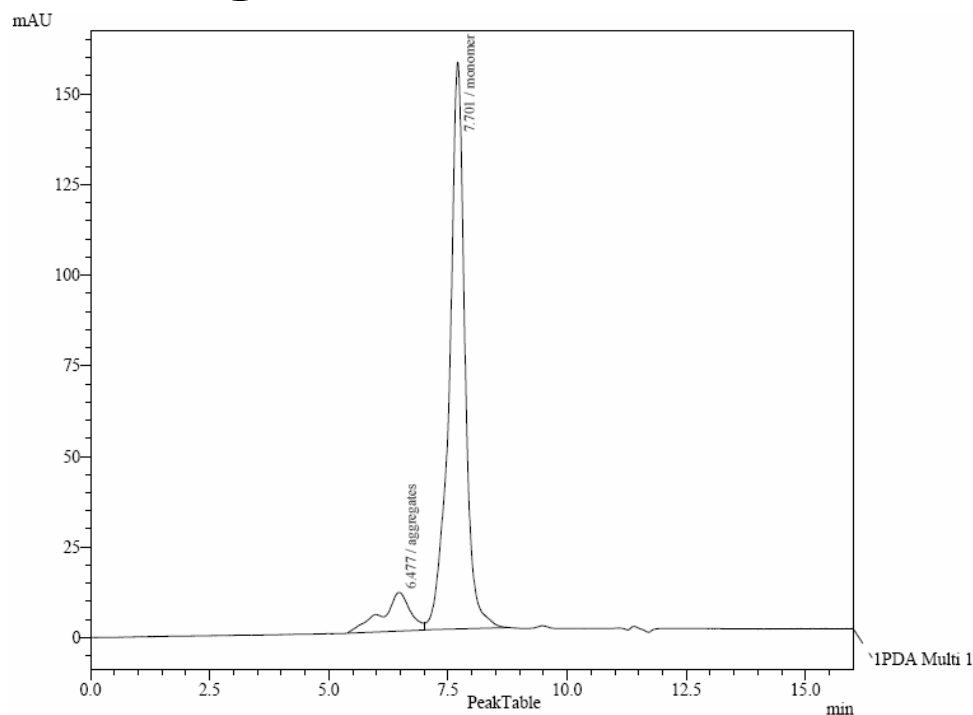
色谱柱: TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mm I.D. x 30cm)
TSKgel G4000SW_{XL} (7.8mm I.D. x 30cm)
流动相: 20mmol/L Phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
流速: 0.5mL/min
检测: UV (280nm)
温度: 25°C

进样体积: 15 μ L
进样浓度: 0.17g/L
样品: 1. Human IgM (from myeloma, M.W.:970kDa)
2. Human IgA (colostrum, M.W.:390kDa)
3. Human IgG (M.W.:150kDa)
4. Transferrin (M.W.:80kDa)
5. Human serum albumin (M.W.:66kDa)



抗体多聚体的SEC分析(1)

TSKgel G3000SW_{XL}



色谱峰	峰面积 %
多聚体	11.08
单体	88.92

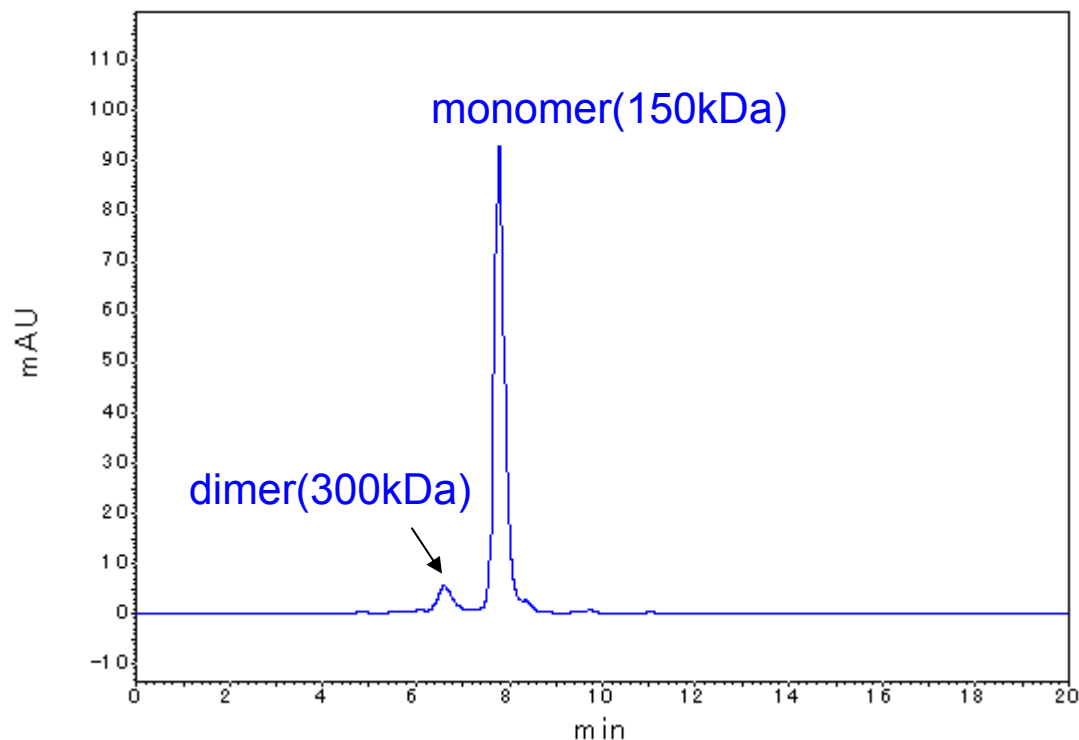
色谱条件

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8 mmID x 30 cm)
流动相 : 0.1 M NaP, 0.1 M NaSulfate, pH 6,7
流速 : 1.0 mL/min
检测 : UV (280nm)
温度 : 室温
进样体积 : 20 μ L
样品 : 人单克隆抗体



抗体多聚体的SEC分析(2)

TSKgel SuperSW3000



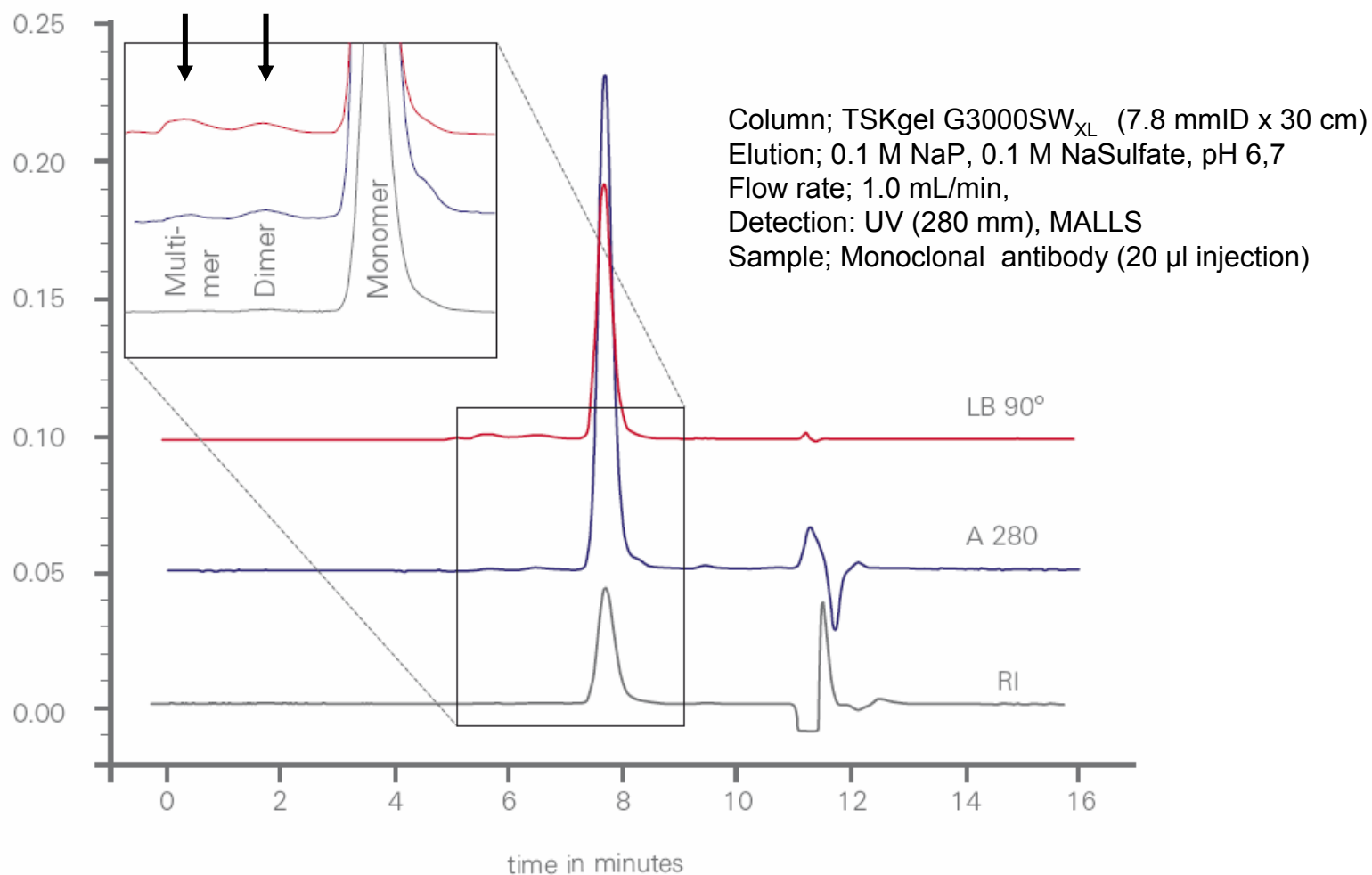
色谱条件

色谱柱 : TSKgel SuperSW3000 (4.6mm I.D. x 30cm)
流动相 : 20mmol/L phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
流速 : 0.35mL/min
检测 : UV (280nm)
温度 : 室温
进样体积 : 5 μ L
样品 : 人单克隆抗体(4.6g/L, IgG1)



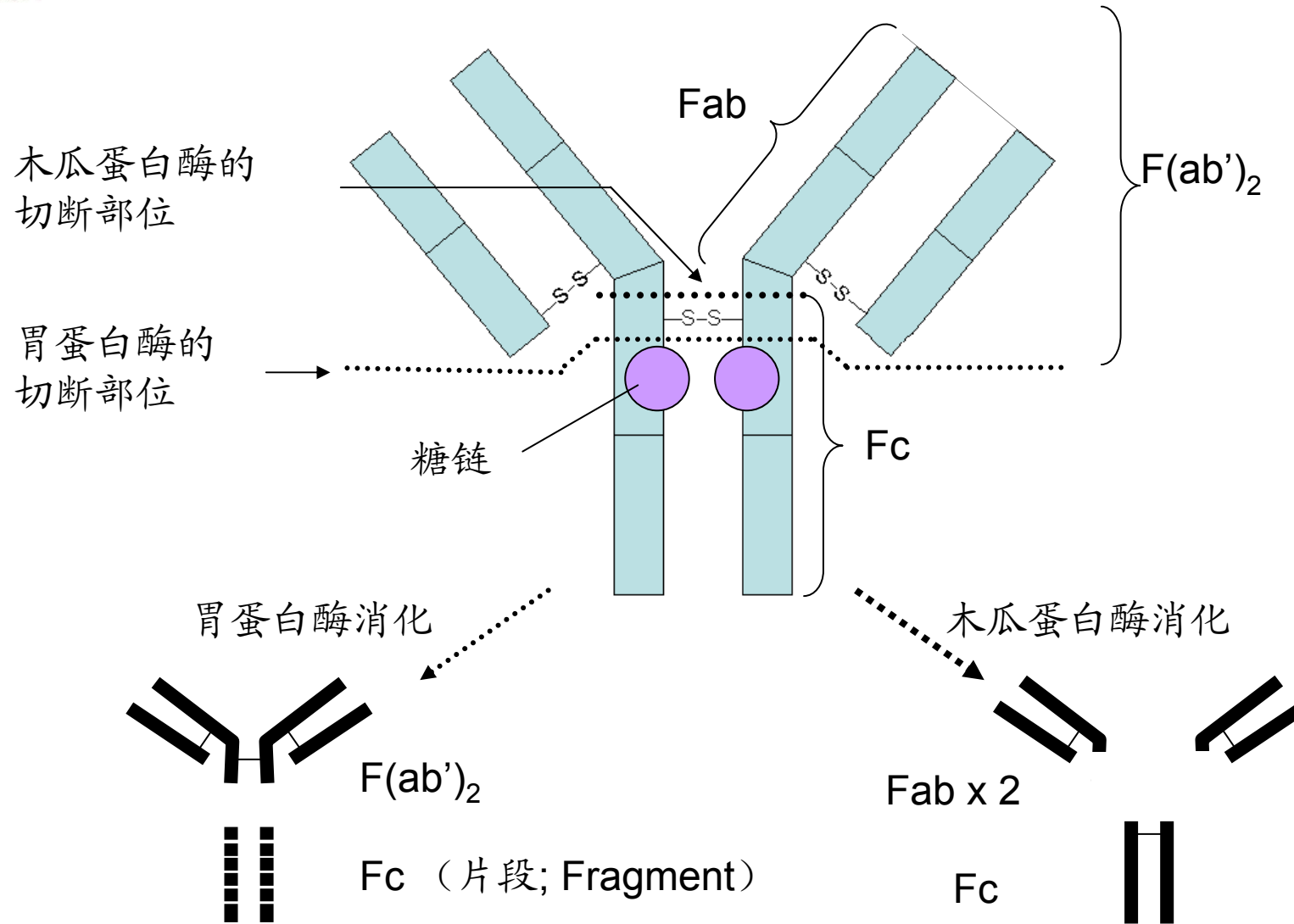
SEC-MALLS法单抗多聚体的分离分析

MALLS: 多角度激光光散射检测器



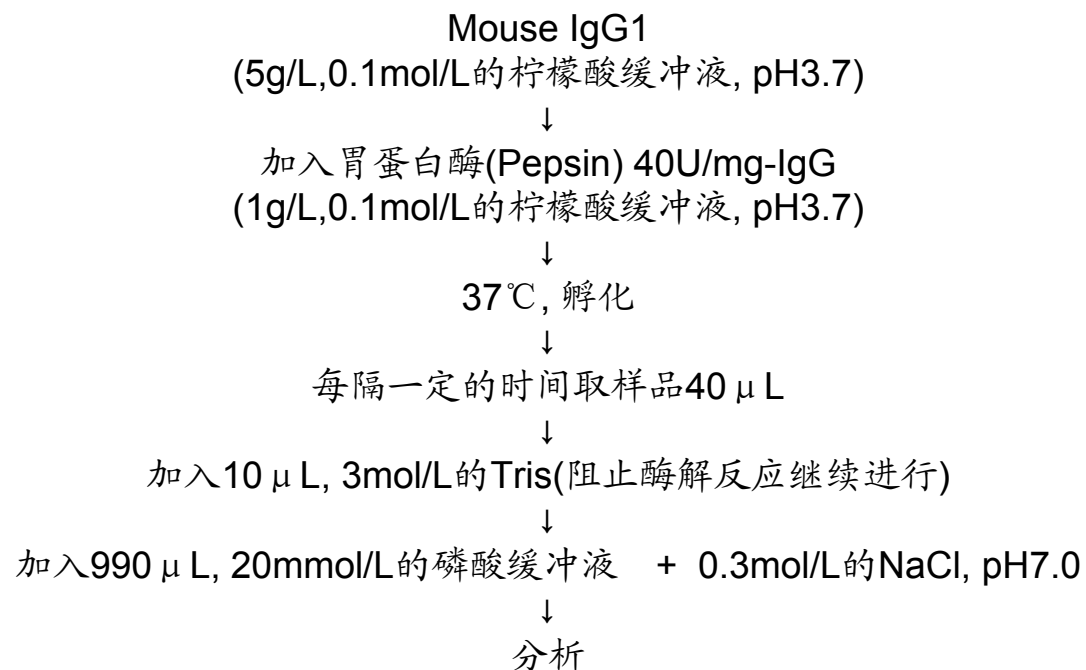


抗体 (IgG) 的构造及酶切位点





胃蛋白酶酶解抗体的过程跟踪

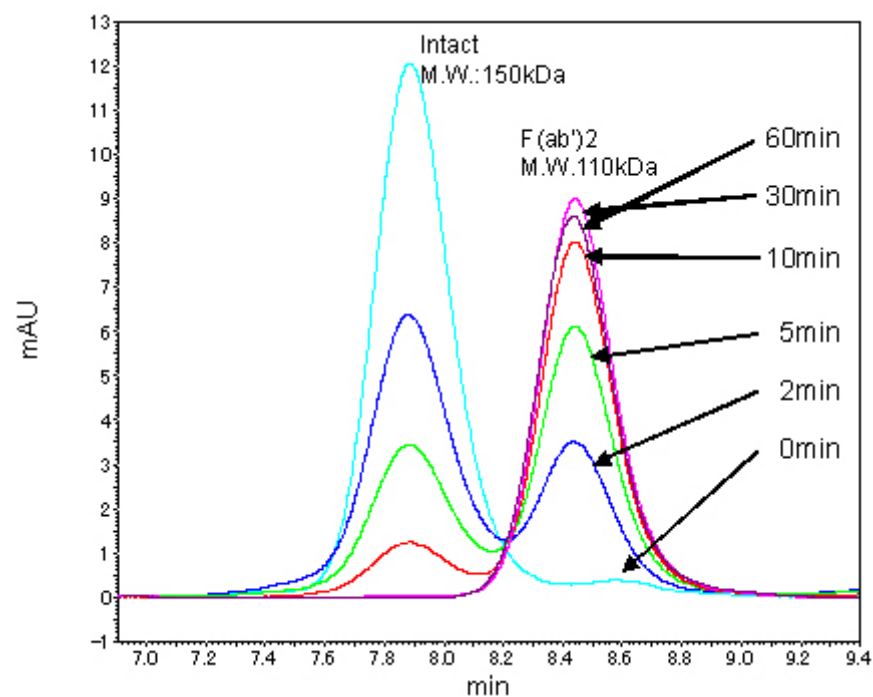
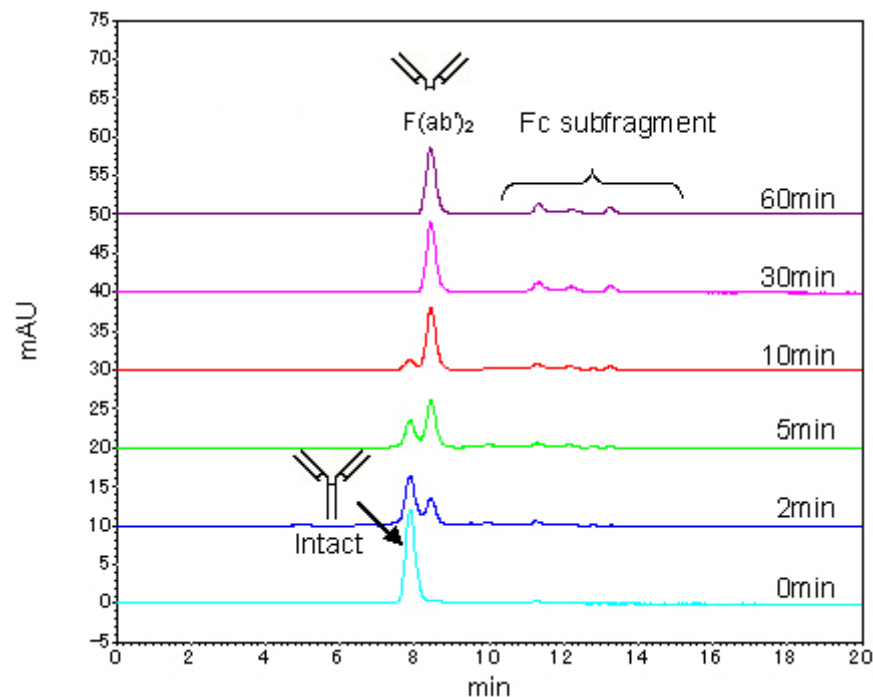


胃蛋白酶(Pepsin): from porcine gastric mucosa,
Sigma P7012, 2540Units/mg



胃蛋白酶酶解抗体的过程跟踪

TSKgel G3000SW_{XL}

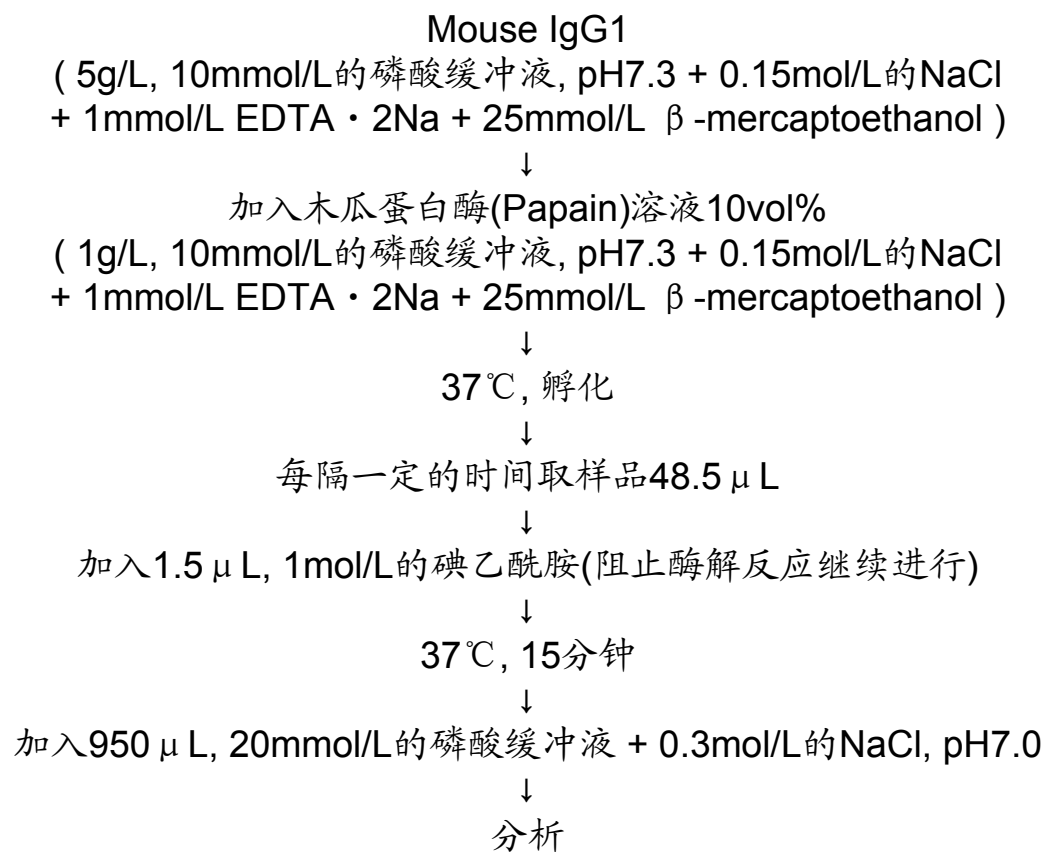


色谱条件

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mm I.D. x 30cm)
流动相 : 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
流速 : 1.0mL/min
检测 : UV (280nm)
温度 : 室温
进样体积 : 10 μ L
样品浓度 : 0.19g/L



木瓜蛋白酶酶解抗体的过程跟踪



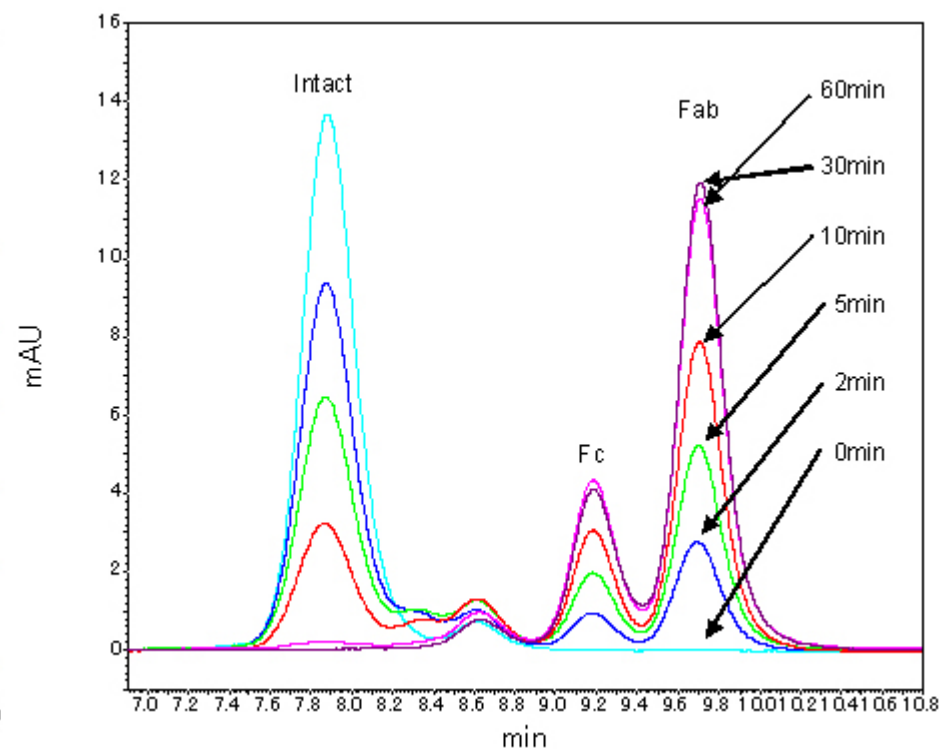
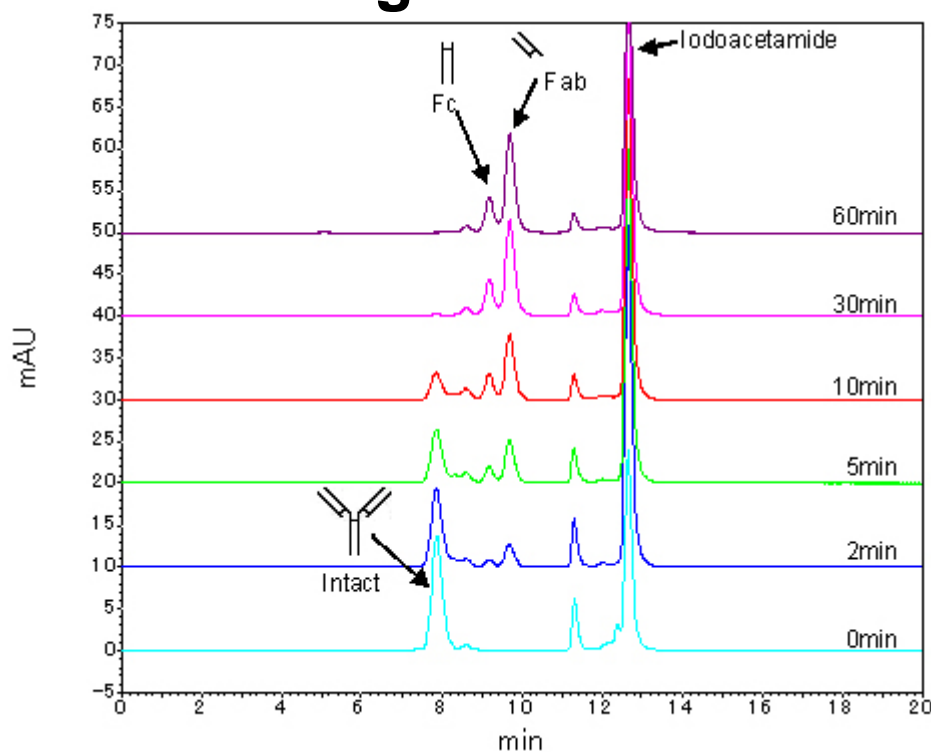
木瓜蛋白酶(Papain): from papaya latex
Sigma P4762, 14Units/mg protein



TOSOH

木瓜蛋白酶酶解抗体的过程跟踪

TSKgel G3000SW_{XL}

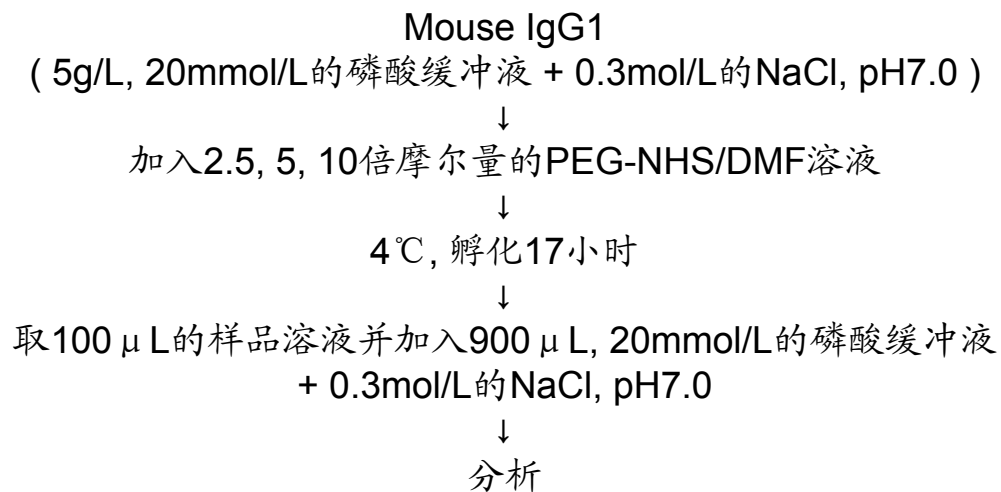


色谱条件

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mm I.D. x 30cm)
 流动相 : 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV (280nm)
 温度 : 室温
 进样体积 : 10 μ L
 样品浓度 : 0.24g/L



单抗PEG化的分析(PEG:5KD)

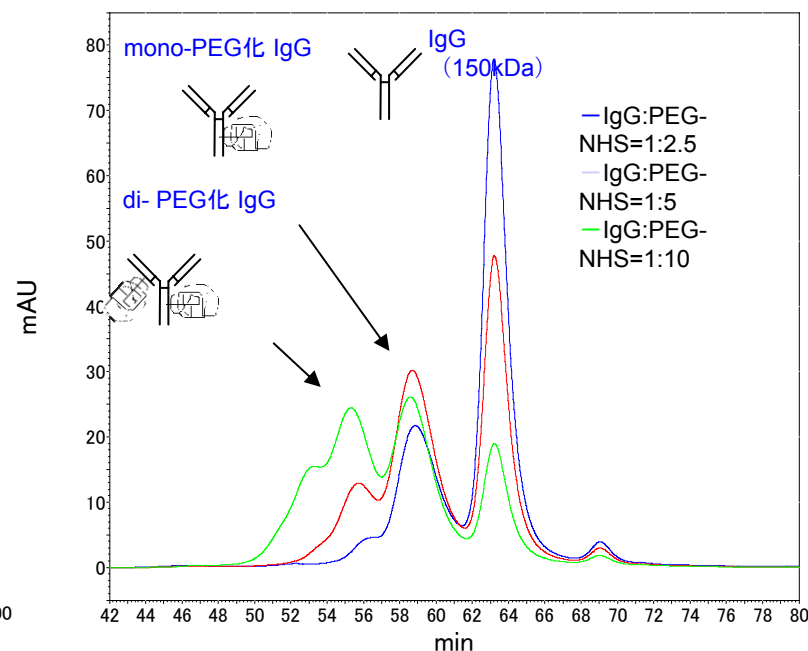
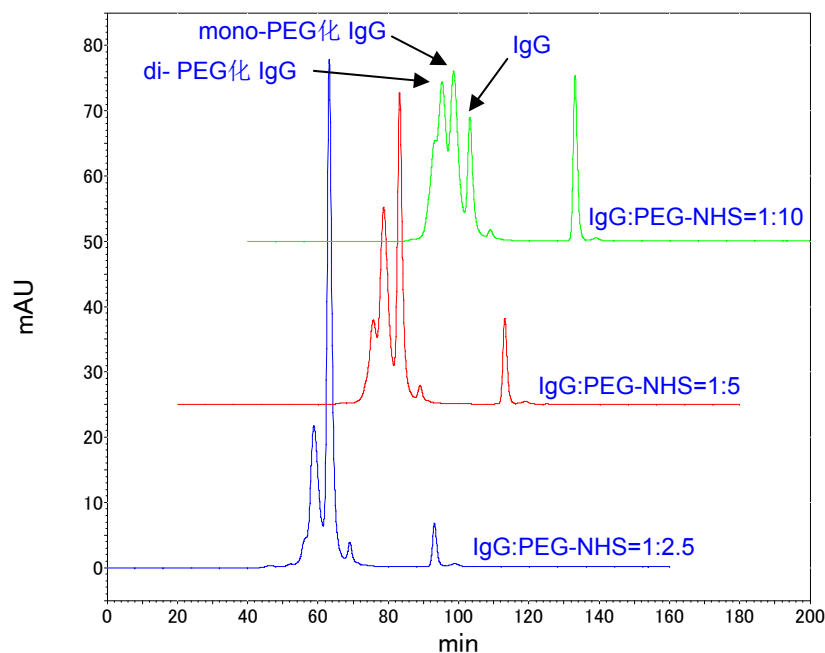


PEG-NHS: PEG, N-hydroxysuccinimidyl ester
SUNBRIGHT ME-050CS, M.W.:5000, NOF
CORPORATION, JAPAN



单抗PEG化的分析(PEG:5KD)

TSKgel G3000SW_{XL}



色谱条件

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm), 2 columns
 流动相: 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流速 : 0.25mL/min
 检测 : UV (280nm)
 温度 : 25℃
 进样体积 : 20 μL
 样品浓度 : 0.5g/L



半抗原结合抗体片段的分析

碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase; ALP)
(5g/L)



加入1, 2, 4倍摩尔量的DNP-X-NHS/DMF溶液



4℃, 孵化17小时



加入抗DNP的抗体片段(Fab)



分析

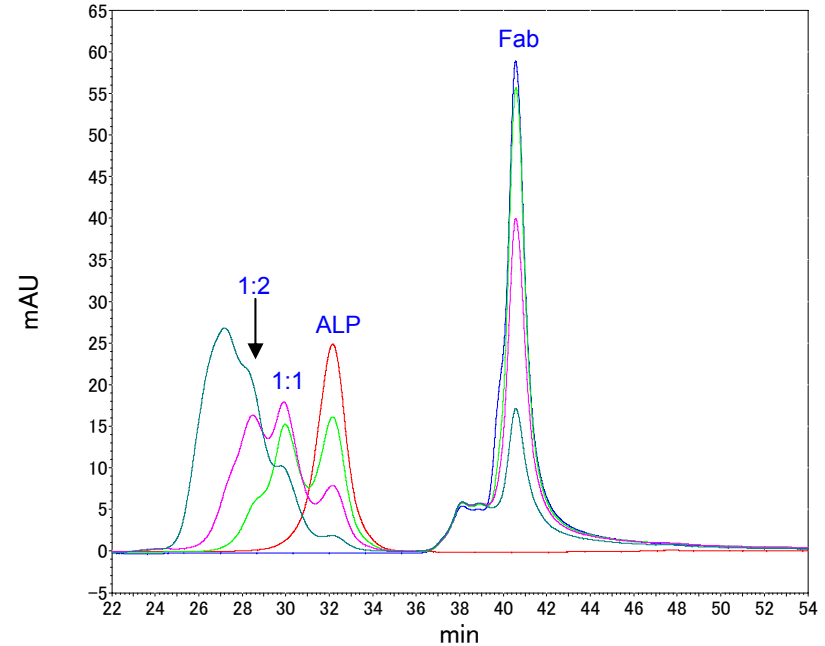
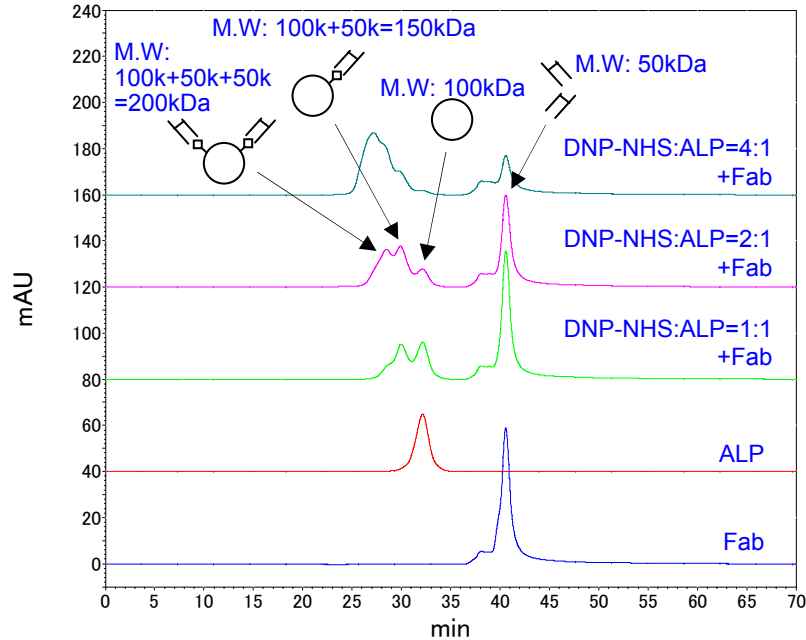
DNP-X-NHS: AnaSpec, Cat#81228

抗DNP的抗体片段: 使用木瓜蛋白酶酶解抗DNP 鼠单抗(Cosmo Bio, Cat#LO-DNP-61)至Fab, 并通过分子尺寸排阻色谱法(SEC)分离纯化而得。



半抗原结合抗体片段的分析

TSKgel G3000SW_{XL}



色谱方法

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流动相 : 20mmol/L phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流速 : 0.25mL/min
 检测 : UV (280nm)
 温度 : 25℃
 进样体积 : 20 μL
 样品浓度 : DNP-ALP; 0.67g/L, anti DNP Fab; 1g/L



用于mAb分析的SEC分离方法的要求

- mAb 单体和二聚体/片断的高分辨率
- mAb 单体和二聚体的高通量分析
- mAb 多聚体的高分辨率
- 减少lot-to-lot差异
- 更长的色谱柱使用寿命
- 减少非特异性吸附
- 峰形对称性，特别对于多聚体



抗体分析用新型SEC色谱柱（3月正式上市）

2013年3月全球同步上市

TSKgel	特征和主要用途
SuperSW mAb HR (4 um, 7.8 mmID x 30 cm)	<ul style="list-style-type: none">• 二聚体/单体/抗体片段的高分辨率分离分析• R&D (过程物性评价), 品质管理
SuperSW mAb HTP (4 um, 4.6 mmID x 15 cm)	<ul style="list-style-type: none">• 二聚体含量的超高速、短时间评价分析• R&D (Screening/筛选), 品质管理
UltraSW Aggregate (3 um, 7.8 mmID x 30 cm)	<ul style="list-style-type: none">• 多聚体（二聚体以上）的高分辨率分离分析• R&D (过程物性评价)

- TSKgel SuperSW mAb HTP色谱柱并不是用于UHPLC的色谱柱。
- 适合常规的HPLC系统、价格合理、分析迅速。



色谱柱填料的特点

色谱柱	TSKgel SuperSW mAb HR	TSKgel SuperSW mAb HTP	TSKgel UltraSW Aggregate
尺寸	7.8 mm ID x 30 cm	4.6 mm ID x 15 cm	7.8 mm ID x 30 cm
填料基质	硅胶		硅胶
官能团	二醇基		二醇基
粒径	4 μm		3 μm
孔径	25 nm		30 nm
分离范围 (以球形蛋白为例)	10,000 - 500,000 Da		10,000 - 2,000,000 Da
应用	mAb单体和二聚体的分离	mAb单体和二聚体的 快速分析 (UHPLC 适用).	mAb多聚体的分析



产品线及其规格

分析柱

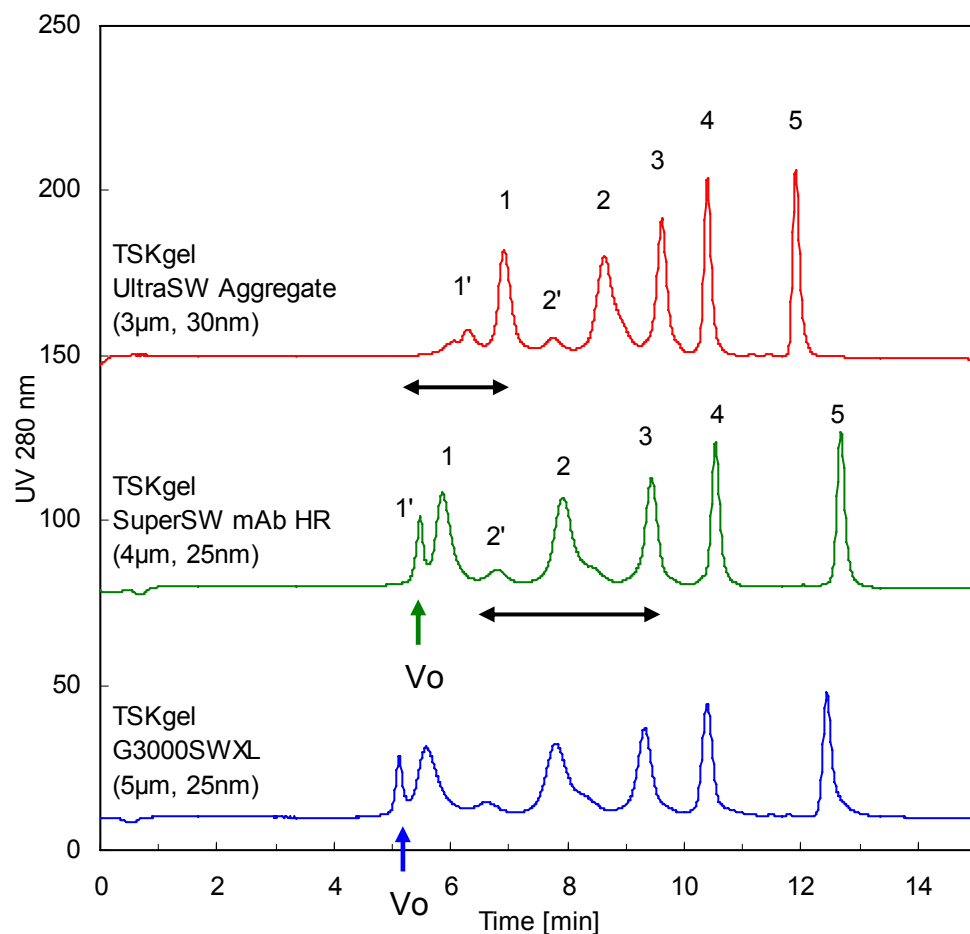
货号	品名	色谱柱尺寸 (mm I.D. x cm)	理论塔板数	对称性
0022854	TSKgel SuperSW mAb HR	7.8 x 30	$\geq 30,000$	1.2 – 1.8
0022855	TSKgel SuperSW mAb HTP	4.6 x 15	$\geq 15,000$	0.8 – 1.4
0022856	TSKgel UltraSW Aggregate	7.8 x 30	$\geq 35,000$	1.2 – 1.8

保护柱

货号	品名	色谱柱尺寸 (mm I.D. x cm)	对应分析柱的 货号
0022857	TSKgel guardcolumn SuperSW mAb	6.0 x 4	0022854
0022858	TSKgel guardcolumn SuperSW mAb	3.0 x 2	0022855
0022859	TSKgel guardcolumn UltraSW	6.0 x 4	0022856



标准蛋白的色谱图的比较



色谱条件
色谱柱:

流动相:

流速:

温度:

检测:

上样量:

样品:

TSKgel UltraSW Aggregate (7.8 mmID x 30 cm),
TSKgel SuperSW mAb HR(7.8 mmID x 30 cm),
TSKgel G3000SWXL (7.8 mmID x 30 cm)

200 mmol/L phosphate buffer (pH 6.7) + 0.05% NaN₃

1.0 mL/min

25°C

UV 280 nm

10 µL

1 thyroglobulin (MW 640,000) (0.5 g/L)

(1' thyroglobulin multimers)

2 γ-globulin (MW 155,000) (1.0 g/L)

(2' γ-globulin dimer)

3 ovalbumin (MW 47,000) (1.0 g/L)

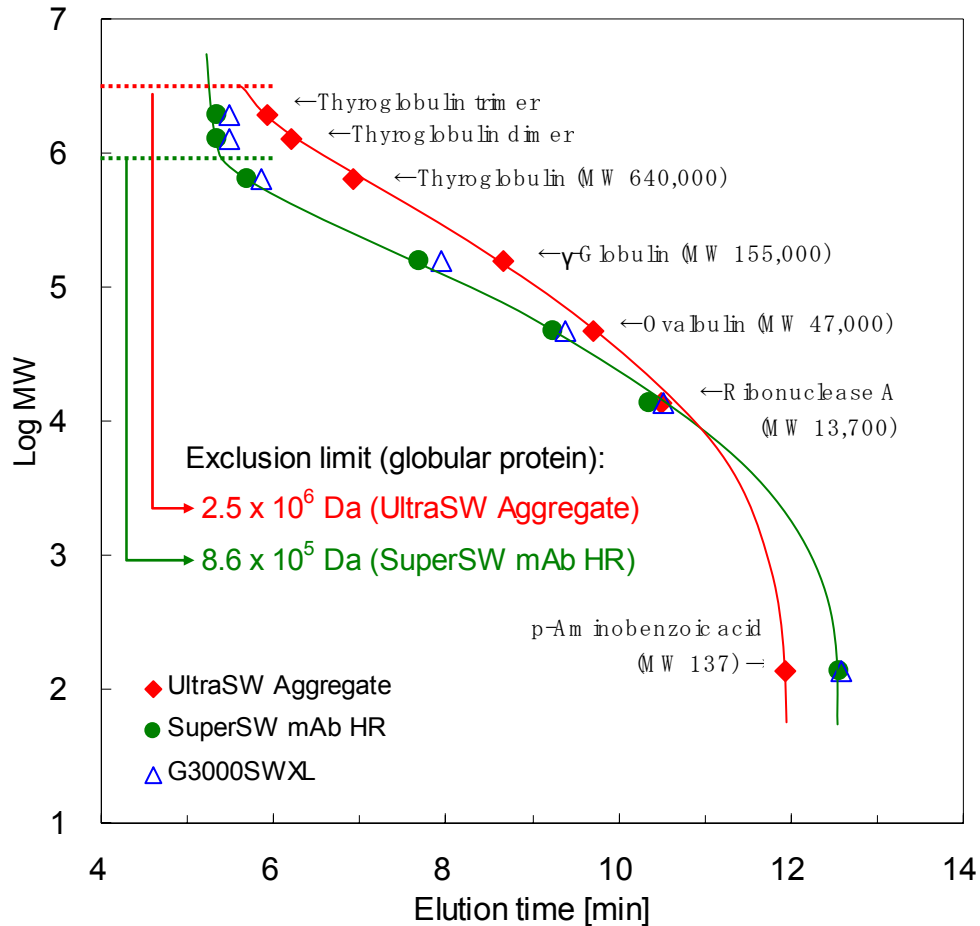
4 ribonuclease A (MW 13,700) (1.5 g/L)

5 p-aminobenzoic acid (MW 137) (0.01 g/L)

- **SuperSW mAb HR** 显示了对于丙球蛋白二体和单体，丙球蛋白和卵白蛋白的更高的分离度，尽管它和G3000SWXL的校正曲线是相似的。
- **UltraSW Aggregate** 显示了对于甲状腺球蛋白单体和二聚体更高的分离度，并且对于甲状腺球蛋白的多聚体区域也有更宽的分趋势。



标准蛋白的校正曲线



• TSKgel UltraSW Aggregate:

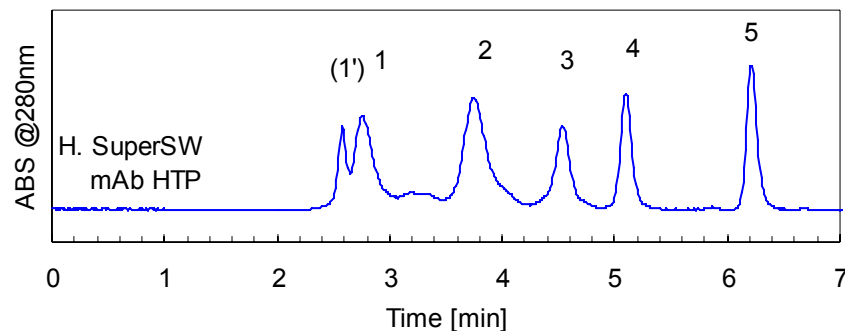
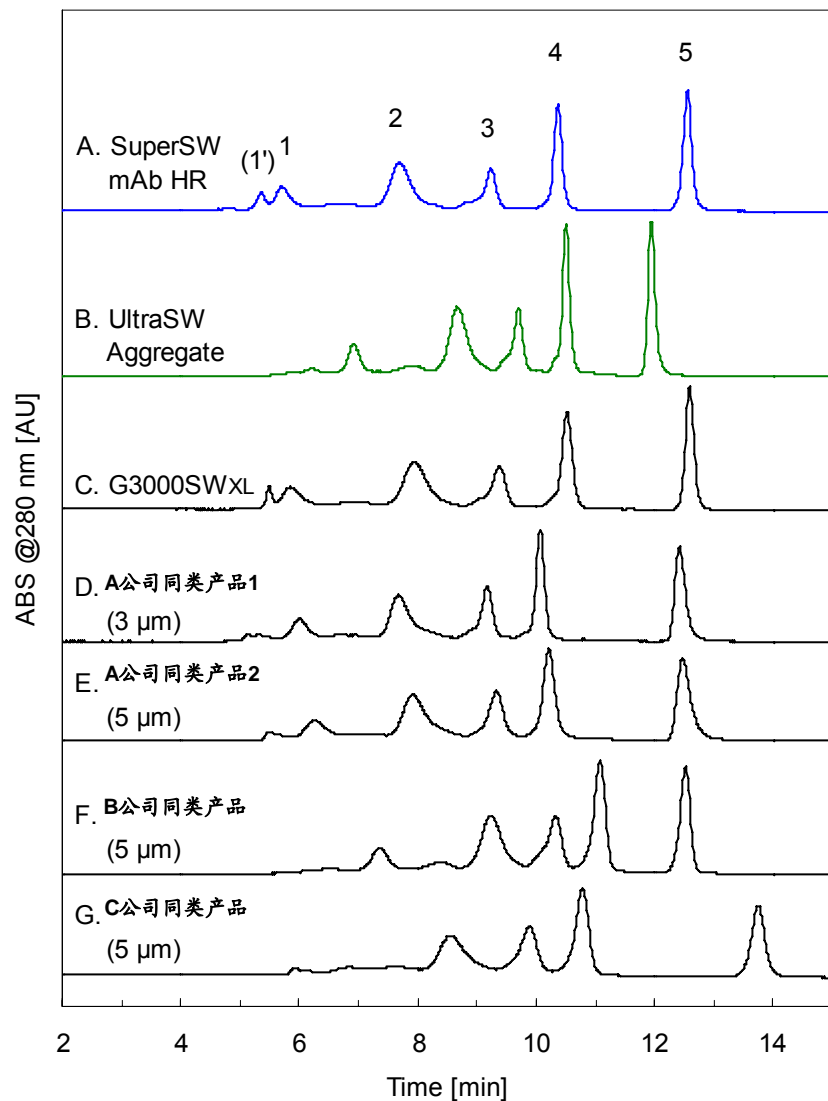
- 覆盖了上至2百万的分子量范围，使其对于mAb聚集体/多聚体具有更好的分辨率。

• TSKgel SuperSW mAb HR:

- 与G3000SWXL的校正曲线相似，并且在丙球蛋白分子量附近具有比UltraSW更平缓的斜率。



几种不同色谱柱对于标准蛋白的色谱图



色谱柱规格: A-E: 7.8 mm ID x 30 cm
F&G: 8.0 mm ID x 30 cm
H: 4.6 mm ID x 15 cm

流动相: 0.2 mol/L phosphate buffer, pH 6.7 + 0.05% NaN₃

流速: A-G: 1.0 mL/min H: 0.35 mL/min

温度: 25°C

检测: UV280 nm

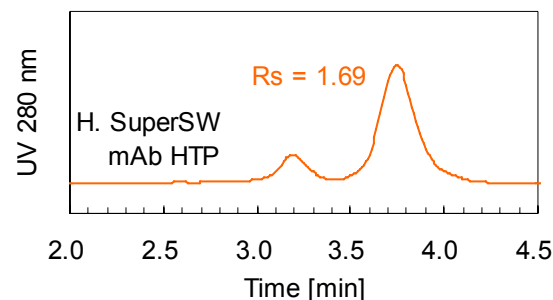
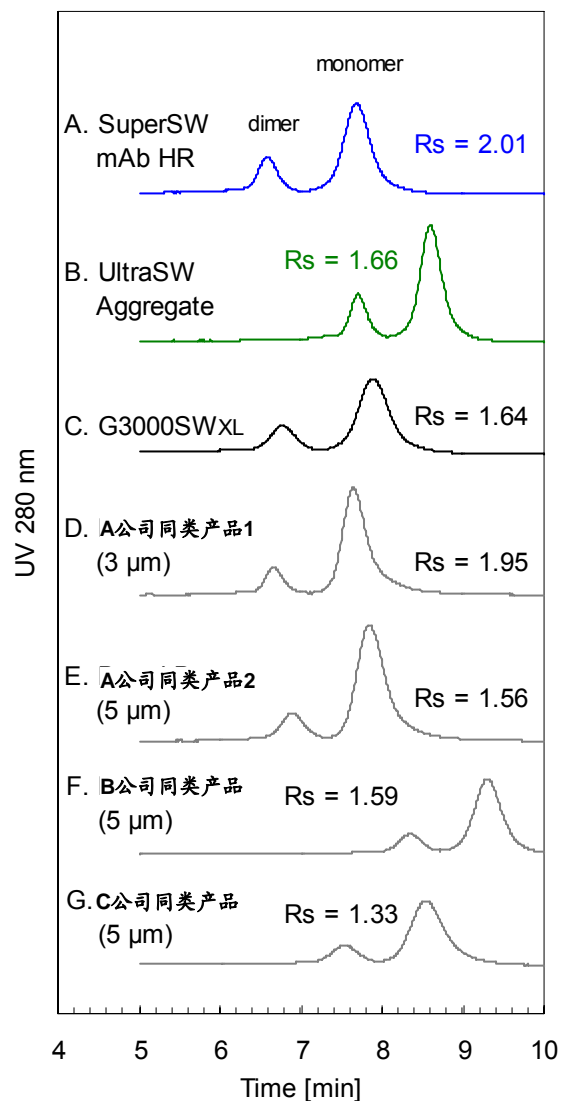
上样量: A-G: 10 μL H: 3.5 μL

样品: 1 thyroglobulin (MW 640,000) (A-G: 0.5 g/L H: 2.0 g/L)
(1') thyroglobulin oligomer
2 γ-globulin (MW 155,000) (A-G: 1.0 g/L H: 1.5 g/L)
3 ovalbumin (MW 47,000) (A-G: 1.0 g/L H: 1.5 g/L)
4 ribonuclease A (MW 13,700) (1.5 g/L)
5 p-aminobenzoic acid (MW 137) (0.01 g/L)

新款 TSKgel SEC 色谱柱显示了其超过其他色谱柱的卓越表现。



mAb 二聚体和单体分离度的比较



色谱条件

流动相:

200 mmol/L phosphate buffer (pH 6.7) + 0.05% NaN_3

流速:

A-G. 1.0 mL/min, H. 0.35 mL/min

温度:

25°C, 检测: UV 280 nm

上样量:

A-G. 10 μL H. 3.5 μL

样品:

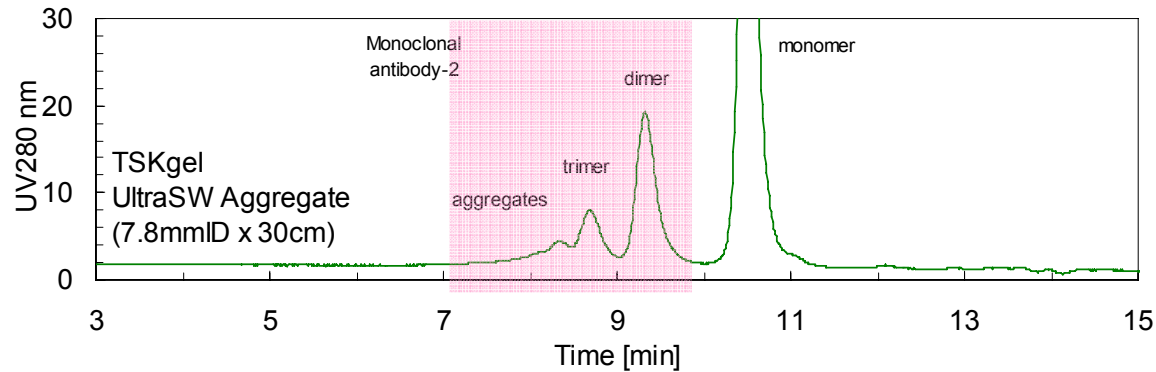
IgG (human polyclonal) (A-G: 1.0 g/L, H: 4.5 g/L)

- **TSKgel SuperSW mAb HR** 显示了对于丙球蛋白二聚体和单体卓越的分离度。
- **TSKgel SuperSW mAb HTP** 显示了对于丙球蛋白二聚体和单体良好的分离度，但是分析时间仅为常规色谱柱的一半。



TOSOH

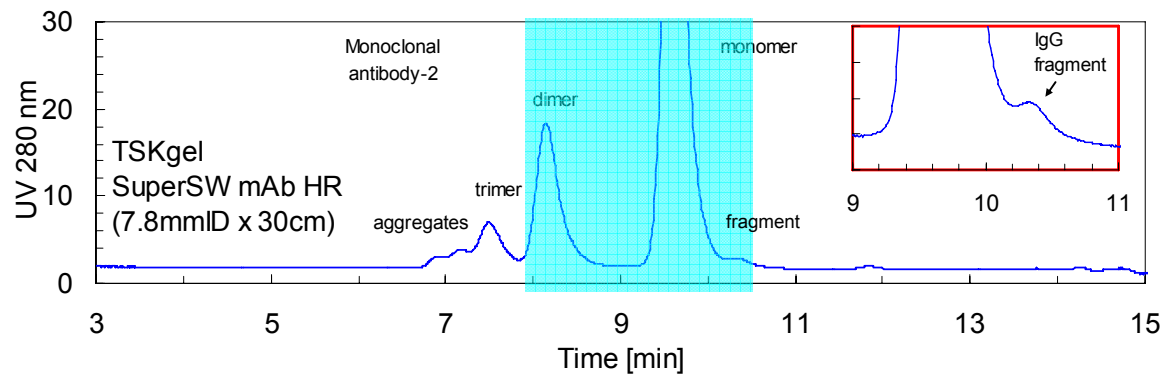
单抗药物的分离



TSKgel UltraSW Aggregate 显示了对于mAb三聚体和二聚体卓越的分离度。

$$Rs(3mer/2mer) = \underline{1.40}$$

$$Rs(2mer/monomer) = 2.89$$

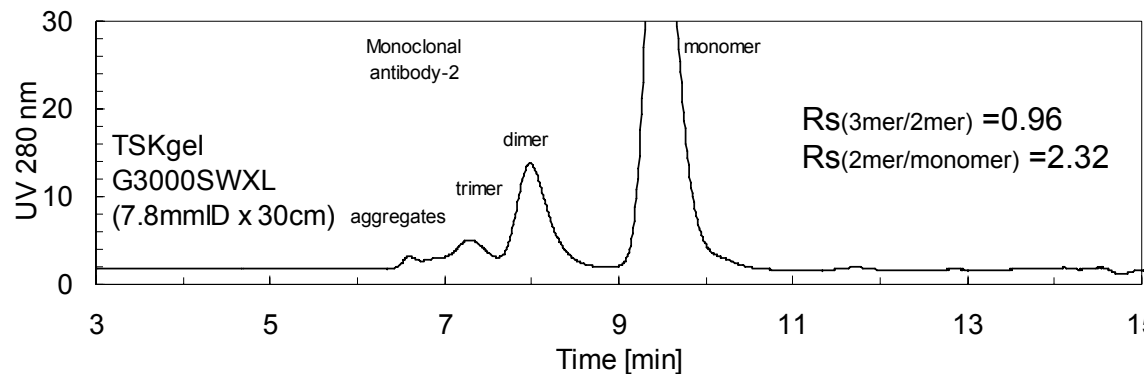


TSKgel SuperSW mAb HR 显示了对于单抗二聚体、单体、片断卓越的分离度。

$$Rs(3mer/2mer) = 1.32$$

$$Rs(2mer/monomer) = \underline{3.11}$$

$$Df(mono./fragment) = \underline{0.095}$$



色谱柱: TSKgel UltraSW Aggregate (7.8 mm ID x 30 cm)

TSKgel SuperSW mAb HR (7.8 mm ID x 30 cm)

流动相: 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 6.7) + 0.05%

NaN_3

流速: 0.8 mL/min

检测: UV(280 nm)

温度: 25°C

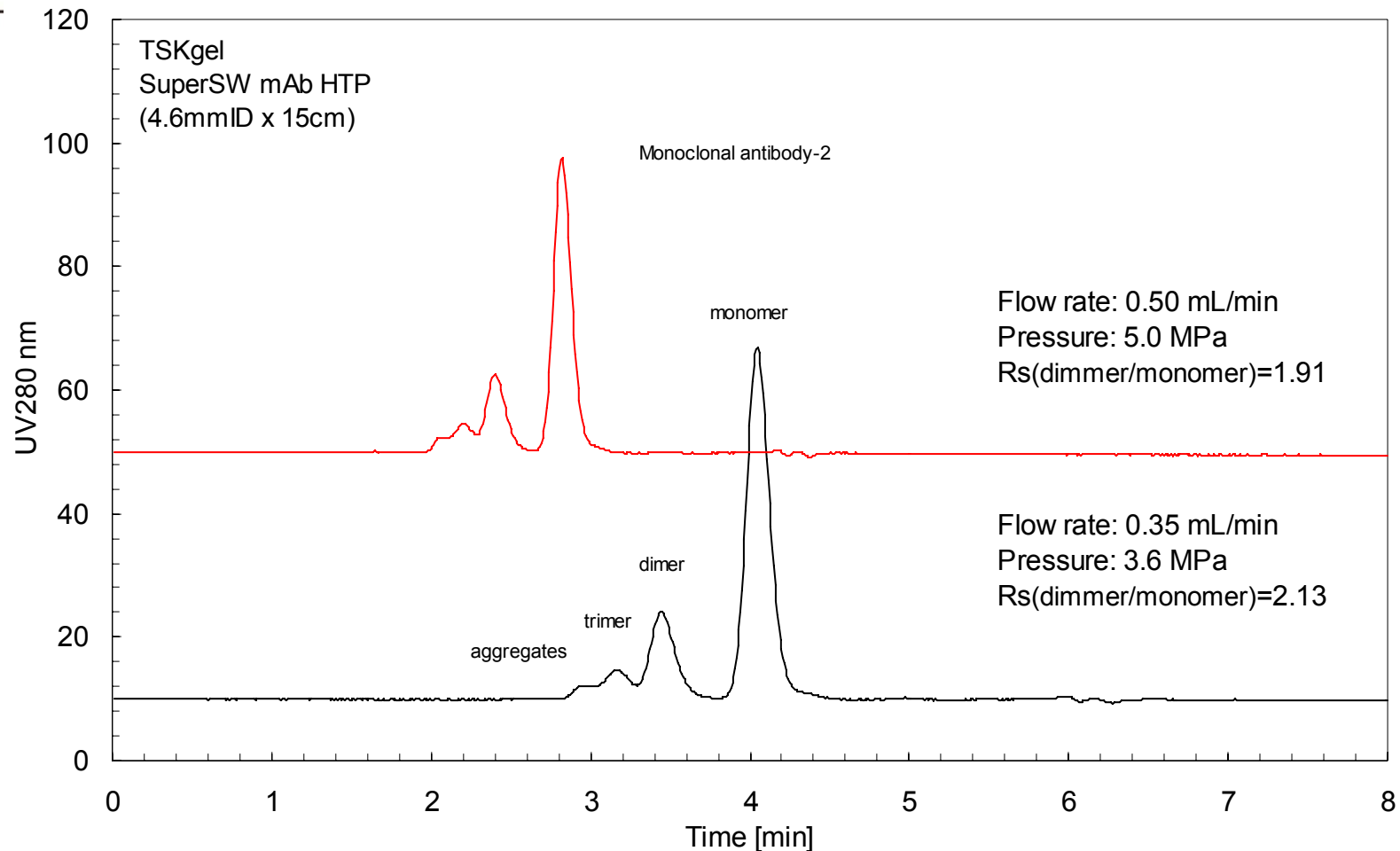
样品: monoclonal antibody-2

(mouse-human chimeric IgG, Erbitux), 10 uL



TOSOT

单抗药物的快速分析



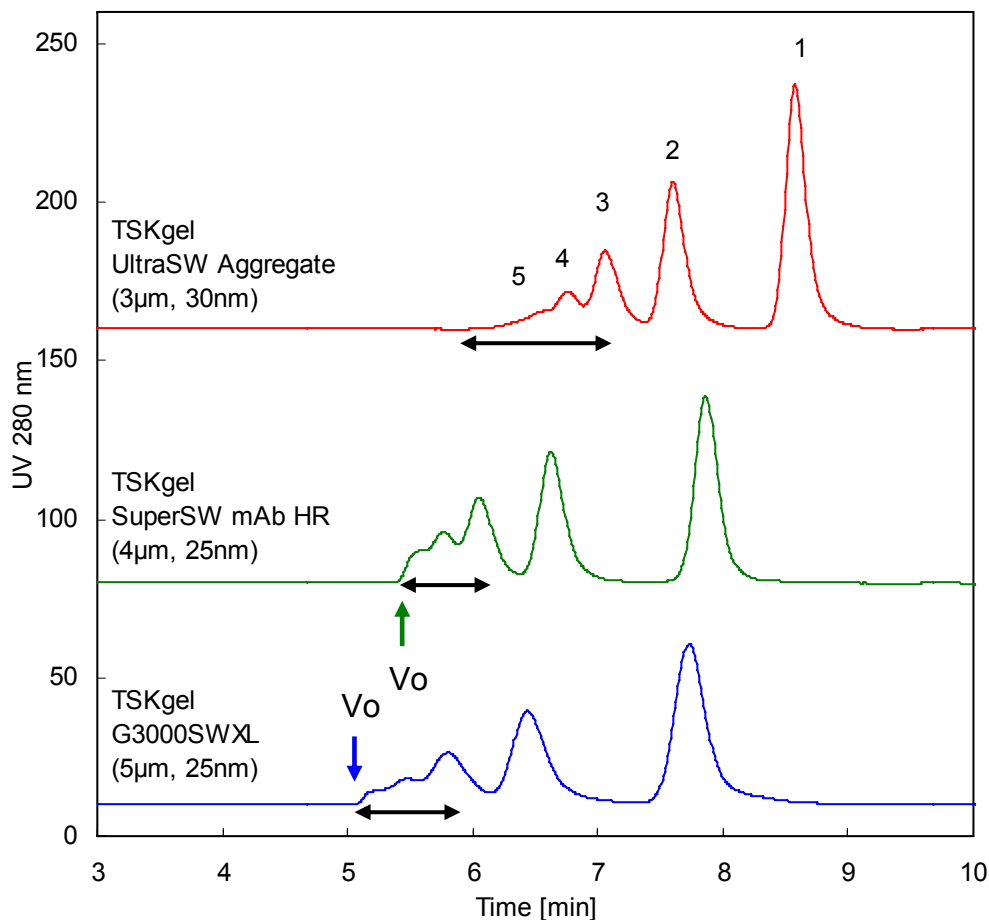
色谱柱: TSKgel SuperSW mAb HTP (4.6 mm ID x 15 cm)
流动相: 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 6.7) + 0.05% NaN_3
流速: 0.50 mL/min, 0.35 mL/min;
检测: UV 280 nm
温度: 25°C;
样品: monoclonal antibody-2 (mouse-human chimeric IgG, Erbitux), 5 μL

TSKgel SuperSW mAb HTP

显示了对于mAb二聚体和单体很好的分离度，即使是在高流速下，压力仍然保持在较低水平。



对于IgG多聚体的分离比较



色谱条件
色谱柱:

流动相:
流速:
温度:
检测:
上样量:
样品:

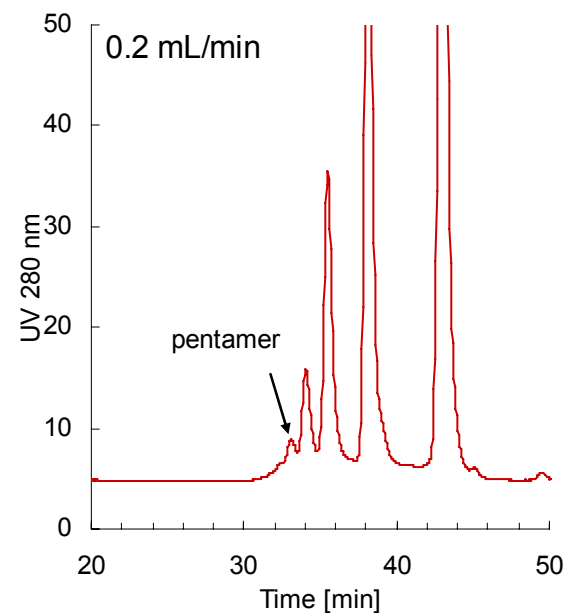
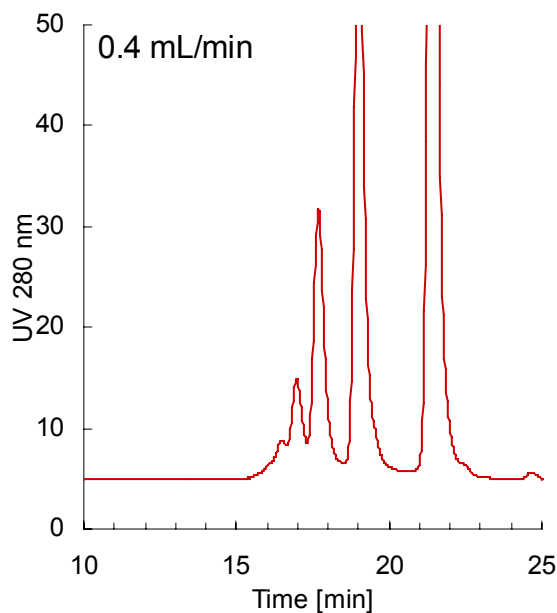
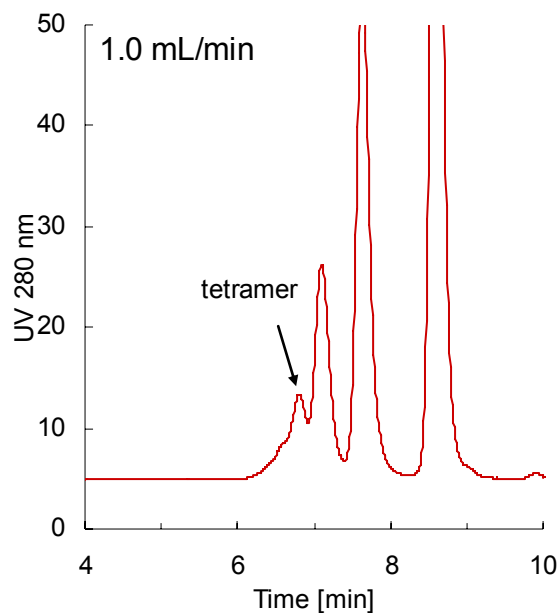
TSKgel UltraSW Aggregate (7.8 mmID x 30 cm),
TSKgel SuperSW mAb HR(7.8 mmID x 30 cm),
TSKgel G3000SWXL (7.8 mmID x 30 cm)
200 mmol/L phosphate buffer (pH 6.7) + 0.05% NaN₃
1.0 mL/min
25°C
UV 280 nm
20 µL
IgG (human monoclonal, BI-MAb-02, 2.5 g/L)
(1 monomer, 2 dimer, 3 trimer, 4 tetramer, 5 multimers)

UltraSW Aggregate:

显示了对于多聚体区域更宽的分
离趋势 (三聚体以上)



流速对于多聚体分离的影响



色谱条件

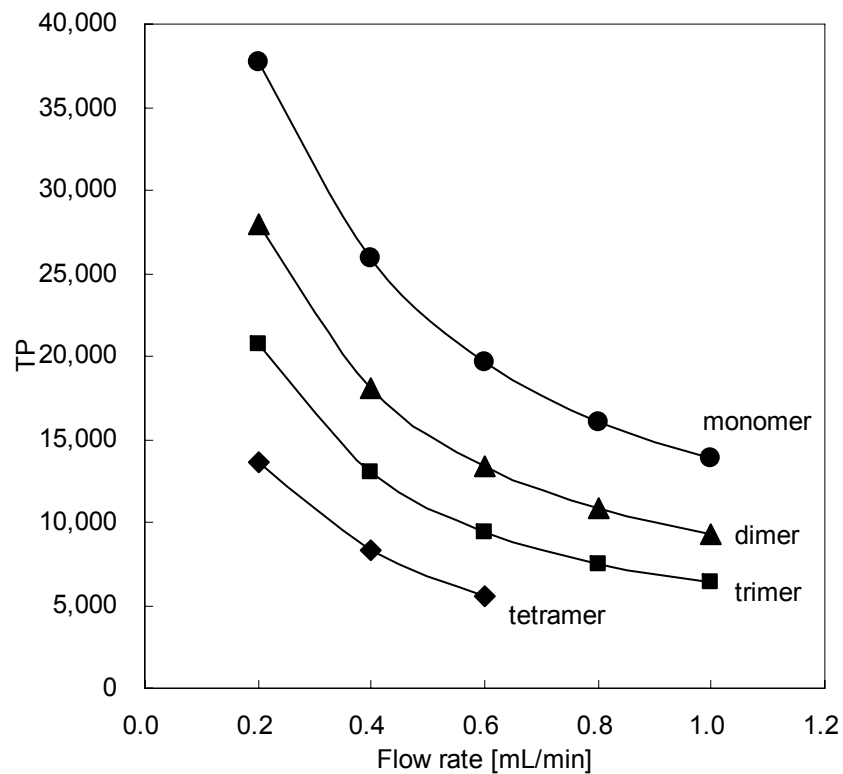
色谱柱: TSKgel UltraSW Aggregate (7.8 mmID x 30 cm)
流动相: 200 mmol/L phosphate buffer (pH 6.7) + 0.05% NaN₃
流速: 0.2~1.0 mL/min
温度: 25°C
检测: UV 280 nm
上样量: 10 µL
样品: IgG (human monoclonal, BI-MAb-02, 5 g/L)

•在UltraSW Aggregate上, 采用较低流速 (≤ 0.4 mL/min) 时, 可分离出五聚体。

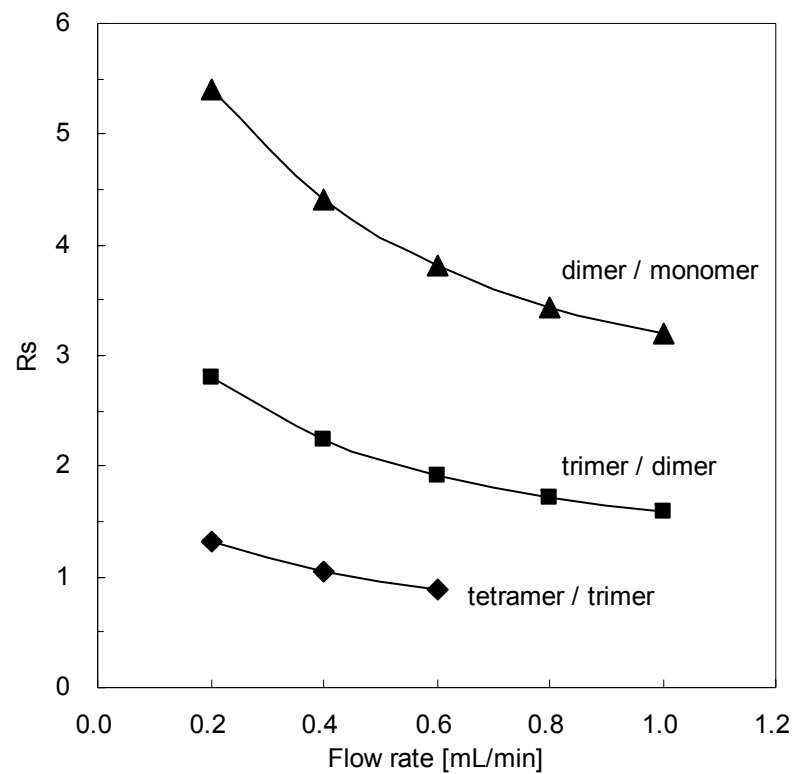


流速对于分离的影响

理论塔板数和流速



分离度和流速

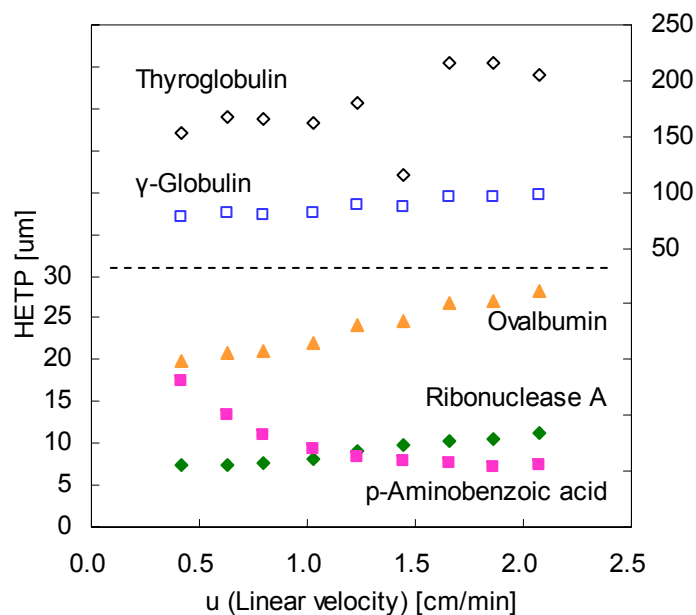


• 流速越低，柱效越高！

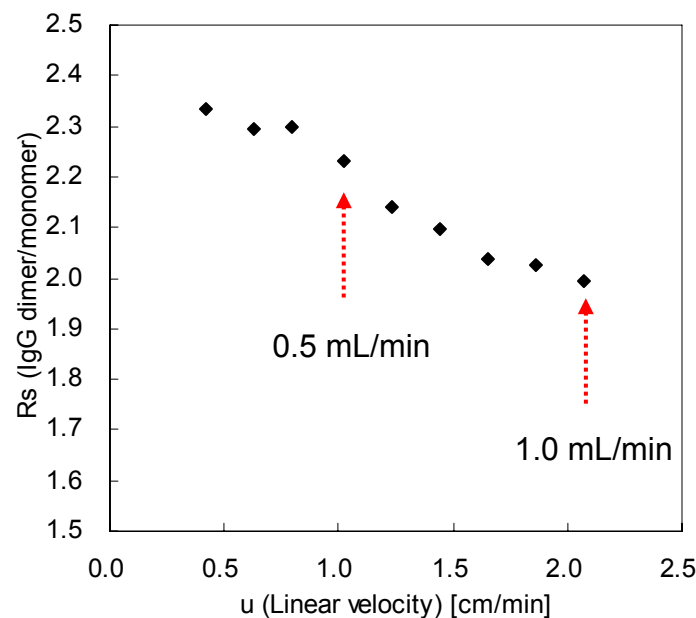


流速的影响 (TSKgel SuperSW mAb HR)

van Deemter plot



分离度 (IgG 二聚体和单体)



色谱条件

色谱柱:

流动相:

流速:

检测:

样品:

TSKgel SuperSW mAb HR(7.8 mmID x 30 cm)

100 mmol/L phosphate buffer (pH 6.7)

+ 100 mmol/L Na₂SO₄ + 0.05% NaN₃

0.20~1.00 mL/min, Temperature: 25°C

UV 280 nm, 上样量: 10 μL

1. Thyroglobulin (MW 640,000) (1.5 g/L)

2. γ-Globulin (MW 155,000) (1.5 g/L)

3. Ovalbumin (MW 47,000) (1.5 g/L)

4. Ribonuclease A (MW 13,700) (1.5 g/L)

5. p-Aminobenzoic acid (MW 137) (0.01 g/L)

色谱条件

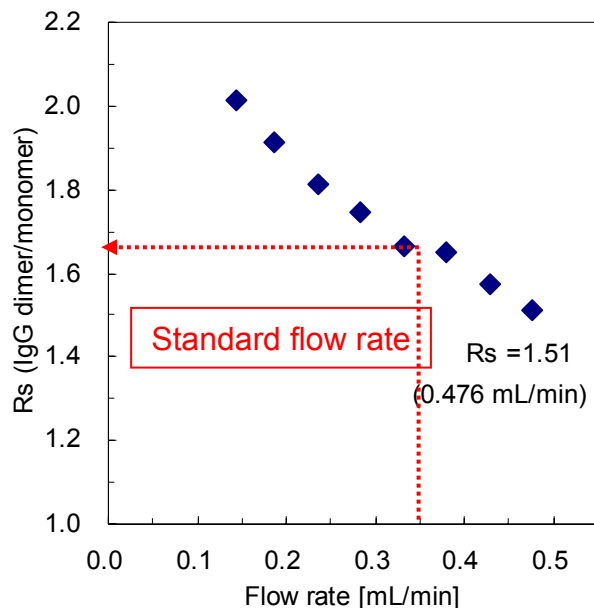
样品: IgG (human polyclonal) (4.5 g/L)

其他条件同左图



流速的影响 (TSKgel SuperSW mAb HTP)

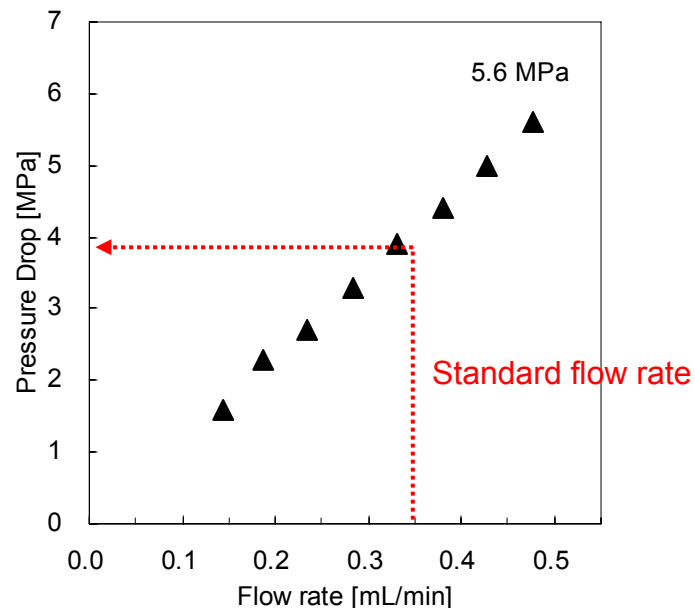
分离度 (IgG 二聚体和单体)



快速分离

在高流速下完成对 IgG 二聚体和单体的分离

压力变化



低压降

同时适用于 UHPLC 和常规 HPLC 系统

色谱条件

色谱柱:

流动相:

流速:

检测:

样品:

TSKgel SuperSW mAb HTP (4.6 mmID x 15 cm)

200 mmol/L phosphate buffer (pH 6.7) + 0.05% NaN₃

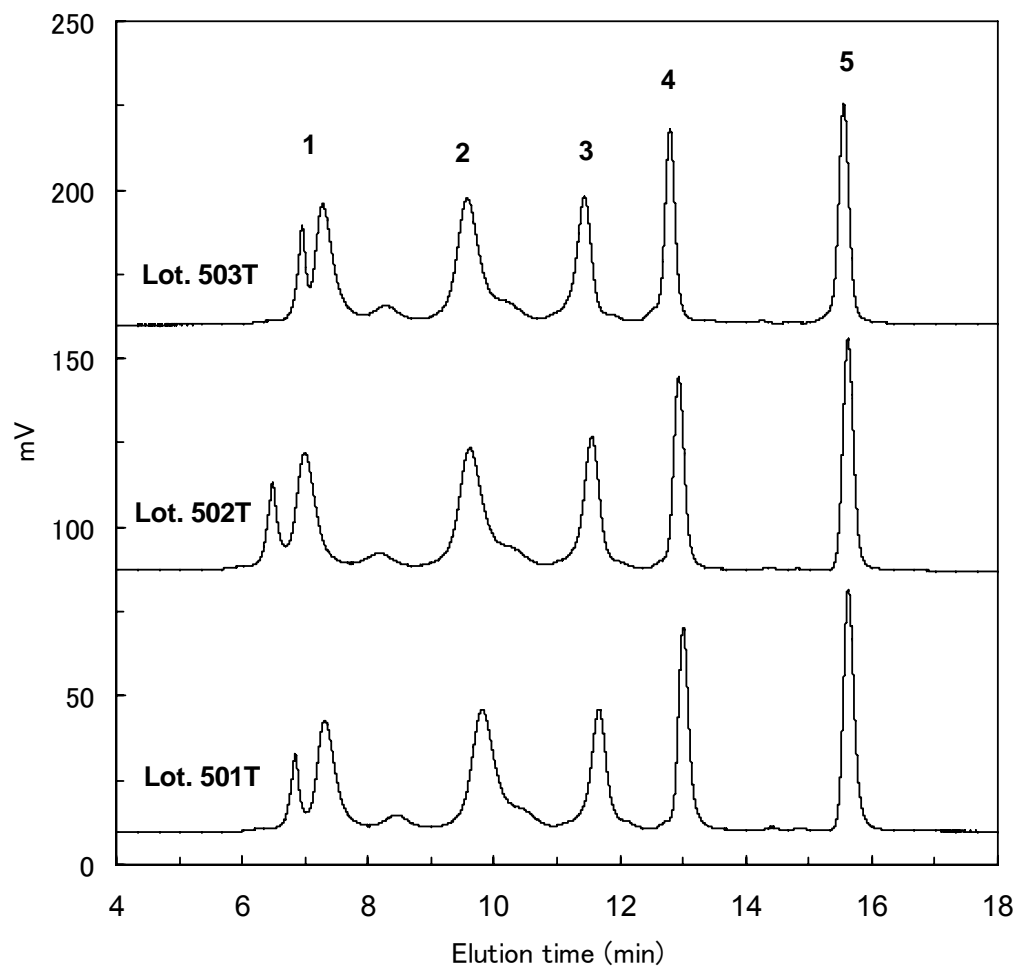
0.143~0.476 mL/min, 温度: 25°C

UV 280 nm, 上样量: 5 µL

IgG (human polyclonal) (4.5 g/L)



批次重现性



TSKgel SuperSW mAb HR 显示了很好的
批次重复性!

色谱柱: TSKgel SuperSW mAb HR
(7.8 mm I.D. x 30 cm)

流动相: 0.2 mol/L Phosphate Buffer (pH 6.7)+0.05% Na₃N

流速: 0.8 mL/min

检测: UV280nm

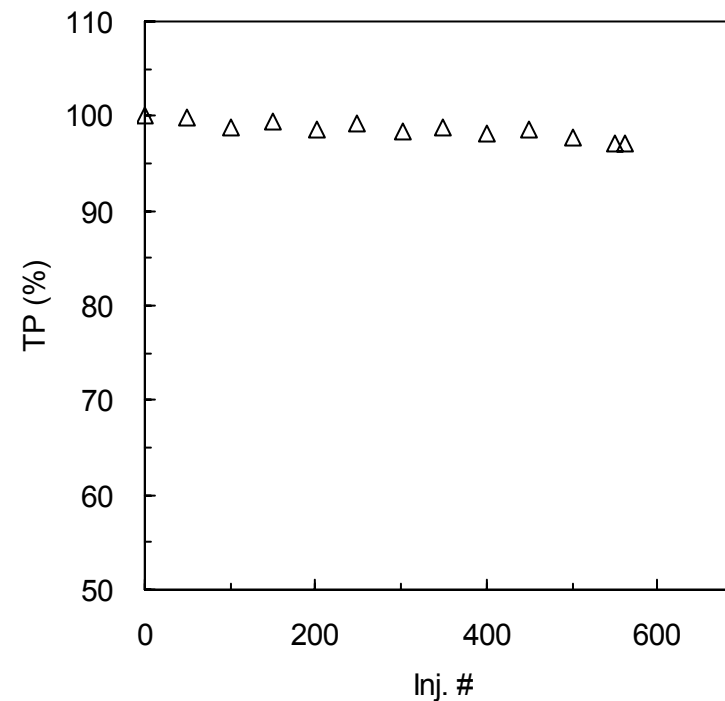
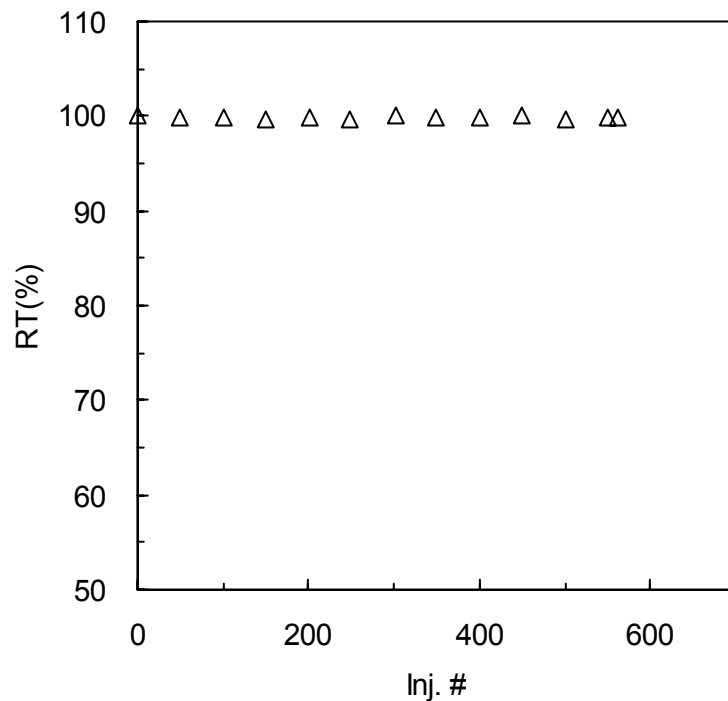
上样量: 10 μ L

样品: 1 Thyrobulobulin, 2 γ -Globulin, 3 Ovalbumin,
4 Ribonuclease A, 5 p-Aminobenzoic acid



TSKgel SuperSW mAb HR 的耐用性评价 (进样次数) (1)

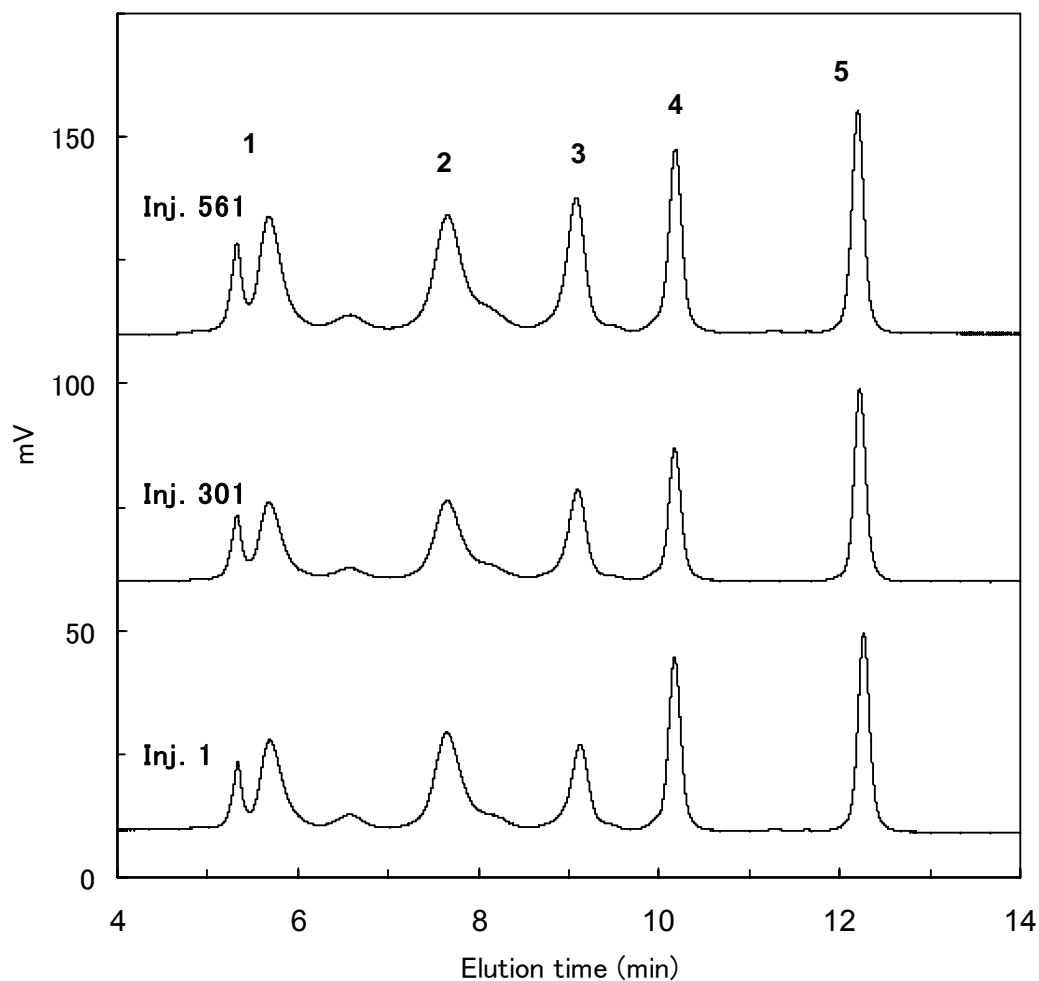
p-ABA保留时间和理论塔板数的变化



色谱柱: TSKgel SuperSW mAb HR (7.8 mm I.D. x 30 cm)
流动相: 0.2 mol/L Phosphate Buffer (pH 6.7)+0.05% NaN₃
流速: 0.8 mL/min Detection: UV280nm 上样量: 10 μ L
样品: 1 Thyrobulobulin, 2 γ -Globulin, 3 Ovalbumin,
4 Ribonuclease A, 5 p-Aminobenzoic acid



TSKgel SuperSW mAb HR 的耐用性评价 (进样次数) (2)



TSKgel SuperSW mAb HR显示了
对于蛋白样品很好的耐久性!

色谱柱: TSKgel SuperSW mAb HR
(7.8 mm I.D. x 30 cm)

流动相: 0.2 mol/L Phosphate Buffer (pH
6.7)+0.05% NaN₃

流速: 0.8 mL/min

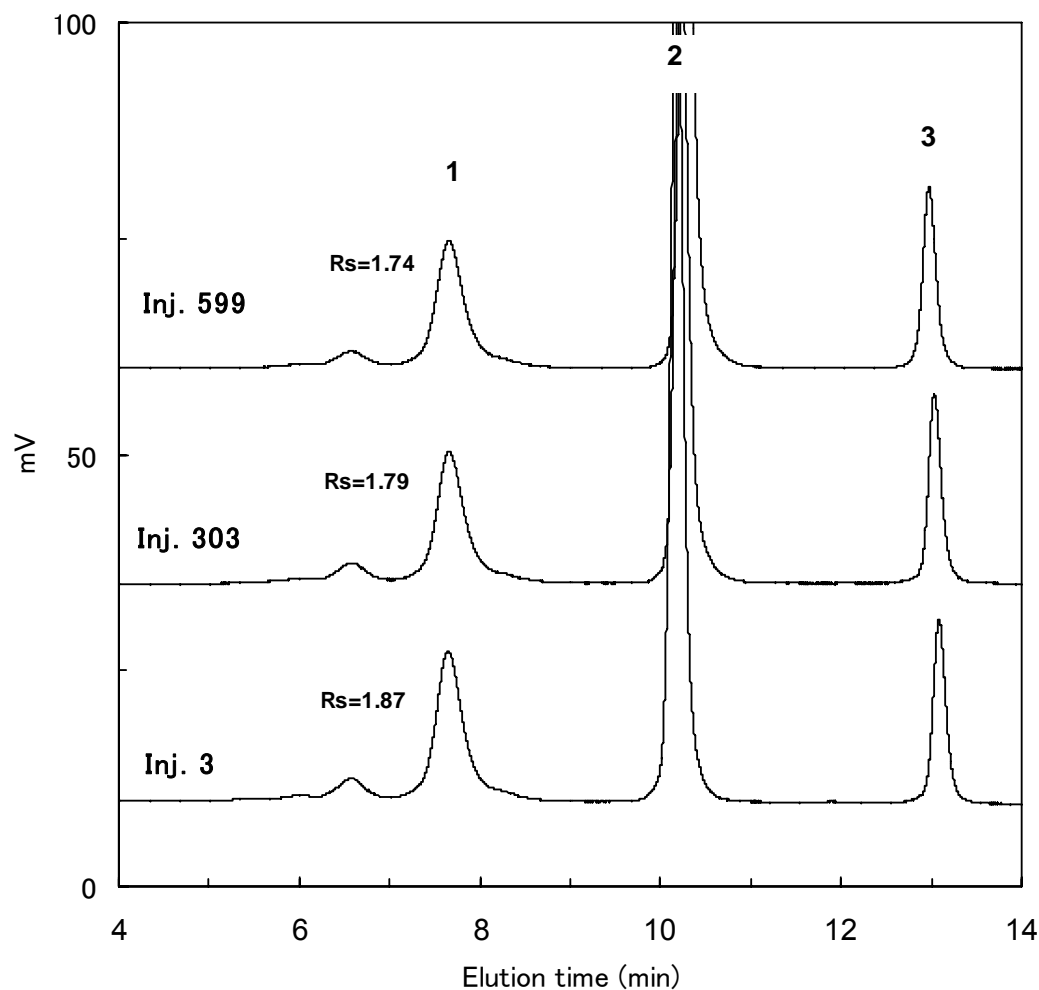
检测: UV280nm

上样量: 10 μ L

样品: 1 Thyrobulobulin, 2 γ -Globulin, 3
Ovalbumin, 4 Ribonuclease A,
5 p-Aminobenzoic acid



TSKgel SuperSW mAb HR 的耐用性评价 (进样次数) (3)



TSKgel SuperSW mAb HR 在丙球蛋白的分离度上也显示了很好的耐久性!

色谱柱: TSKgel SuperSW mAb HR
(7.8 mm I.D. x 30 cm)

流动相: 0.2 mol/L Phosphate Buffer (pH 6.7)+0.05% NaN₃

流速: 0.8 mL/min

检测: UV280nm

上样量: 10 μ L

样品: 1 γ -Globulin, 2 Cytochrome C, 3 DNP-L-Alanine



TOSOH

结论

- 以下三种为最新上市的新一代的SEC色谱柱产品:
 - **TSKgel SuperSW mAb HR** 相比其他SEC色谱柱, 具有在IgG单体和二聚体分离方面更为卓越的分离能力。
 - **TSKgel SuperSW mAb HTP** 与常规的SEC色谱柱, **TSKgel G3000SWXL** (5 μ m particle, 7.8 mm ID x 30 cm)相比, 对于IgG单体和二聚体的分离具有同等的能力, 但是分析时间只有其一半。
 - **TSKgel UltraSW Aggregate**, 具有更高的分子量排阻上限, 对于较大的蛋白 (包括甲状腺球蛋白和IgG) 的多聚体和聚集体具有更为卓越的分离能力。
- 这几种色谱柱的分离能力已经通过分离IgG单体、二聚体、多聚体以及片断得到展示。
- 这几种色谱柱具有很好的批次重现性以及耐用性。



2. 离子交换色谱法(IEC)

Ion-Exchange Chromatography

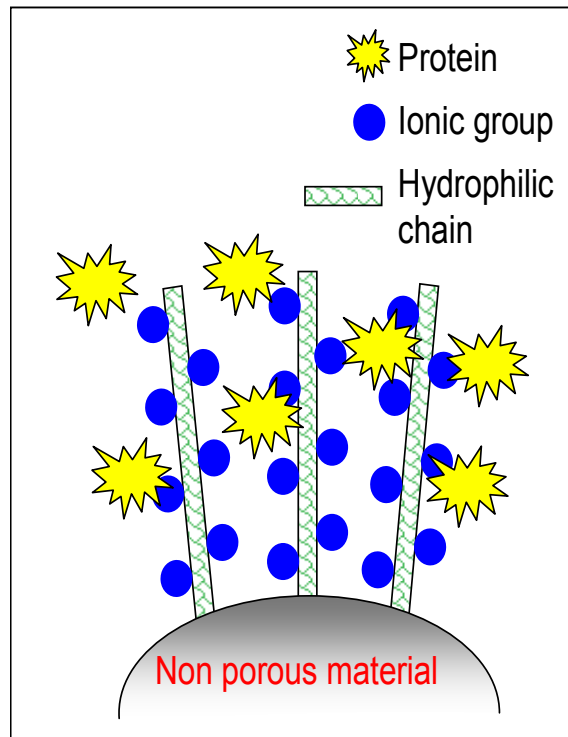
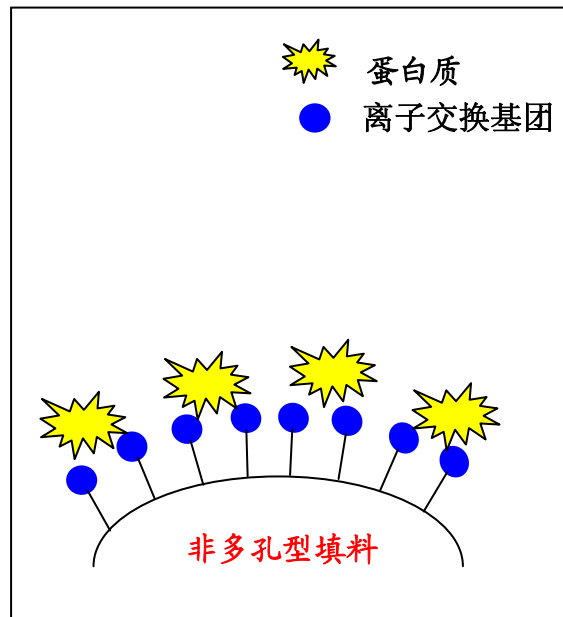


离子交换介质的表面构造

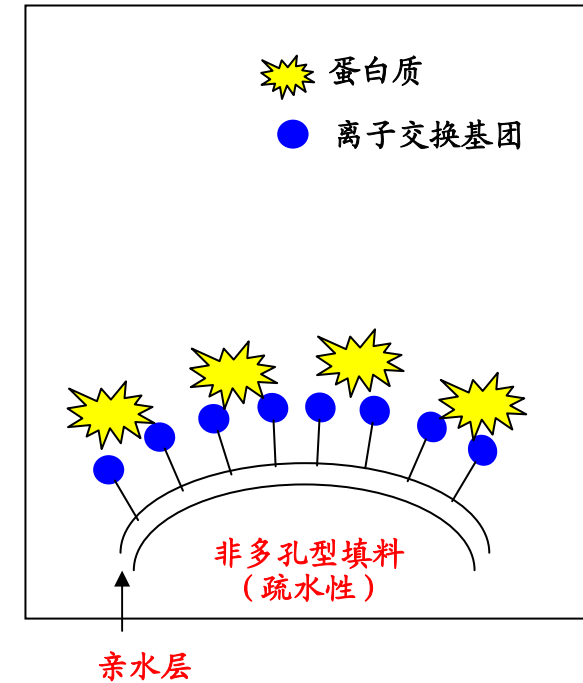
非多孔性填料: **NPR**, **STAT**系列色谱柱与同类型色谱柱的比较

STAT系列色谱柱

NPR系列 色谱柱



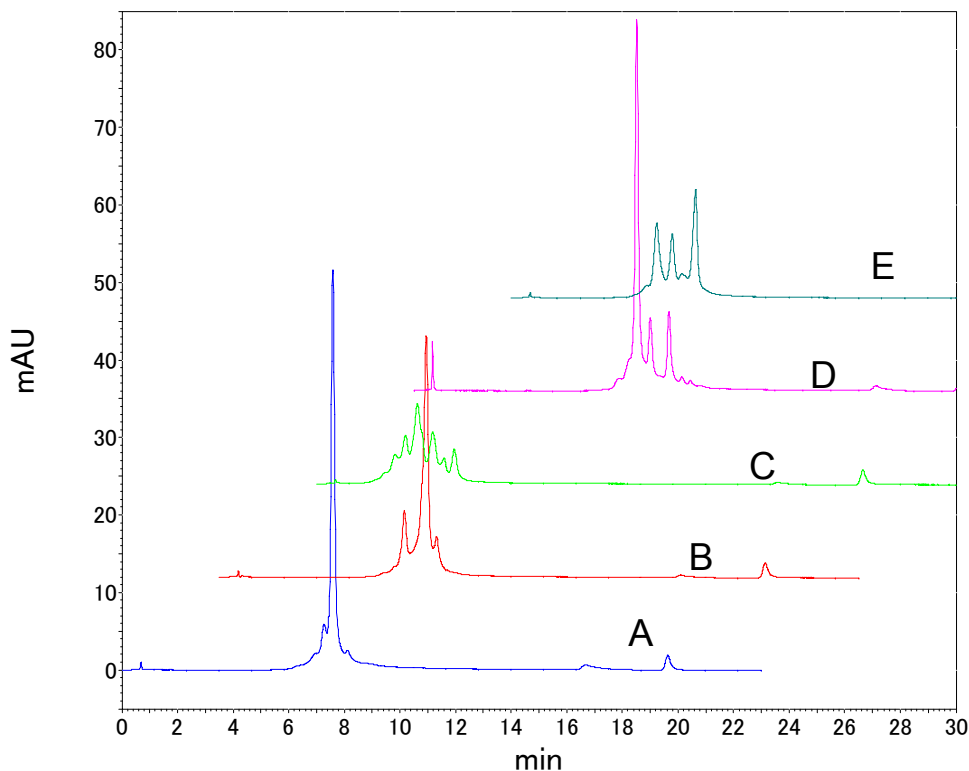
同类的其他色谱柱





抗体药物IEC分析实例1（单抗带电异构体的分析）

TSKgel CM-STAT(4.6mmI.D.x10cm)



色谱条件

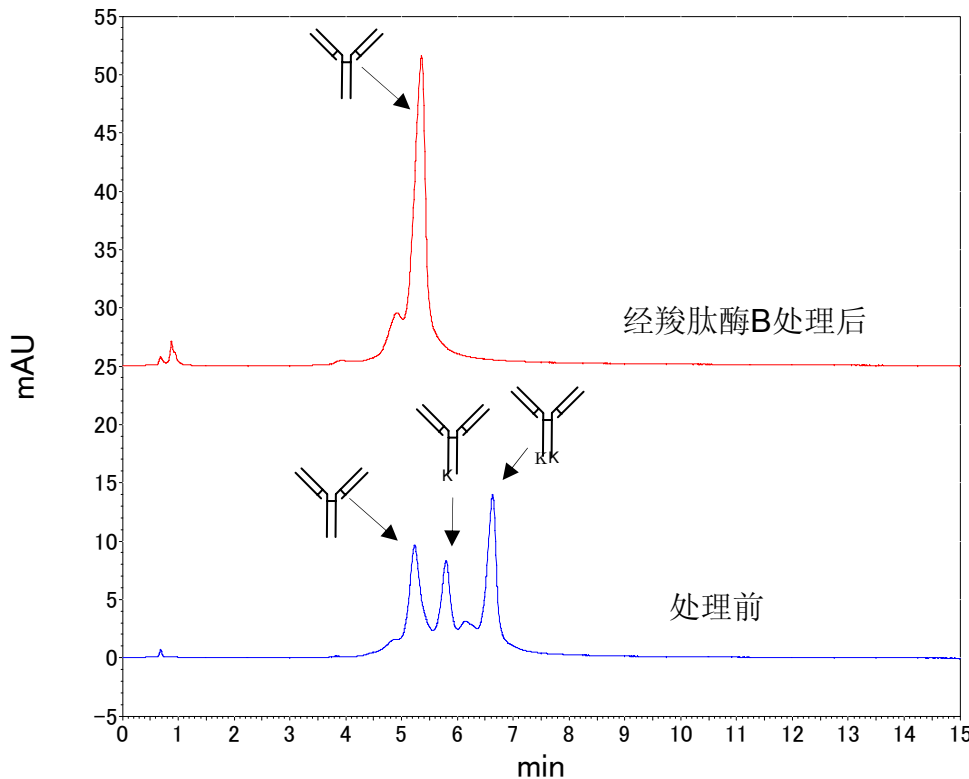
色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
流动相: A; 20mmol/L MES (pH6.0)
B; 20mmol/L MES + 500mmol/L NaCl (pH6.0)
梯度: 0min 10% B
15min 30% B
15.1min 100% B
18min 100% B
18.1min 10% B
23min 10% B
流速: 1.0mL/min
检测: UV (280nm)
温度: 25℃
进样体积: 20 μL
样品浓度: 0.5g/L
样品: A; humanized, IgG1
B; humanized, IgG1
C; chimera, IgG1
D; chimera, IgG1
E; chimera, IgG1

本数据由相模中央化学研究所柿谷均博士慷慨提供。



抗体药物IEC分析实例2 (C末端赖氨酸残基的酶处理)

TSKgel CM-STAT(4.6mmI.D.x10cm)



色谱条件

色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
流动相: A; 20mmol/L MES (pH6.0)
B; 20mmol/L MES + 500mmol/L NaCl (pH6.0)
梯度: 0min 10% B
15min 30% B
15.1min 100% B
18min 100% B
18.1min 10% B
23min 10% B
流速: 1.0mL/min
检测: UV (280nm)
温度: 25℃
进样体积: 20 μL
样品浓度: 0.5g/L
样品: 经羧肽酶B处理和未经羧肽酶处理的治疗性抗体药物

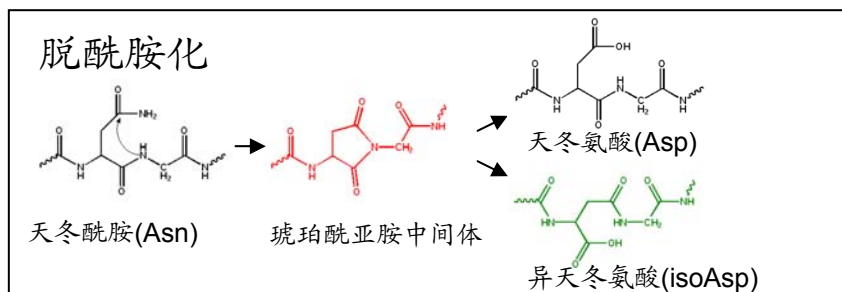
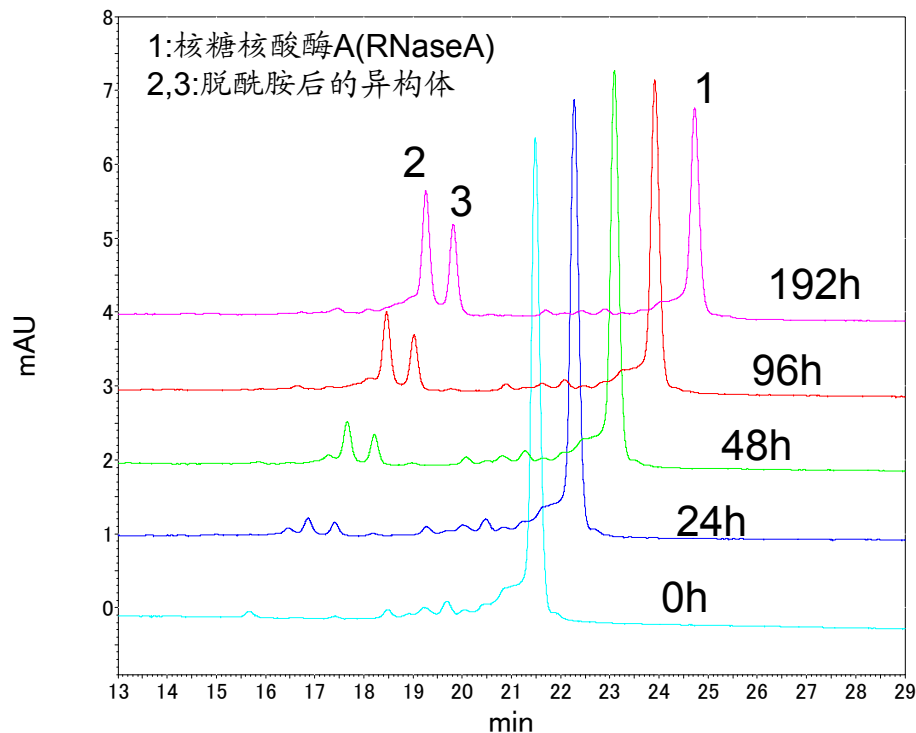
处理流程:

在35uL的治疗性抗体(10mg/mL)中加入1uL的羧肽酶B(Sigma C9584, 140U/mg protein, 5g/L in PBS), 37度下孵化3个小时。然后加入664uL的20mmol/L的MES(pH6.0)以将抗体样品浓度稀释至0.5g/L。最后取20uL的稀释样品进样。



抗体药物IEC分析实例3 (Asn脱酰胺化及异性化分析)

TSKgel CM-STAT(4.6mmI.D.x10cm)



色谱条件

色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
流动相: A: 20mmol/L MES pH6.0
B: 20mmol/LMES 1mol/L NaCl pH6.0
梯度: B%:5%(0min)-25%(30min)-100%(30min)-100%(34min)-5%(34min)-5%(40min)
流速: 1.0mL/min
检测: UV (280nm)
温度: 25℃
进样体积: 20 μL
样品浓度: 0.25g/L
处理流程:

核糖核酸酶A在1%的碳酸铵缓冲液(pH8.2)中溶解配制成5g/L浓度的溶液, 然后在37度下孵化0-192个小时。孵化完成后, 使用20mmol/L的MES(pH6.0)稀释至0.25g/L的浓度并进行HPLC分析。

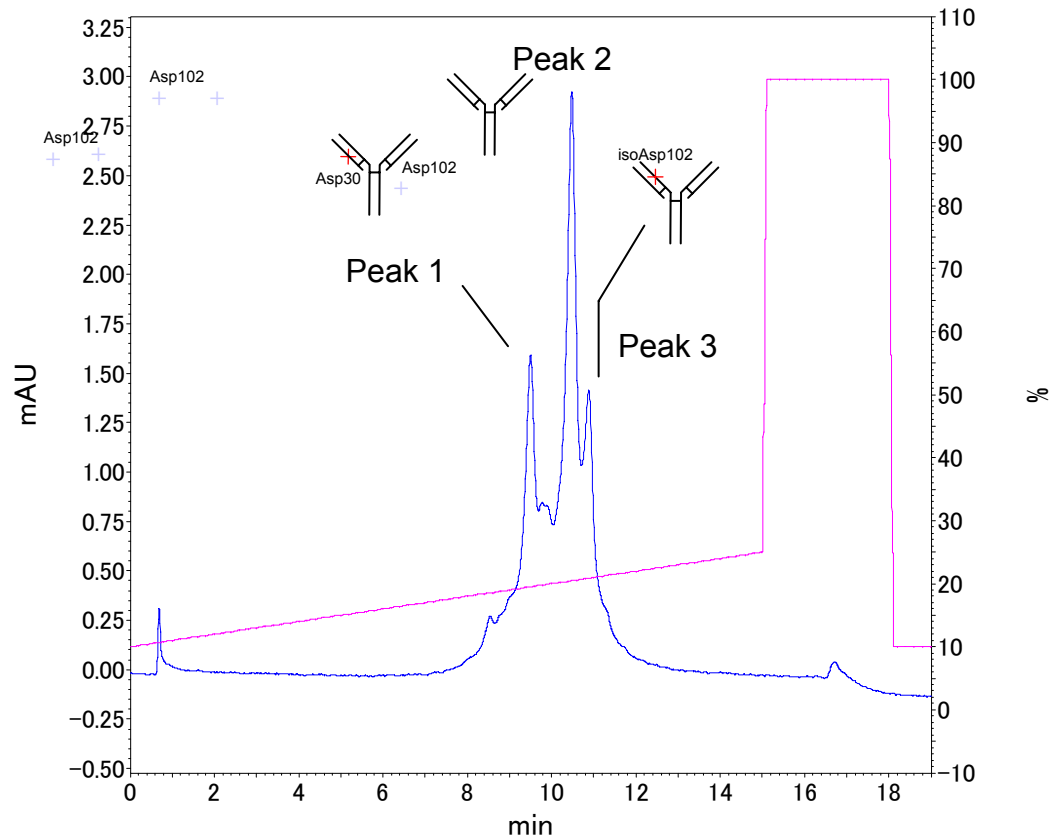
核糖核酸酶A及其两种异构体被完全分离。根据孵化时间与核糖核酸酶A峰面积作图, 并推断出在1%的碳酸铵缓冲溶液(pH8.2)条件下, 核糖核酸酶A的半衰期大约为180个小时。

备注:

核糖核酸酶A在中等碱性条件下可以引起Asn67位点脱酰胺作用并生成2种异构体(Asp67 and iso-Asp67)。



抗体药物IEC分析实例3（Asn脱酰胺化及异性化分析）



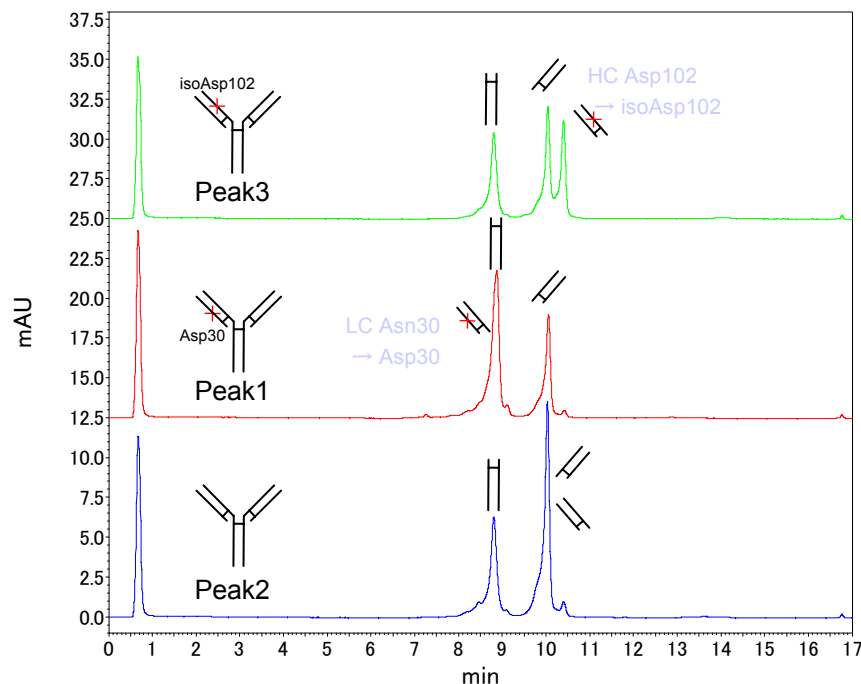
Conditions

Column : TSKgel CM-STAT (4.6mm I.D. x 10cm)
Eluent : A; 20mmol/L MES (pH6.0)
 B; 20mmol/L MES + 0.5mol/L NaCl (pH6.0)
Gradient : 0min 10% B; 15min 25% B; 15.1min 100% B; 18min 100% B
Flow rate : 1.0 mL/min, Detection: UV (280nm), Temp.: 30°C
Sample : monoclonal IgG, 0.2 g/L, 20 μ L

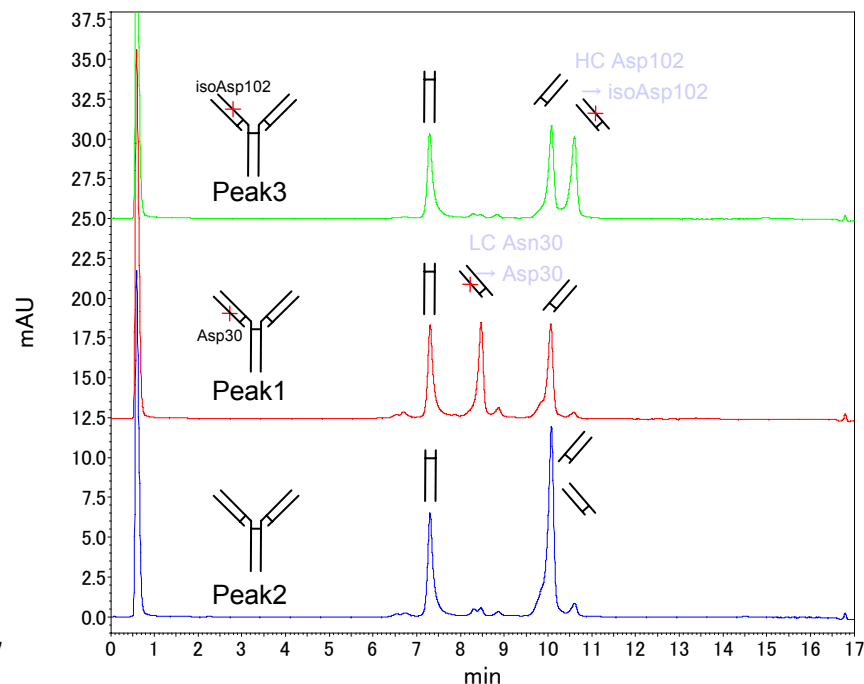


抗体药物IEC分析实例4（抗体片段分析;Asn脱酰胺化）

TSKgel CM-STAT



TSKgel SP-STAT



Conditions

Column : left: TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm), right: TSKgel SP-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)

Eluent : A; 20mmol/L MES (pH6.0), B; 20mmol/L MES + 0.5mol/L NaCl (pH6.0)

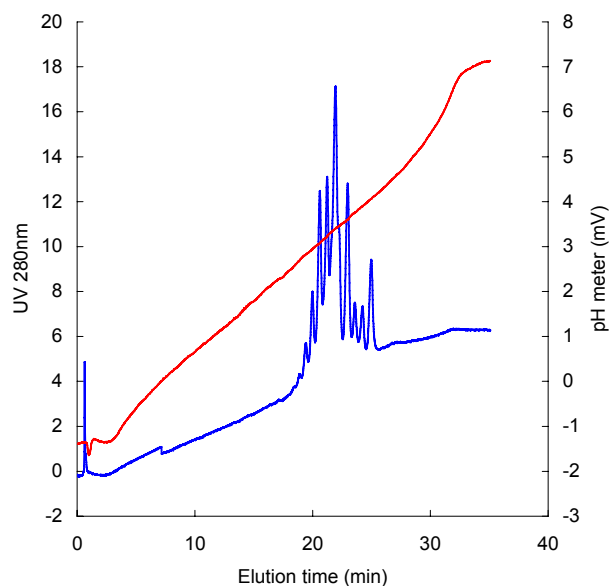
Gradient :
 0min 0% B
 15min 25% B
 15.1min 100% B
 18min 100% B

Flow rate : 1.0mL/min
 Detection : UV (280nm)
 Temp. : 30°C
 Sample : monoclonal IgG1 (0.2 g/L, 20 μL)

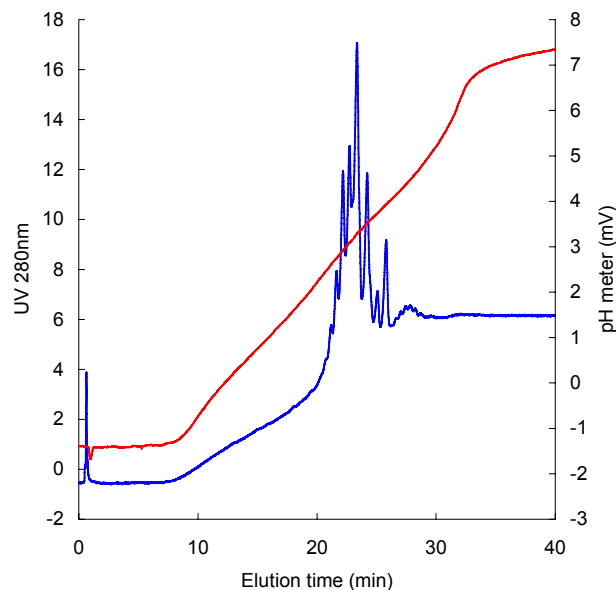


抗体药物IEC分析实例5 (pH梯度分析)

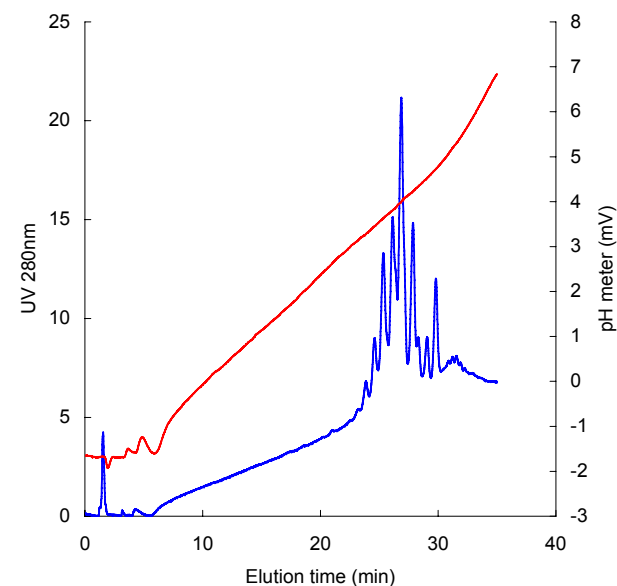
SP-STAT



CM-STAT



Commercial CM type



Column : TSKgel SP-STAT (4.6 mmI.D. x 10 cm), TSKgel CM-STAT (4.6 mmI.D. x 10 cm),
Commercial WCX (4.0 mmI.D. x 25 cm)

Eluent : A; 10 mM NaCl in 20 mM MES + 20 mM HEPES (pH5.4)
B; 10 mM NaCl in 20 mM MES + 20 mM HEPES (pH9.0)

Gradient : A → B 30min linear

Flow rate : 1.0 mL/min, 0.76 mL/min (Commercial WCX)

Detection : UV (280nm)

Sample : mAb

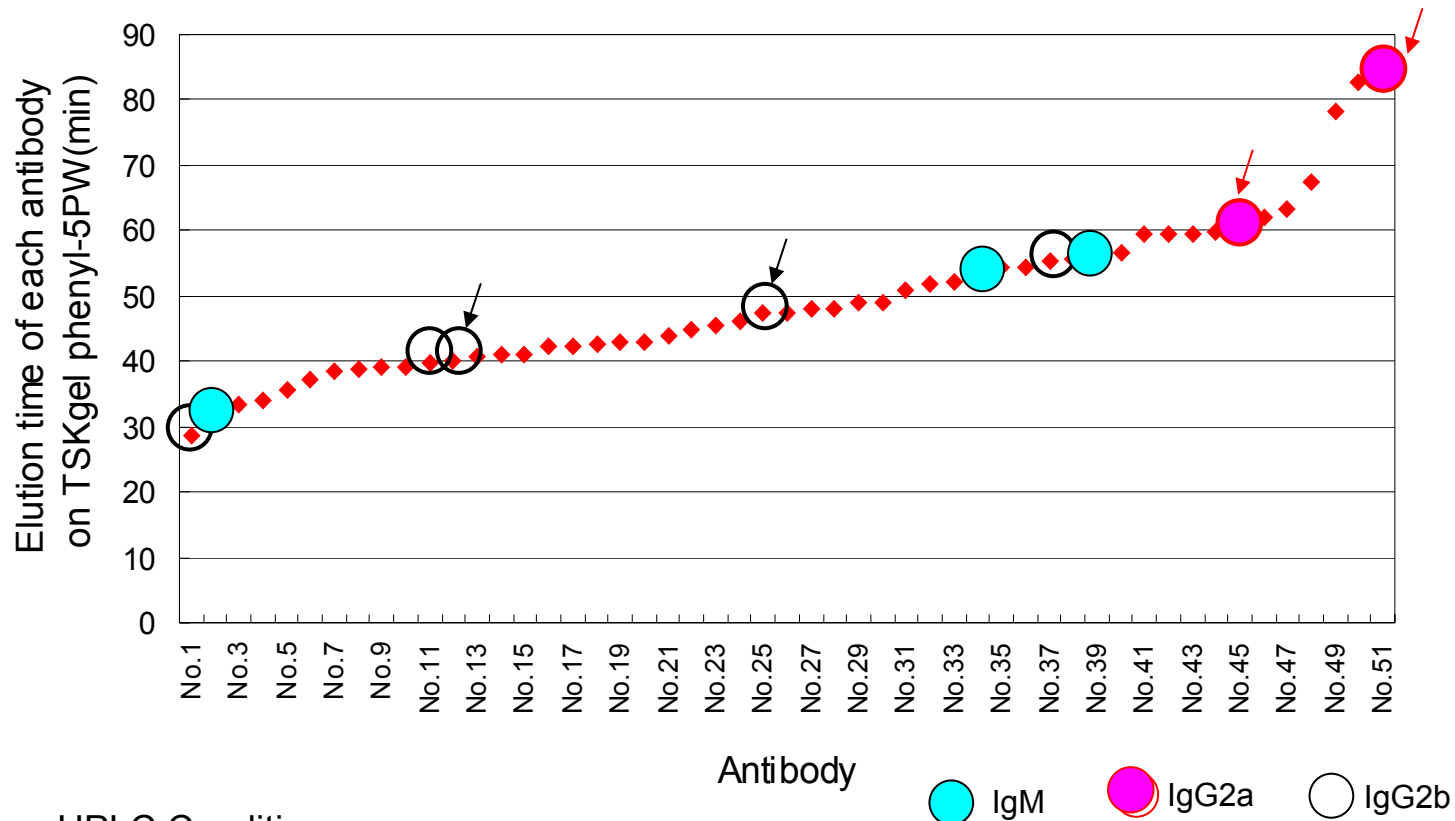


3. 疏水相互作用色谱法(HIC)

Hydrophobic Interaction Chromatography



抗体的多样性（HIC模式下单抗的保留时间）



HPLC Condition

Column : TSKgel Phenyl-5PW (7.5 mmI.D. x 7.5 cm)

Eluent : (A) 0.1 mol/L phosphate buffer containing 1.8 mol/L ammonium sulfate (pH 7.0)

(B) 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.0)

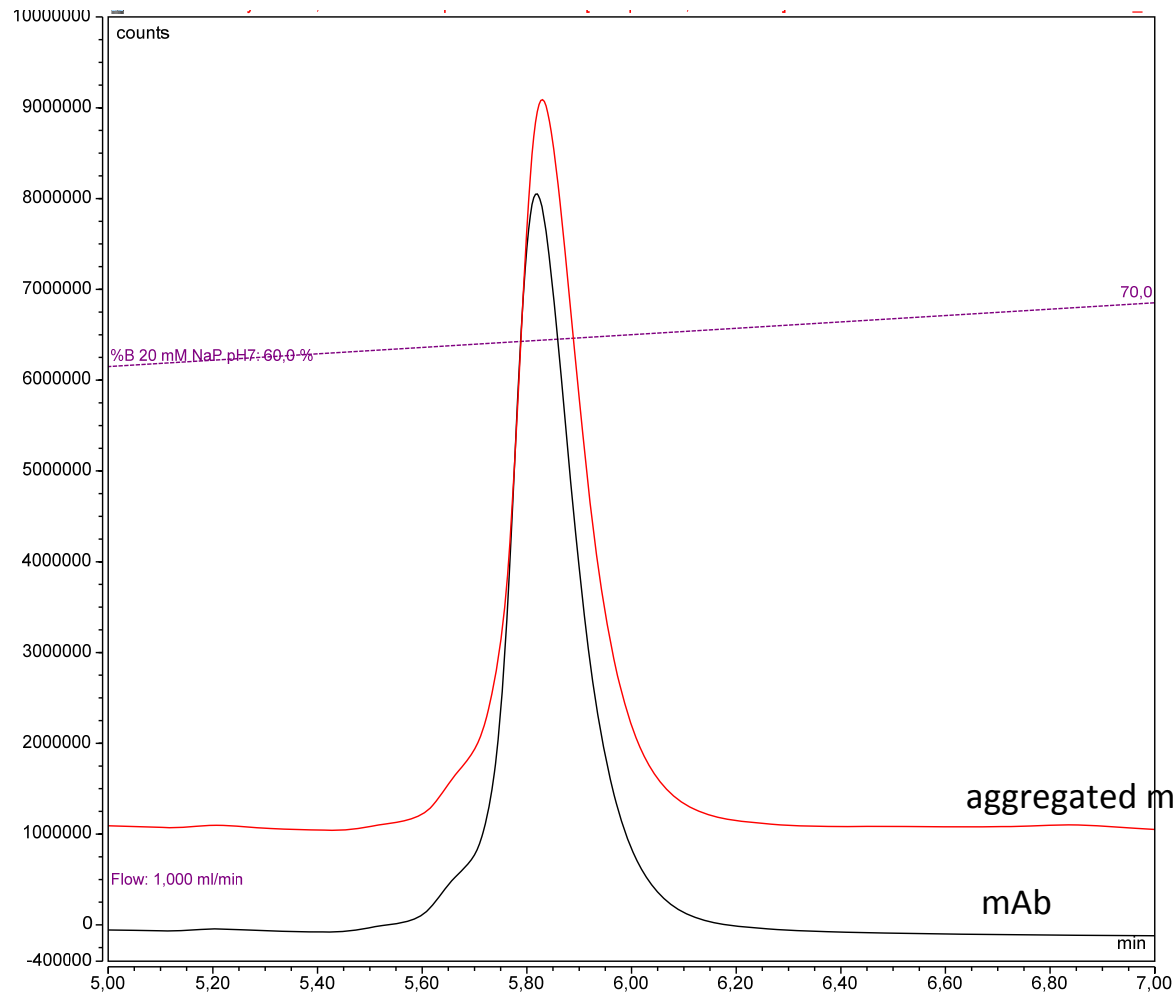
Gradient : (B)0%(0min)--0%(5min)--100%(65min) linear

Flow Rate : 1 mL/min, Samples : 51 kinds of mouse monoclonal antibodies



TOSOH

抗体的HIC分析实例1（使用硫酸铵作为盐淋洗液）



TSKgel Butyl NPR (4.6 mm I.D. X 3.5 cm)
Eluent A: 1.5 M Ams (c = 188 mS/cm)
Eluent B: water
Linear gradient of 0-100 % B in 10 min
Detection; FS: Ex. 280 nm; Em. 348 nm
Sample; mAb, 5 µg injection

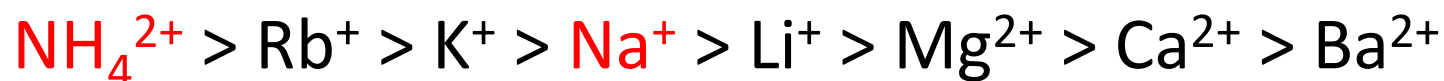
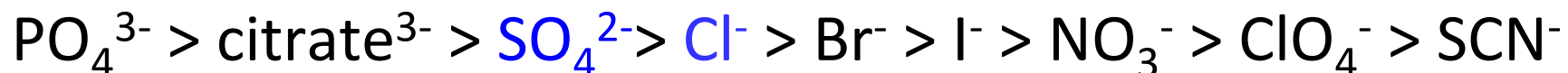


TOSOH

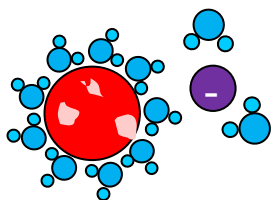
Hofmeister效应

kosmotropic

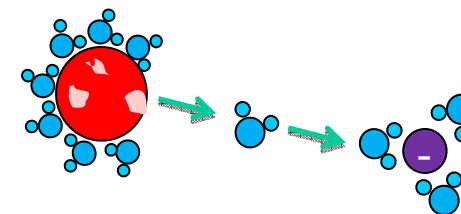
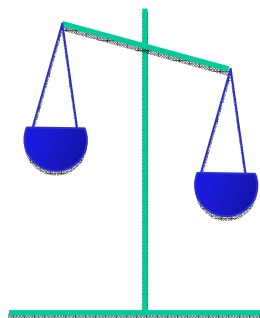
chaotropic



www.laborjournal.de bzw. www.lsbu.ac.uk



水和构造安定化



水和构造被破坏



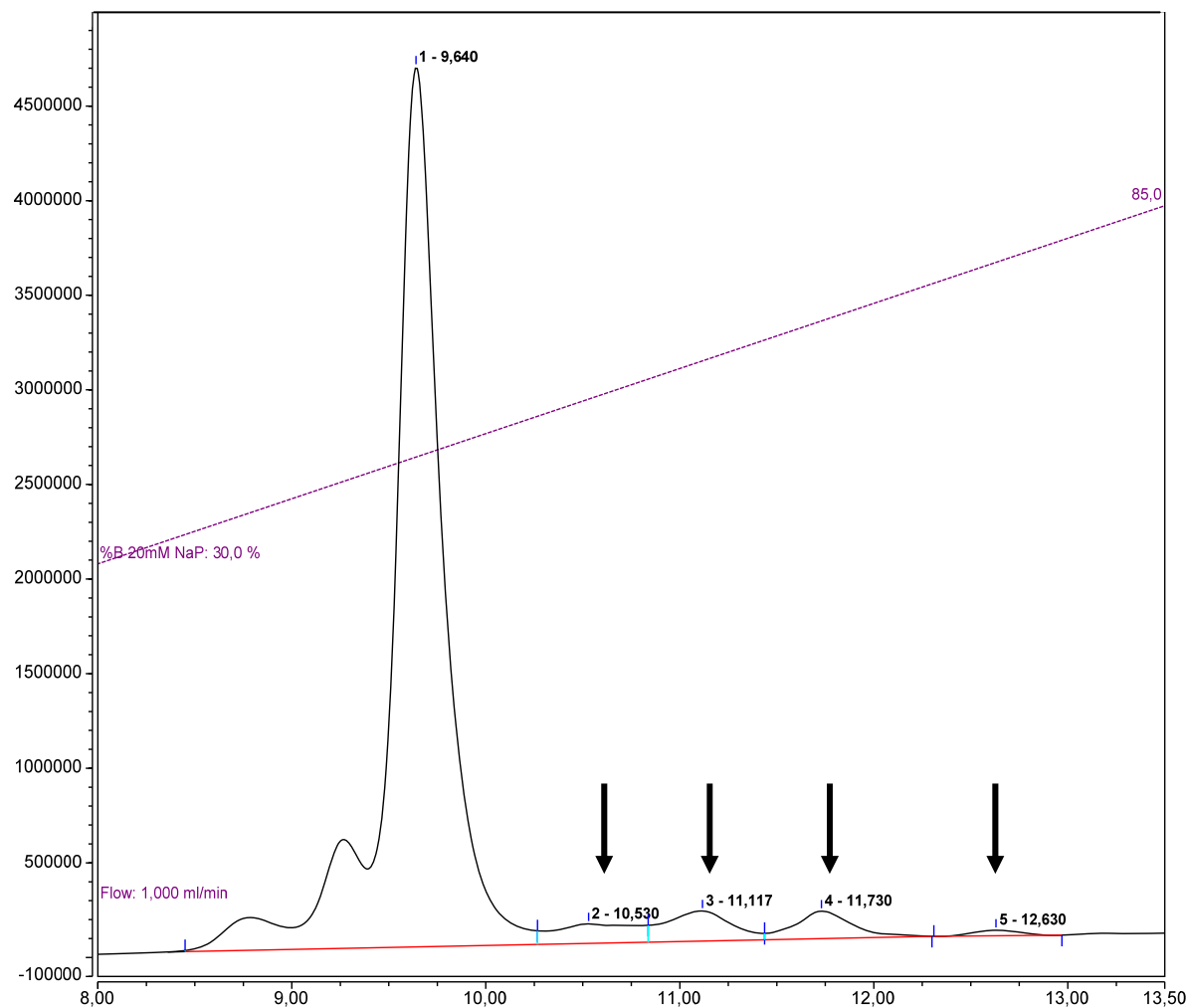
如果使用硫酸铵之外的其他盐会怎么样呢？

注：盐通过水对于蛋白质等生物大分子的影响统称为Hofmeister效应。Franz Hofmeister 研究了中性盐对于蛋白质沉淀的影响 得到了一系列盐离子对于蛋白质沉淀的影响。

左边的称为 kosmotrope(water sturcture maker) 右边的为 chaotrope (water structure breaker)



抗体的HIC分析实例2（使用NaCl作为盐淋洗液）



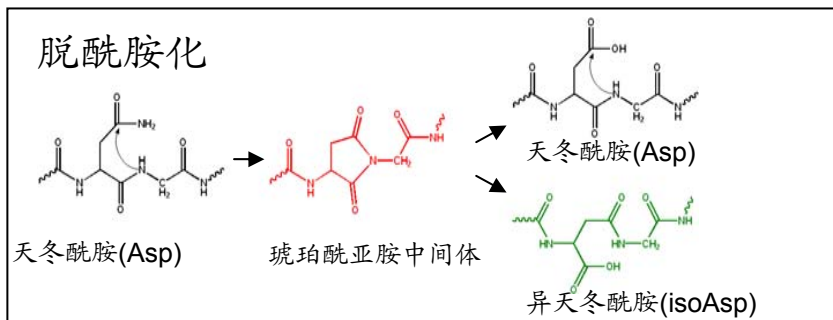
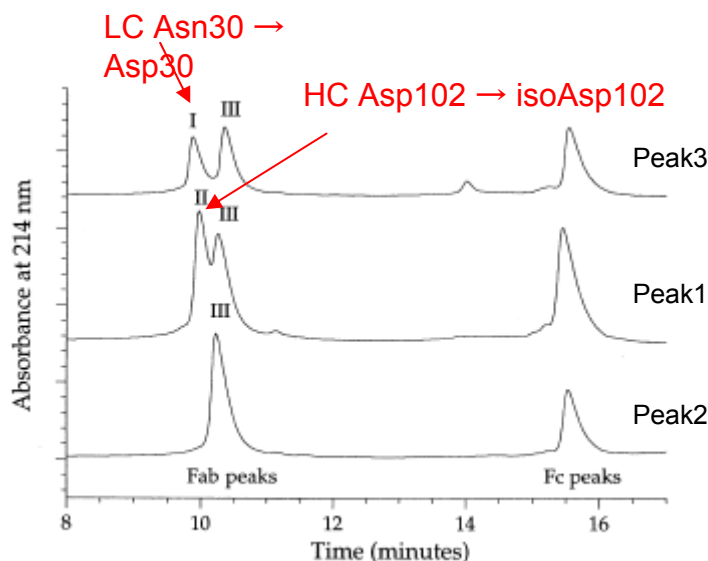
TSKgel Butyl NPR (4.6 mmI.D. X 3.5 cm)
Eluent A: 3 M NaCl (c = 234 mS/cm)
Eluent B: water
Linear gradient of 0-100 % B in 10 min
Detection; FS: Ex. 280 nm; Em. 348 nm
Sample; mAb, 5 µg injection

色谱峰	峰面积 %
多聚体	10.64
单体	89.36



抗体的HIC分析实例3（脱酰胺化异构体分析）

TSKgel Butyl-NPR(4.6mmI.D.x3.5cm)



色谱条件

色谱柱 : TSKgel Butyl-NPR (4.6mmI.D. x 3.5cm)
 流动相 : A; 2mol/L (NH₄)₂SO₄ containing 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 B; 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 梯度 : 34min linear gradient from 10 to 100%B
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV (214nm)
 温度 : 30℃
 进样体积 : 20 μ L

rhumaMab HER2 cation-exchange peak assignments

Peak	Peak area %	Structural difference(s)	At LC Asn30	At HC Asn55	At HC Asp102
1	13.6	Deamidated (to Asp) at Asn30 of one light chain	Asn/Asp	Asn/Asn	Asp/Asp
2	73.8	Main peak form	Asn/Asn	Asn/Asn	Asp/Asp
3	8.5	Isomerized (to isoAsp) at Asp102 of one heavy chain	Asn/Asn	Asn/Asn	Asp/isoAsp

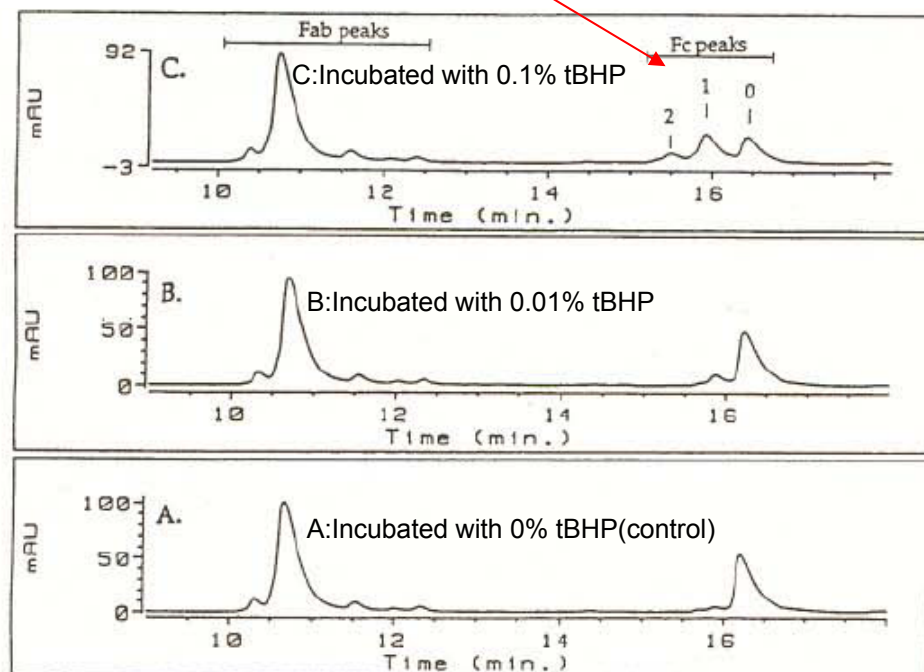
R.J. Harris et al. / J. Chromatogr. B 752 (2001) 233-245



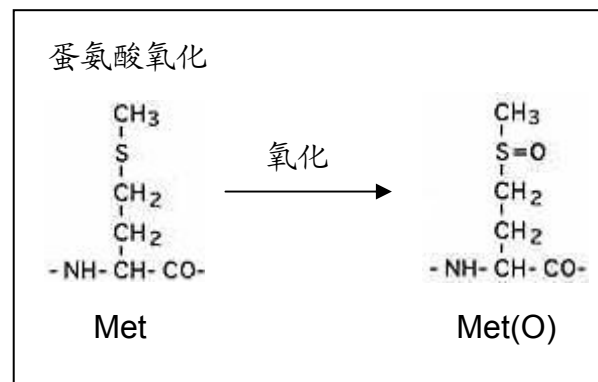
抗体的HIC分析实例4 (Met氧化后的片段分析)

TSKgel Butyl-NPR(4.6mmI.D.x3.5cm)

氧化后蛋氨酸的数量 (Met-255 → Met(O)-255
and/or Met-431 → Met(O)-431)



t-BHP: tert-Butylhydroperoxide



色谱条件

色谱柱 : TSKgel Butyl-NPR (4.6mmI.D. x 3.5cm)
 流动相 : A; 2mol/L (NH₄)₂SO₄ containing 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 B; 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 梯度 : 34min linear gradient from 10 to 100%B
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV
 温度 : 30℃
 进样量 : 5-10 μg

Felicity J. Shen et al., *Techniques in Protein Chemistry* vol.7, 1996, pages275-284



4. 反相色谱法(RPC)

*Reversed-**P**hase **C**hromatography*

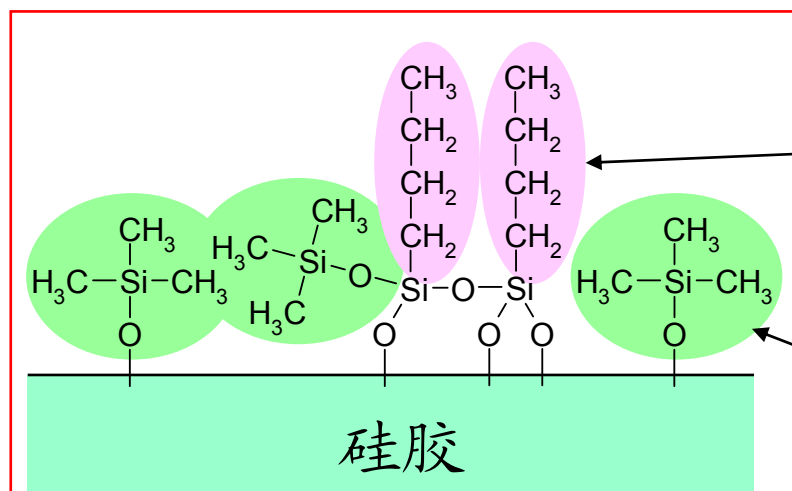


蛋白质·多肽的RPC分析

- 填料的孔径
 - 多肽: 8-12 nm (80-120 Å)
 - 蛋白质: 30-100 nm (300-1,000 Å)
- 官能团的种类及键合密度
 - Octyl-, Butyl-, Phenyl-
 - 键合密度 (碳含量5%以下)
(例) TSKgel Protein C4-300, TSKgel Phenyl-5PW RP
- 流动相条件
 - 多肽: 含有0.05-0.1%TFA的酸性淋洗液
 - 蛋白质: 含有0.05%以下的TFA酸性淋洗液
- 其他
 - 粒径、硅羟基处理、表面构造、分析温度



TSKgel Protein C4-300填料的表面构造

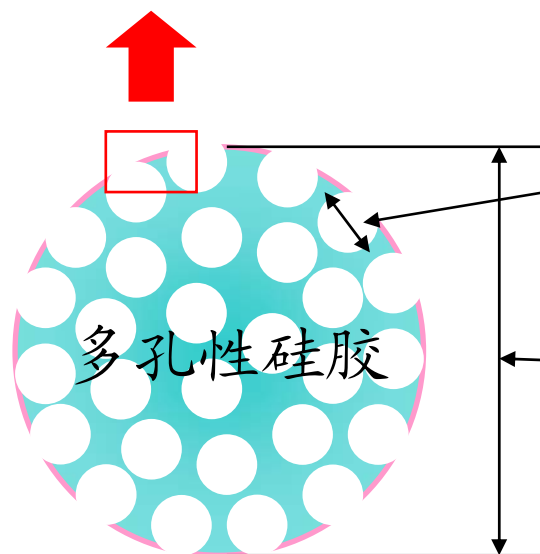


丁基 (C4) 的多交联键合

→ 由于比ODS色谱柱具有更低的疏水性, 所以抑制了蛋白质的吸附

残余硅醇基的封端

→ 优越的耐久性(使用寿命提高)



30nm的孔径

→ 非常适合蛋白质进出的孔径尺寸, 提高了分辨率

3 μ m的粒径

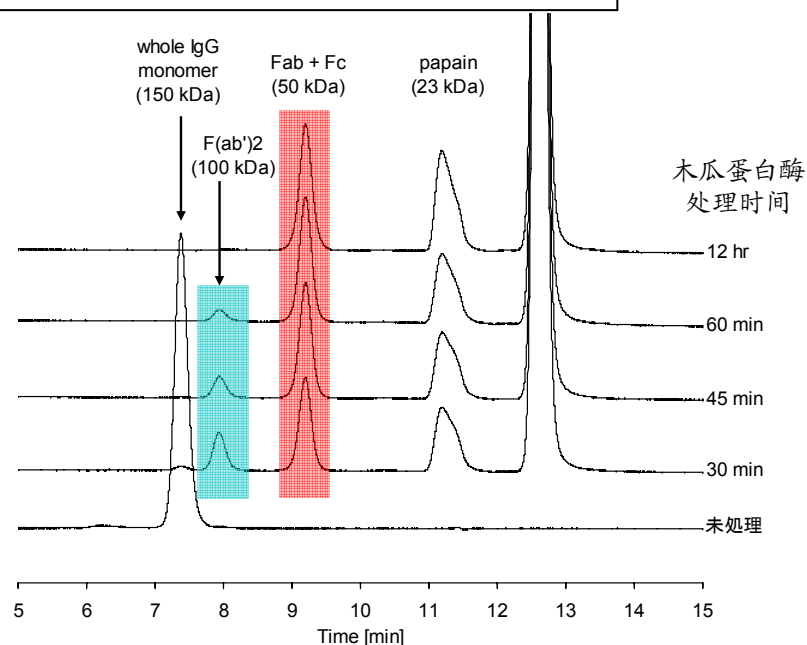
→ 更高的理论塔板数



TOSOH

抗体的RPC分析实例1（抗体木瓜蛋白酶消化物的分析）

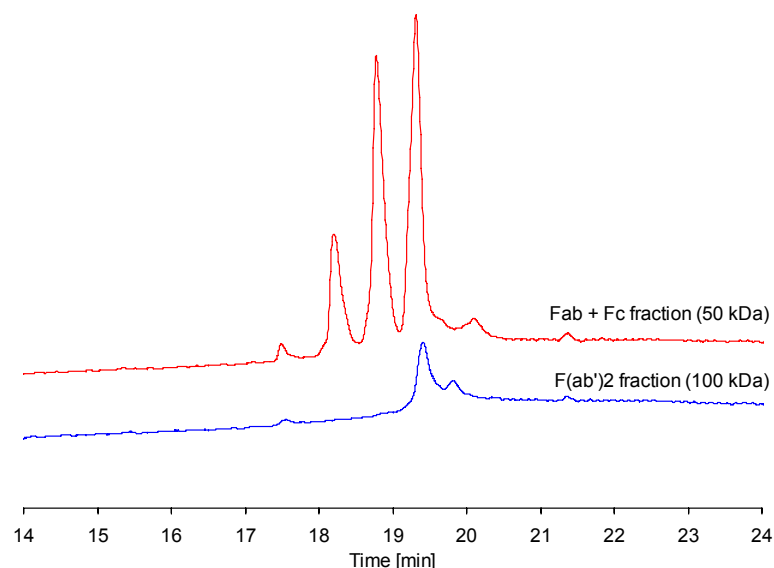
SEC分析（使用TSKgel SuperSW3000）



测定条件

色谱柱: TSKgel SuperSW3000 (4.6 mm I.D. × 30 cm)
流动相B: 200 mmol/L phosphate buffer (pH 6.7) + 0.05% NaN₃
流速: 0.35 mL/min, 检测: UV 280nm, 进样量: 5 μ L
样品: monoclonal IgG (mouse),
digested with papain in the presence of cysteine

SEC组分的反相分析（使用TSKgel Protein C₄-300）



测定条件

色谱柱: TSKgel Protein C₄-300 (4.6 mm I.D. × 15 cm)
流动相A: H₂O/CH₃CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)
流动相B: H₂O/CH₃CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)
线性梯度: B液 0%(0min) - 100%(45min)
流速: 1.0 mL/min, 温度: 40°C, 检测: UV 210nm, 进样量: 10 μ L
样品: papain-digested IgG (SEC fraction)

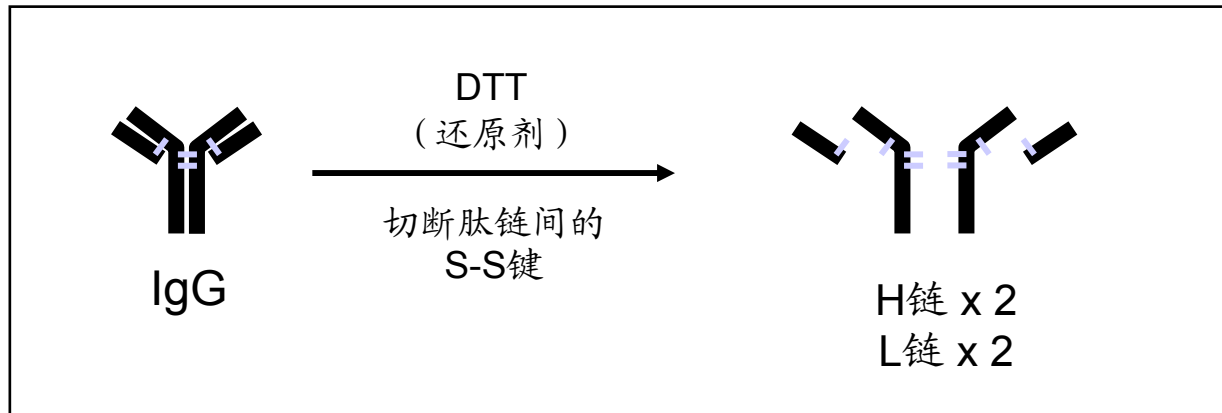
- 实验结果表明，即使在SEC分析的同一组分(100 kDa, 50 kDa)中，仍然是含有多种疏水性不同的组分的。



抗体的RPC分析实例2（抗体药物二硫键还原物的分析）

- IgG 的二硫键还原

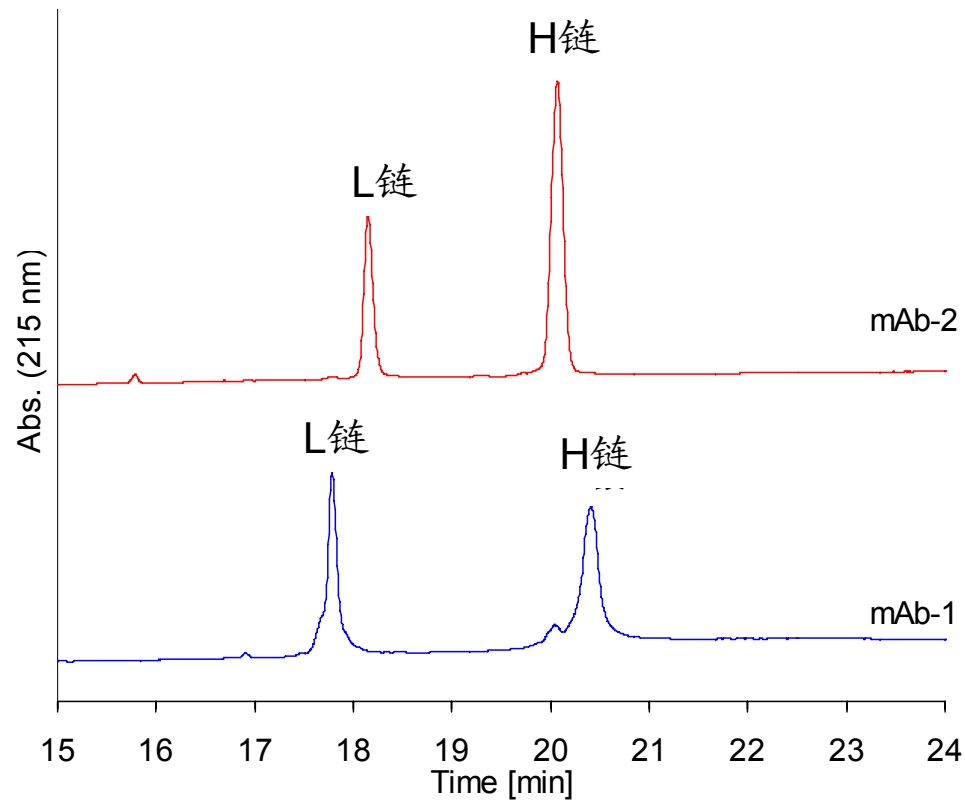
- 向含有变性剂的500mL反应缓冲液（7.5M 盐酸胍，0.1M Tris-HCl，1mM EDTA，pH 7.5）中，加入IgG 1mg 和 0.5M DTT 500mL，37℃下反应 30分钟
- 反应后，加入1M 的碘乙酰胺 6.5mL



Dillon, T. M. *et al.* (2006) *J. Chrom. A* **1120**, 112-120



抗体的RPC分析实例2（抗体药物二硫键还原物的分析）



检测条件

色谱柱: TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm I.D. × 15 cm)

淋洗液A: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{TFA} = 90/10/0.05$ (v/v/v)

淋洗液B: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{TFA} = 20/80/0.05$ (v/v/v)

梯度: B 0% (0 min) — 100% (45 min)

流速: 1.00 mL/min, 检测: UV 215nm

温度: 50°C, 进样量: 100 μL

样品: mAb-1, mAb-2, each reduced with dithiothreitol

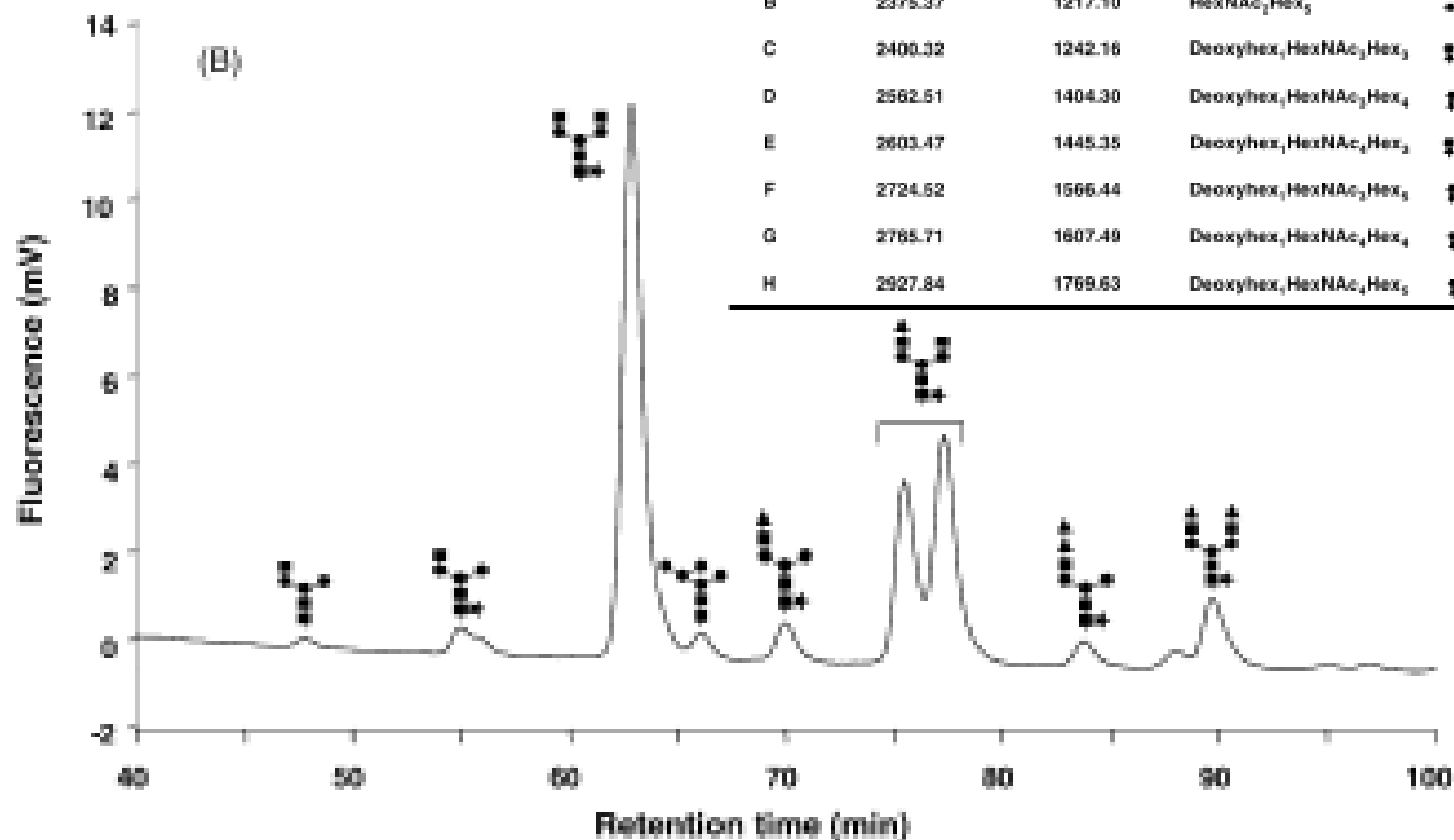


5. 正相色谱法(NPC)

*Normal-**P**hase **C**hromatography*



IgG2s的糖链构造异构体的NPC分析



Ref. M. J. Bailery et al., J. Chromatogr. B 826 (2005) 177-187

"A platform for high-throughput molecular characterization of recombinant monoclonal antibodies"



总结

- 高效液相色谱法（**HPLC**）可以对抗体药物以及重组蛋白等蛋白药物的不均一性进行有效的分析。多种色谱分析方法的有效组合，能够更好地进行蛋白药物的定量和定性分析。
- 分子尺寸排阻色谱法（**SEC**）可以利用分子尺寸的不同，对多聚体、片段、PEG化蛋白等样品进行有效的分析。
- 利用离子交换色谱法（**IEC**）、疏水作用色谱法（**HIC**）、反相色谱法（**RPC**）、正相色谱法（**NPC/HILIC**）可以对带电异构体、构造异构体、糖基化、脱酰胺化及氧化等变化引起的杂质进行高分辨率、高效分析。分离选择性取决于色谱分离模式、色谱柱的种类和色谱条件等。（TSKgel品牌的离子交换色谱柱以及疏水相互作用色谱柱中的固定相，采用了非多孔性、小粒径的填料，具有极高的分辨率，可以检测出因为脱酰胺或氧化等过程中产生的1个氨基酸残基的微小差异。）



TOSOH HPLC SITE

<http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>

东曹（上海）生物科技有限公司

快速链接

站内搜索

Part Number Search

Literature Search

中文

最新信息

TSKgel 色谱柱

TOYOPEARL 层析填料

高性能GPC系统

最新产品信息 TSKgel HPLC

Quick Links

TSKgel SW 色谱柱

TSKgel 反相色谱柱

东曹HPLC数据库

分类浏览

See us at these upcoming events:

Analytica 2012 慕尼黑分析生化展

东曹生物科技即将参展上海2012年10月16-18日举办的Analytica 2012慕尼黑分析生化展。届时，东曹公司将向新老客户展示众多的色谱耗材和分析仪器产品，欢迎大家莅临我们的展位。

时间：2012年10月16日--18日

地点：上海新国际博览中心

展位：N2.2725

HPLC 色谱柱产品

最新 畅销产品 TSKgel ODS-100V, 100Z

受欢迎的高性能离子交换色谱柱

• TSKgel Q-STAT

• TSKgel SP-STAT

• TSKgel CM-STAT

• TSKgel DNA-STAT

HPLC 色谱柱产品分类

• TSKgel 反相色谱柱

• TSKgel HILIC 色谱柱

• TSKgel IEC 色谱柱

• TSKgel HIC 色谱柱

• TSKgel AFC 色谱柱

• TSKgel GPC 色谱柱

• TSKgel SW 色谱柱

• TSKgel PW 色谱柱

层析填料产品

受到好评的常规对照量的 TOYOPEARL GigaCap 系列产品

• TOYOPEARL® GigaCap S-850M

• TOYOPEARL® GigaCap CM-850M

• TOYOPEARL® GigaCap Q-850M

层析填料分类

• 离子交换层析

• 疏水层析

• 亲和层析

• 尺寸排阻层析

可以信赖的一体化GPC系统 HLC-8320 GPC EcoSEC (EcoSEC 小型系统)

超高压离子色谱仪 IC-2010

无需注册便可浏览
和获得各种丰富的
技术资料!



衷心感谢!

东曹（上海）生物科技有限公司

销售：021-34610856*213（上海）；010-64109008*106（北京）

技术支持：021-34610856*203, 208（色谱柱、仪器）

021-34610856*205（填料）

留言信箱：info@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com