



耐碱型、高载量、高流速

**TOYOPEARL AF-rProtein A-650F**层析介质

(快速浏览版)

东曹（上海）生物科技有限公司  
Tosoh Bioscience Shanghai Co., Ltd.  
2011.04



# TOYOPEARL AF-rProtein A-650F层析介质

## ■ 新一代单克隆抗体纯化用Protein A填料

(类似于MabSelect SuRe填料，但是有更多其他特点...)

### ■ 耐碱型 / 良好的化学稳定性

- 0.1 mol/L NaOH CIP次数超过100次以上
- 可以使用0.1 mol/L, 0.5 mol/L NaOH、乙醇、尿素等清洗
- 可以在室温条件下保存该填料

### ■ 高载量

- 在1分钟的柱留时间(Residence Time)下载量比同类产品高出30%
- 高浓度单抗料液(10g/L)进样时载量比同类产品高出20%

### ■ 大型层析制备柱的装填同样适用

- TOYOPEARL 填料可以装填至数百升的大型层析制备柱(填料刚性好)

### ■ 填料使用成本降低

- 无论是工艺初期筛选用小包装，还是生产用大包装，填料价格优惠！



## 同类产品价格比较

### TOYOPEARL AF-rProtein A-650F填料展现了...

#### ■ 工艺初期筛选用产品价格更便宜

- 有10mL, 25mL两种小包装散装填料
- 有1mL, 5mL两种ToyoScreen填料筛选用预装柱

#### ■ 与GE Healthcare同类产品比较(MabSelect SuRe, Xtra)

- 25mL包装: MabSelect SuRe价格的50%
- 25mL包装: MabSelect Xtra价格的70%
- 5mLx2包装: rProtein A Seph Fast Flow价格的70%
- 1mL, 5mL筛选用预装柱: MabSelect SuRe/Xtra预装柱的60%-70%

#### ■ 与Millipore同类产品比较(ProSep Ultra Plus)

- 5mL筛选用预装柱: ProSep Ultra Plus预装柱的70%



## 同类产品性能比较

### TOYOPEARL AF-rProtein A-650F填料展现了...

#### ■ 与GE Healthcare的MabSelect SuRe产品相比

- 小于2分钟的柱留时间下载量高出15%
- 小于2分钟的柱留时间下，10g/L浓度的单抗料液进样时载量高出20%
- 填料成本降低10%

#### ■ 与GE Healthcare的MabSelect Xtra产品相比

- MabSelect Xtra为非耐碱型Protein A填料
- 填料成本降低10%

#### ■ 与Millipore的Prosep Ultra Plus产品相比

- Prosep Ultra Plus为非耐碱型Protein A填料
- 填料成本降低10%



## TOYOPEARL AF-rProtein A-650F产品线及市场价格

货号	产品名称	包装规格	北美	欧洲
022803	Toyopearl AF-rProtein A-650F	10mL	\$700	€700
022804	Toyopearl AF-rProtein A-650F	25mL	\$1,200	€1,200
022805	Toyopearl AF-rProtein A-650F	100mL	\$2,400	€2,400
022806	Toyopearl AF-rProtein A-650F	1L	请来电咨询	请来电咨询
022807	Toyopearl AF-rProtein A-650F	5L	请来电咨询	请来电咨询
022808	Toyopearl AF-rProtein A-650F	50L	请来电咨询	请来电咨询
022809	ToyoScreen AF-rProtein A-650F	1mL*5	\$650	€650
022810	ToyoScreen AF-rProtein A-650F	5mL*1	\$600	€600
022811	ToyoScreen AF-rProtein A-650F	5mL*5	\$1,950	€1,950
021400	ToyoScreen Holder	--	\$37	€34

说明：超过1L包装的产品价格，请与东曹（上海）生物科技有限公司销售人员或代理公司销售人员联系。



## 同类产品的市场价格比较(散装填料)

产品名称	厂家	包装	北美	欧洲	日本
Toyopearl AF-rProtein A-650F	Tosoh	10mL	\$700	€700	JPY70,000
Toyopearl AF-rProtein A-650F	Tosoh	25mL	\$1,200	€1,200	JPY150,000
Toyopearl AF-rProtein A-650F	Tosoh	100mL	\$2,400	€2,400	JPY300,000
MabSelect SuRe	GE Healthcare	25mL	\$2,359	€2,620	JPY286,000
MabSelect SuRe	GE Healthcare	200mL	NA	€5,292	NA
MabSelect SuRe	GE Healthcare	1L	\$14,000	€13,230	NA
MabSelect SuRe	GE Healthcare	5L	\$60,000	€66,150	NA
MabSelect SuRe	GE Healthcare	50L	NA	€514,000	NA
MabSelect XT	GE Healthcare	25mL	\$2,449	NA	JPY214,000
rProtein A Sepharose Fast Flow	GE Healthcare	5mL	NA	NA	JPY55,000
rProtein A Sepharose Fast Flow	GE Healthcare	25mL	NA	NA	JPY165,000
Prosep-vA High Capacity	Millipore	1L	\$12,463	NA	NA
Prosep-vA High Capacity	Millipore	5L	\$62,320	NA	NA
Prosep-vA Ultra	Millipore	1L	\$13,233	NA	NA
Prosep-vA Ultra	Millipore	5L	\$66,167	NA	NA
Novasep AbSolute	NovaSep	1L	NA	NA	NA

说明：部分价格为推算价格；部分价格可能因地区而异。



## 同类产品的市场价格比较(预装柱)

产品名称	厂家	规格	北美	欧洲	日本
Toyopearl AF-rProtein A-650F	Tosoh	1mL*5	\$650	€650	JPY67,000
Toyopearl AF-rProtein A-650F	Tosoh	5mL*1	\$600	€600	JPY60,000
Toyopearl AF-rProtein A-650F	Tosoh	5mL*5	\$1,950	€1,950	JPY195,000
MabSelect SuRe	GE Healthcare	1mL*5	\$836	€839	JPY87,000
MabSelect SuRe	GE Healthcare	5mL*1	\$780	€786	JPY77,000
MabSelect SuRe	GE Healthcare	5mL*5	\$3,273	€3,295	JPY326,000
MabSelect XT	GE Healthcare	1mL*5	\$597	NA	JPY76,500
MabSelect XT	GE Healthcare	5mL*1	\$574	NA	JPY70,500
MabSelect XT	GE Healthcare	5mL*5	\$2,327	NA	JPY283,000
HiTrap Protein A HP	GE Healthcare	5mL*1	NA	NA	JPY49,500
HiTrap Protein A HP	GE Healthcare	1mL*5	NA	NA	JPY57,000
HiTrap Protein A HP	GE Healthcare	5mL*1	NA	NA	JPY61,000
HiTrap Protein A HP	GE Healthcare	5mL*5	NA	NA	JPY230,000
HiTrap rProtein A F.F.	GE Healthcare	1mL*5	NA	NA	JPY67,000
Prosep-vA High Capacity	Millipore	10mL*1	\$735	NA	JPY55,100
Prosep Ultra Plus	Millipore	1mL*1	NA	NA	JPY23,000
Prosep Ultra Plus	NovaSep	5mL*1	NA	NA	JPY87,000

说明：部分价格为推算价格；部分价格可能因地区而异。



耐碱型、高载量、高流速

**TOYOPEARL AF-rProtein A-650F**层析介质

(完整版)

东曹（上海）生物科技有限公司

Tosoh Bioscience Shanghai Co., Ltd.

2011.04





# 单抗层析工艺中可用于捕获阶段的层析法比较

	对单抗的载量	可获得的单抗纯度	填料的清洗	填料的成本	有待改进之处
Protein A亲和层析	+	+++	++	+	载量, 耐碱洗, 成本
阳离子交换层析	+++	+	+++	+++	纯度(分离效果)
混合模式层析	+	++	+++	++	载量, 成本



## 关于Protein A亲和层析

- 熟知并被证明为单抗纯化中最为有效的层析介质
- 高选择性和高分离效果(高纯度)
- 载量: 20-50 g/L(DBC;动态吸附载量)
- 酸性低pH值下的洗脱容易导致单抗多聚体的增加(HMW)
- 需要在后续步骤中去除脱落的Protein A配体
- 新一代rProtein A层析介质
  - 高载量rProtein A层析介质
  - 耐碱、高载量、高通量等
- 层析介质的成本昂贵
  - 非重组蛋白A类型: \$4,000-8,000/L
  - 重组蛋白A类型: \$8,000-10,000/L
  - 新一代耐碱型、高流速类型: < \$15,000/L

(参考: IEC, HIC, HCIC填料价格; \$500-3,000/L)



## TOYOPEARL AF-rProtein A-650F层析介质的主要特点

### ■ 单抗的高动态吸附载量

- 高流速仍然有高动态吸附载量 (柱留时间<3分钟)
- 在1分钟的柱留时间下仍然有25 g/L的高动态吸附载量
- 在1分钟的柱留时间、单抗高进样浓度(10 g/L) 下仍然有24 g/L 的高吸附载量

### ■ 高化学和基质稳定性

- 耐碱：可以使用0.1 mol/L或0.5 mol/L的NaOH进行填料清洗
- 即使经过了100次CIP， 仍然保持高的动态吸附载量
- 高温下的稳定性：在35摄氏度下可以稳定保存1.5年
- 良好的填料刚性：可以应用至大型制备层析柱
- 由于rProtein A配体采用多点键合方式，配体的脱落更少
- 未使用动物原料
- 可以在室温下保存该填料

### ■ 筛选用产品的优惠价格有效降低科研/研发投入

- 10mL, 25mL的散装填料和 1mL, 5mL的ToyoScreen预装柱



## TOYOPEARL AF-rProtein A-650F层析介质的基本信息

■ 填料骨架	TOYOPEARL HW-65F
■ 粒径	45 micron
■ 孔径	100 nm
■ 配体	重组蛋白 A异构体
■ 配体键合方式	多点键合
■ IgG载量(静态吸附)	> 45 g/L
■ IgG载量(动态吸附)	> 30 g/L(柱留时间: 2分钟)
■ 生物负载	
• 细菌	< 100 colonies/mL
• 内毒素	< 10 EU/mL
• 杂质/异物	< 6 particles/100 mL
■ 未使用动物原料	
■ 出货溶剂	20%的乙醇水溶液
■ 配体的脱落	5-25 ng/mg IgG(酶联免疫法测定)
■ 保存温度	4-35摄氏度*
	(* 长期保存时推荐温度: 4-10摄氏度)



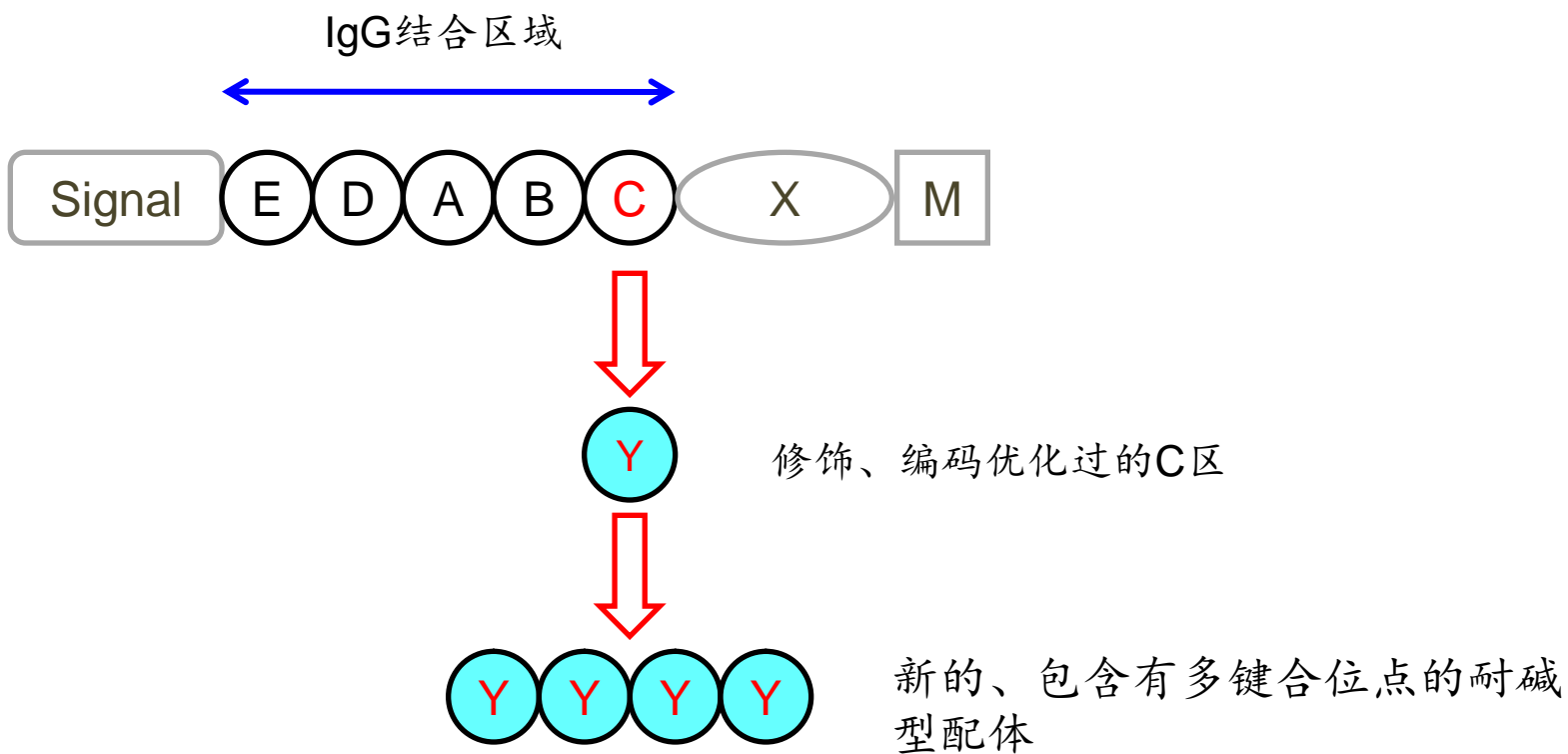
## 产品规格 / 分析保证

■ 填料粒径	30-60微米 (> 80%)
■ IgG载量(静态)	> 45 g/L
■ 生物负载	
• 细菌	< 100 colonies/mL
• 内毒素	< 10 EU/mL
■ 杂质/异物	< 6 particles/100 mL
■ 出货溶剂	20%的乙醇水溶液

\*COA: the Certificate of Analysis(分析保证)

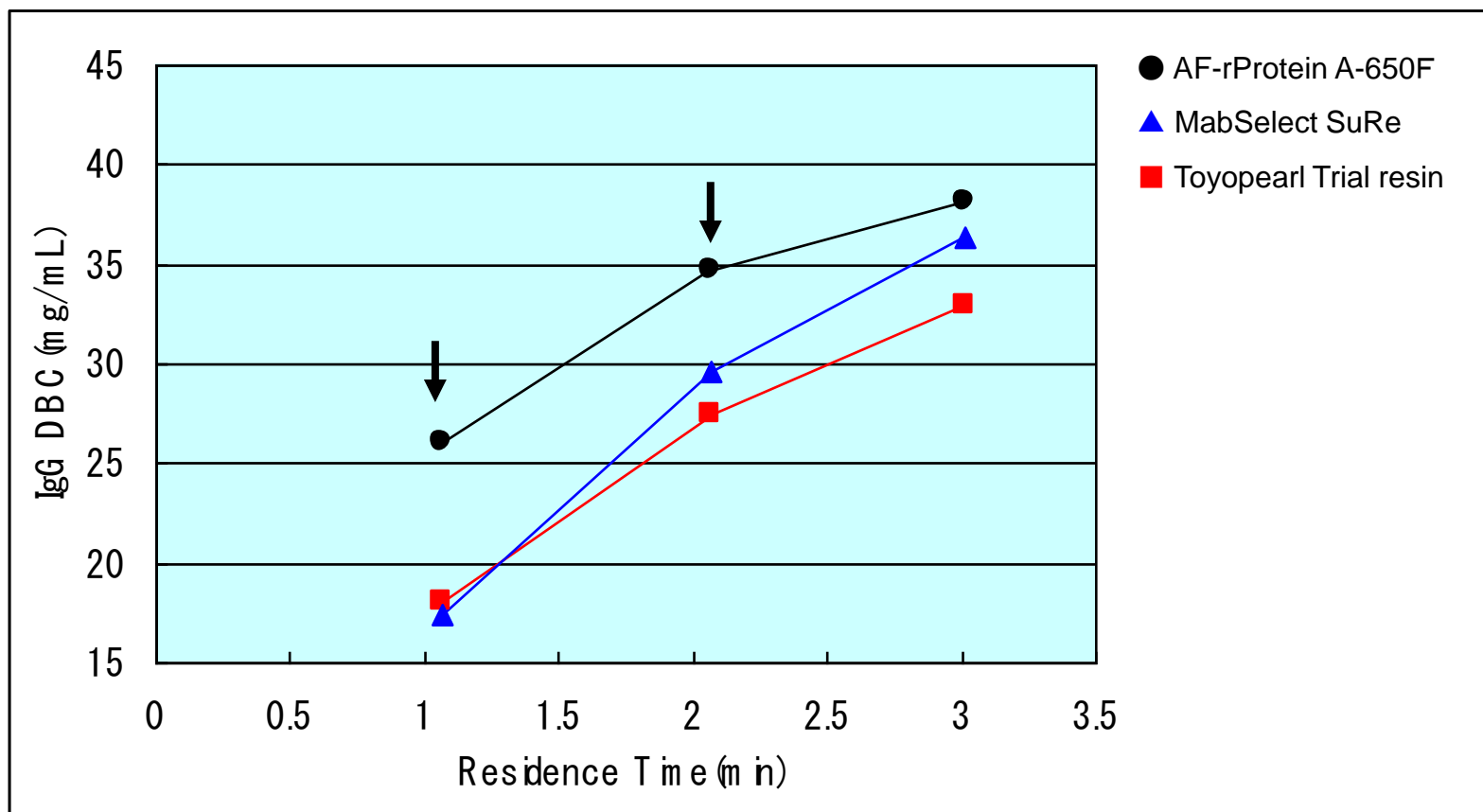


# rProtein A异构体的结构





## 柱留时间对IgG动态吸附载量的影响



当柱留时间低于3分钟时，TOYOPEARL AF-rProtein A-650F的动态吸附载量比MabSelect SuRe高出约 20-30%。



## 不同柱留时间下IgG进样浓度与动态吸附载量的关系

Residence time (min)	Flow rate (cm/hr)	DBC (g/L)			
		IgG conc. at 5 g/L		IgG conc. at 10 g/L	
		AF-rProtein 650F	MabSelect SuRe	AF-rProtein 650F	MabSelect SuRe
1.5	200	25.9	20.5	24.0	17.5
2.0	150	28.6	24.6	27.2	22.2
2.5	120	30.8	28.3	29.4	26.8
3.0	100	31.9	30.2	30.5	30.0
4.0	75	33.2	33.5	31.5	35.5
5.0	60	34.4	36.6	33.0	38.7

层析介质: TOYOPEARL AF-rProtein A-650F, MabSelect SuRe

层析柱尺寸: 5 mm I.D. x 5 cm (1mL)

层析条件: 0.02 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.2) + 0.15 mol/L NaCl

动态吸附载量(DBC): 根据破过曲线(breakthrough curve)并允许10%的漏出条件下计算得出

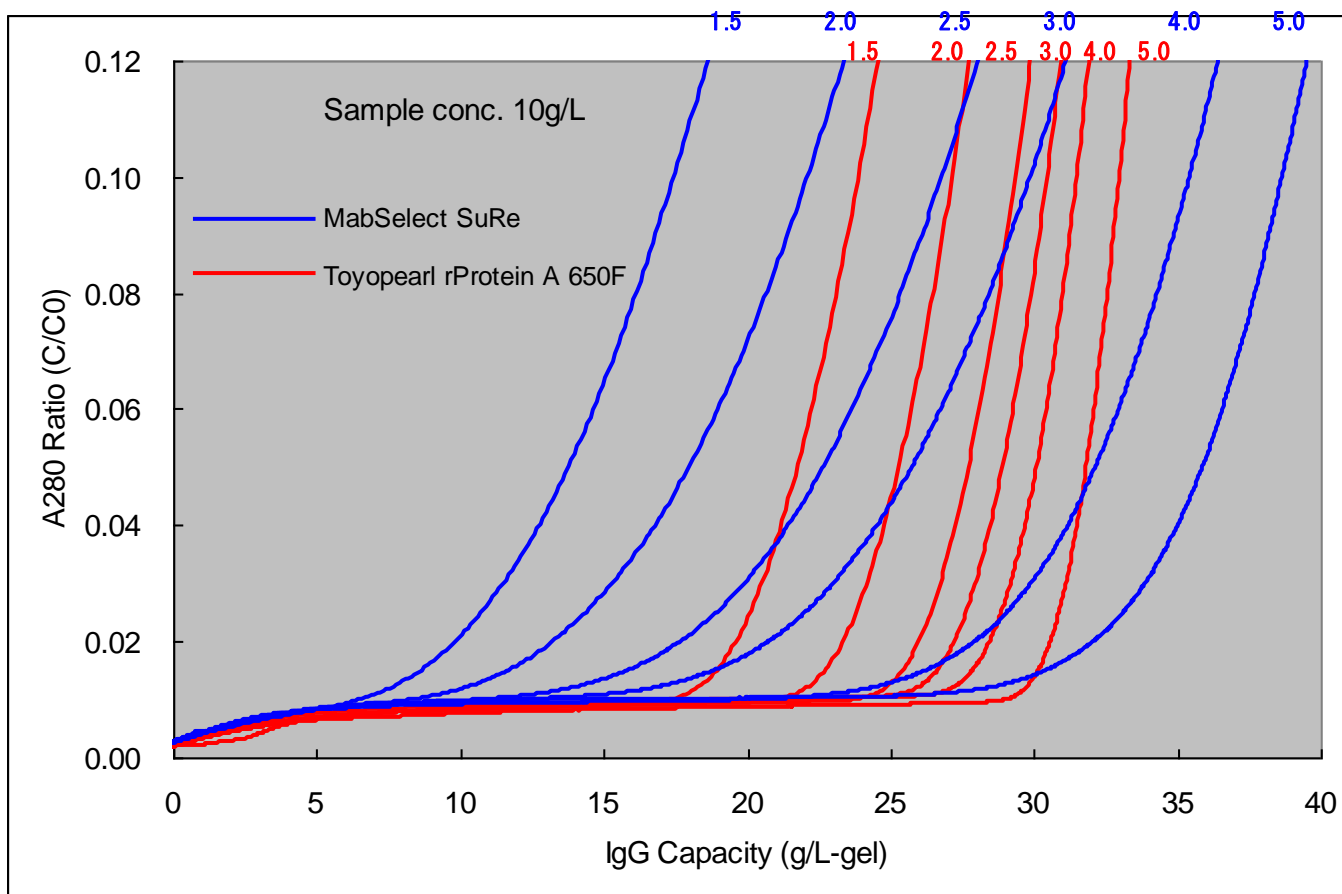
样品:  $\gamma$ 球蛋白(IgG)

在柱留时间低于2.5分钟的情况下, 高浓度的IgG进样时, TOYOPEARL AF-rProtein A-650F的动态吸附载量比 MabSelect SuRe高出约10-30%。





## 10 g/L高浓度IgG进样下不同柱留时间的破过曲线比较



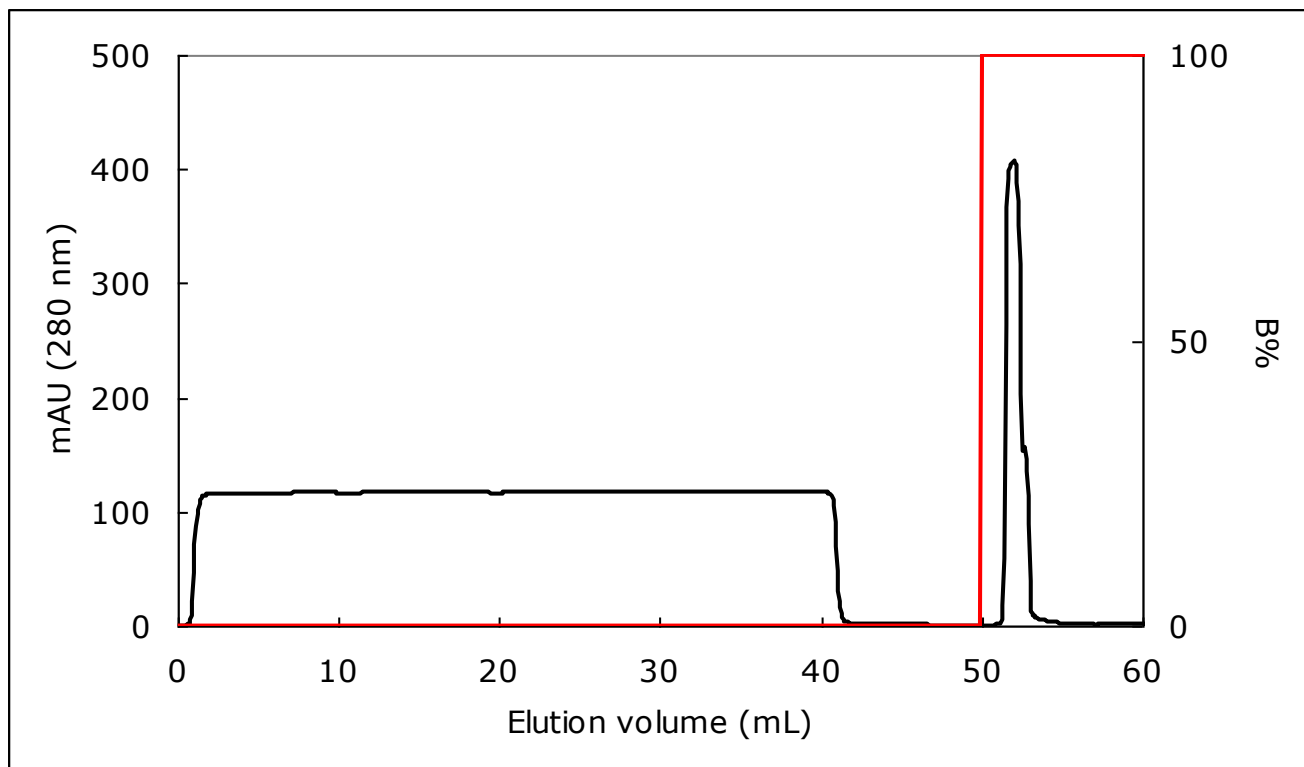
层析柱尺寸: 5 mm I.D. x 5 cm (1mL)

层析条件: 0.02 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.2) + 0.15 mol/L NaCl

柱留时间: 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 min



# CHO表达的单克隆抗体的纯化实例



## 【层析条件】

层析柱： TOYOPEARL AF-rProtein A-650F (5 mm I.D. X 4.9 cm),

流速： 0.5 mL/min

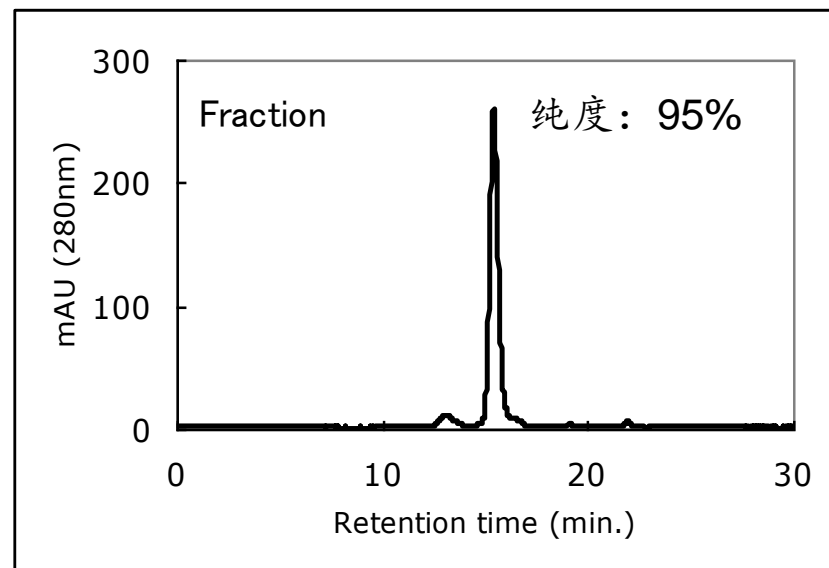
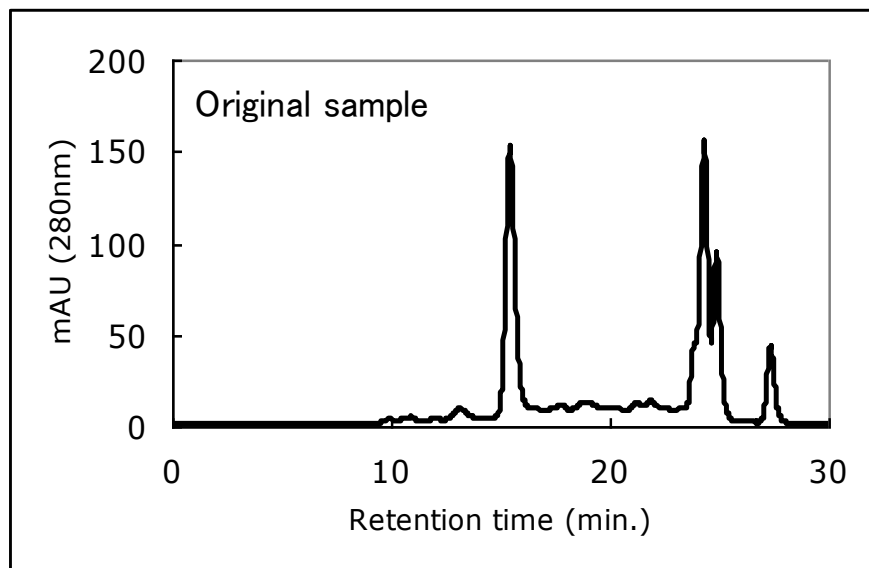
样品： 40 mL (CHO细胞培养、包含有0.5 mg/mL的人源IgG<sub>1</sub>)

上样液： 20 mmol/L磷酸钠缓冲液 + 0.15 mol/L NaCl (pH 7.4)

洗脱液： 0.1 mol/L盐酸胍 (pH 3.0)



# 纯化后的单抗组分纯度确认(SEC-HPLC法)



## 【色谱条件】

色谱柱: TSKgel G3000SW<sub>XL</sub> (7.8 mm I.D. X 30 cm)

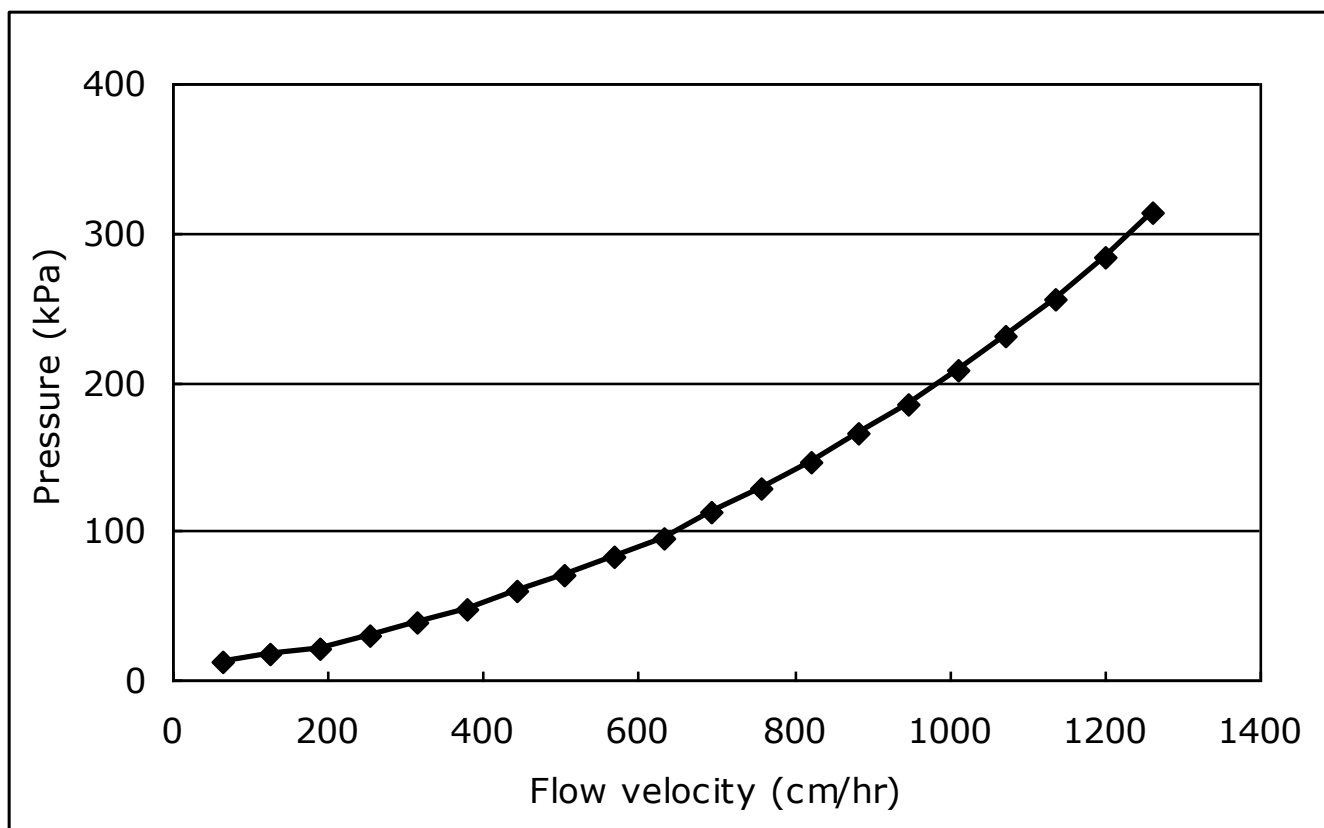
流速: 0.5 mL/min

流动相: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 + 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 6.8)

样品: 原料液样品 (进样体积为40 mL), 单抗收集组分 (进样体积为3 mL)



## 良好的层析介质刚性(流速与压降的关系)



层析柱尺寸: 2.2 cm I.D. x 20 cm

TOYOPEARL AF-rProtein A-650F层析介质可以使用于高至1,000 cm/hr的超高流速下。

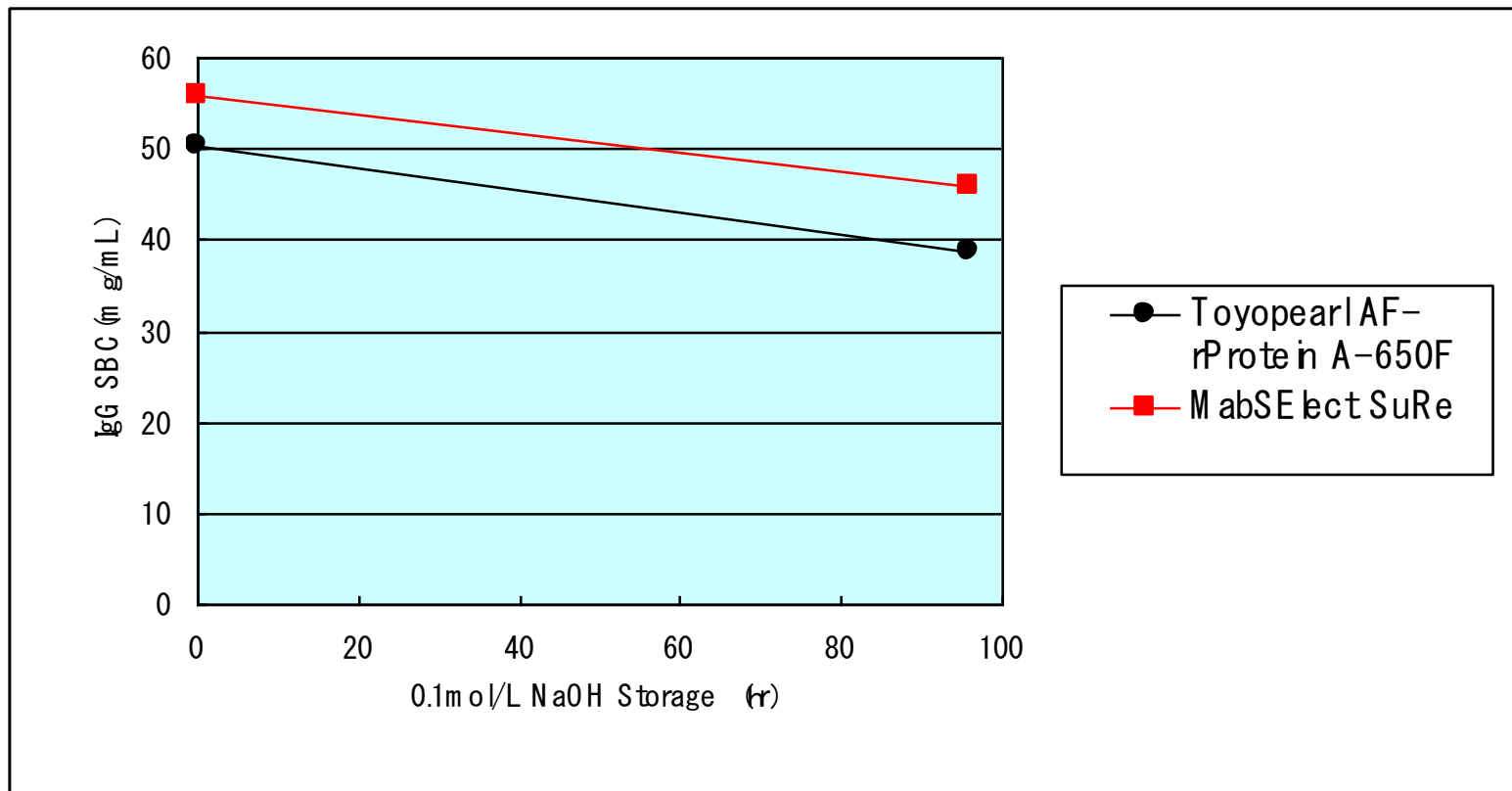


## 层析介质的批次差验证

	Lot A	Lot B	Lot C
IgG载量 (SBC)	51.0 g/L	50.1 g/L	53.1 g/L
IgG载量 (DBC)	35.7 g/L	33.6 g/L	35.6 g/L
IgG的纯度 (SEC-HPLC法)	98.8%	98.5%	98.5%



## 良好的耐碱性能



TOYOPEARL AF-rProtein A-650F层析介质表现出与GE公司 MabSelect SuRe层析介质相似的耐碱性能。



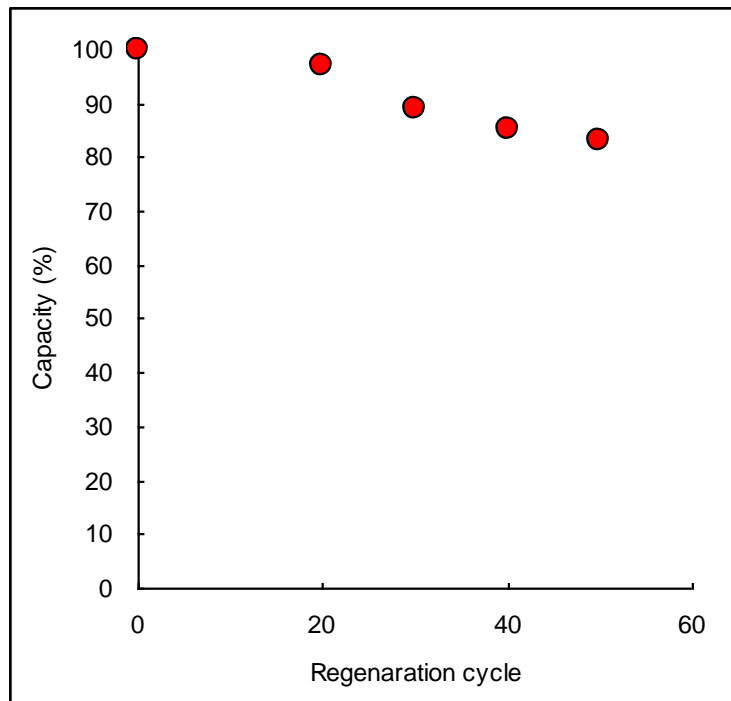
## 0.1 mol/L NaOH的CIP研究

	CIP 未处理前	CIP 100次	CIP 200次	CIP 300次
IgG载量 (DBC, %)	38 g/L (100%)	35 g/L (92%)	32 g/L (84%)	27 g/L (71%)
rProtein A 配体的脱落	22 ng/mL	7 ng/mL	5 ng/mL	7 ng/mL

CIP: 使用0.1 mol/L的NaOH处理8.2CV(柱床体积; 处理时间约为16.7分钟)  
rProtein A配体脱落的检测: ELISA套装(酶联免疫法; Protenova公司产品)



## 0.5 mol/L NaOH的CIP研究



层析介质: TOYOPEARL AF-rProtein A-650F; 层析柱尺寸: 4.6 mm I.D. X 10 cm  
样品: hIgG; 动态吸附载量的计算: 允许10%的漏出(破过曲线)

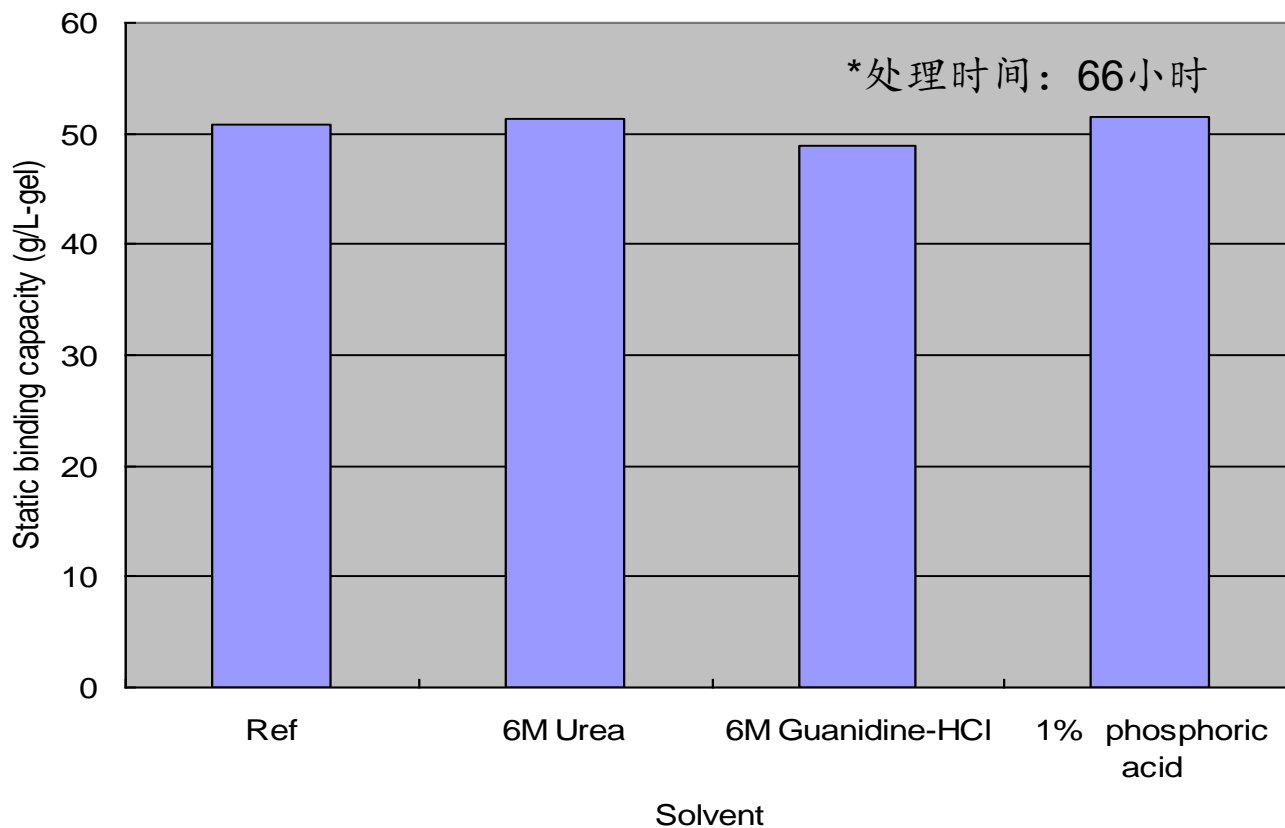
### 【层析/CIP过程的描述】

- 吸附: 0.02 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) + 0.15 mol/L NaCl
  - 洗脱: 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 3.0)
  - 吸附缓冲液(pH 7.2)处理3CV后, 使用0.5 mol/L的NaOH处理17分钟
  - 吸附缓冲液(pH 7.2)处理3CV
- 在20次CIP后, 每10次测定一次动态吸附载量(DBC)。





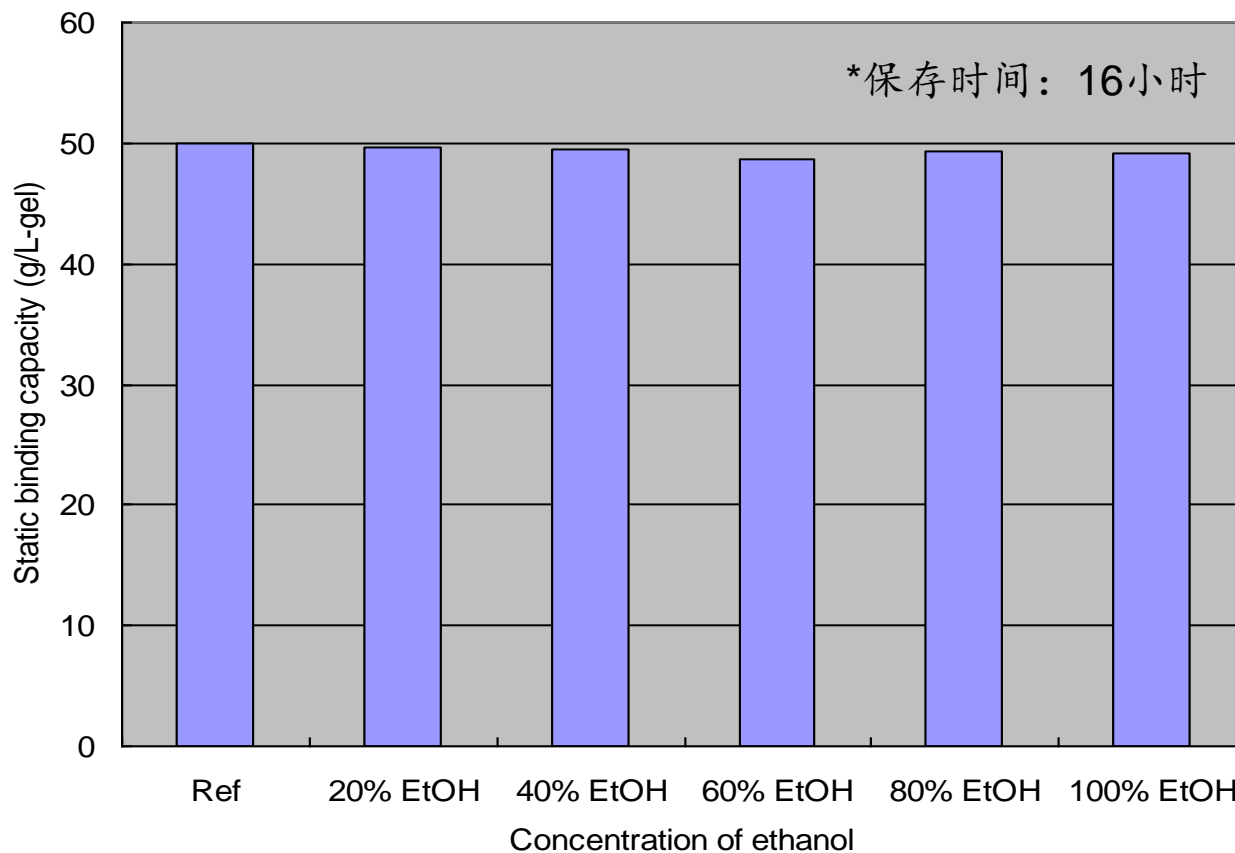
## 对变性剂的稳定性



TOYOPEARL AF-rProtein A-650F层析介质对传统变性剂是非常稳定的。



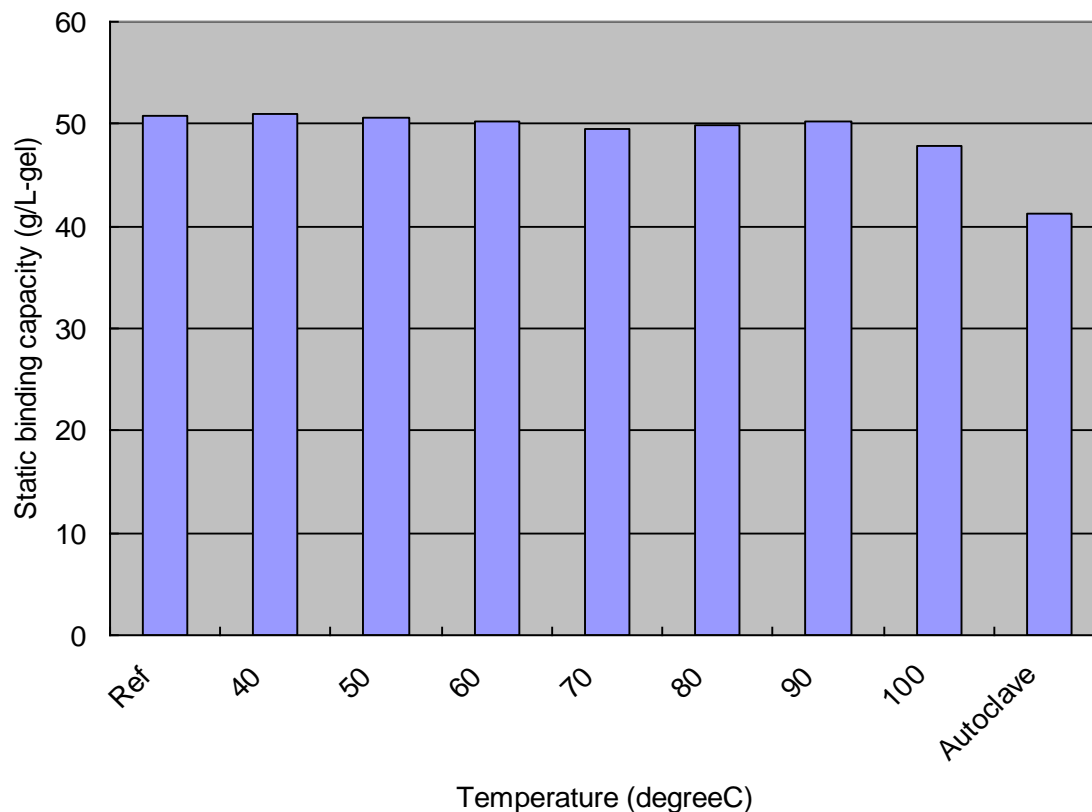
## 对乙醇的稳定性



TOYOPEARL AF-rProtein A-650F在高浓度有机溶剂(如：乙醇)保存下稳定。



## 对温度的稳定性



加热时间：30分钟；高温灭菌：120摄氏度, 1.2atm, 15分钟；溶剂：去离子水

**TOYOPEARL AF-rProtein A-650F 在较高的温度下也能保持稳定。**  
**这种填料在生产现场可以室温保存。**  
**(可以在35度条件下保存1.5年)**



# rProtein A配体脱落检测用酶联免疫套装产品

产品货号：022815

产品名称：Protein A-R28 ELISA kit

产品包括：

- 2个96孔的平板
- anti-Protein A R-28抗体
- 其他试剂



## 精氨酸添加对单抗回收率的影响

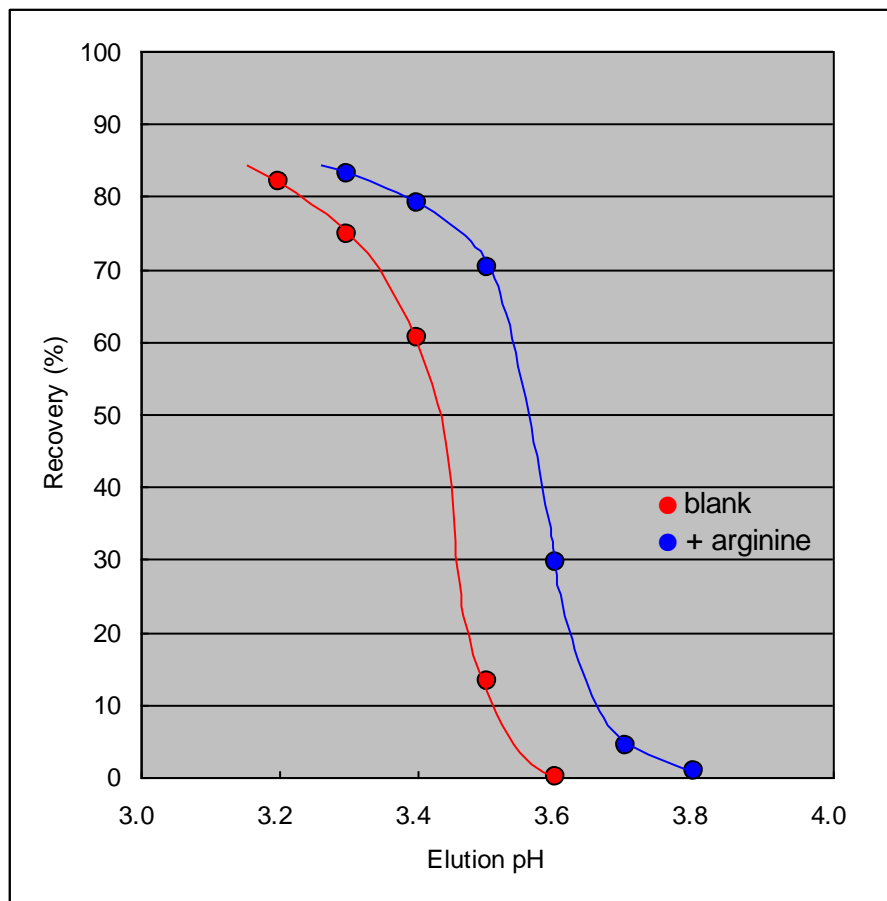
当必须在3.3-3.5的低pH下进行单抗洗脱时：

- 在洗脱液中每添加0.1 mol/L的精氨酸，可以提高0.1个单位的pH进行单抗的洗脱。
- 0.1 mol/L的精氨酸是众所周知的抗体稳定剂，可以有效减少抗体多聚体的产生。
- 洗脱缓冲液举例
  - 0.1 mol/L的柠檬酸缓冲液(pH 3.4) + 0.1 mol/L的精氨酸

参考文献： Elution of antibodies from a Protein A column by aqueous arginine solutions, T. Arakawa et al., Protein Expression and Purification, 36 (2004) 244-248



## 精氨酸添加对单抗回收率的影响



单抗洗脱：pH梯度洗脱

洗脱缓冲液中添加100 mM的精氨酸，可以提高IgG的回收率。

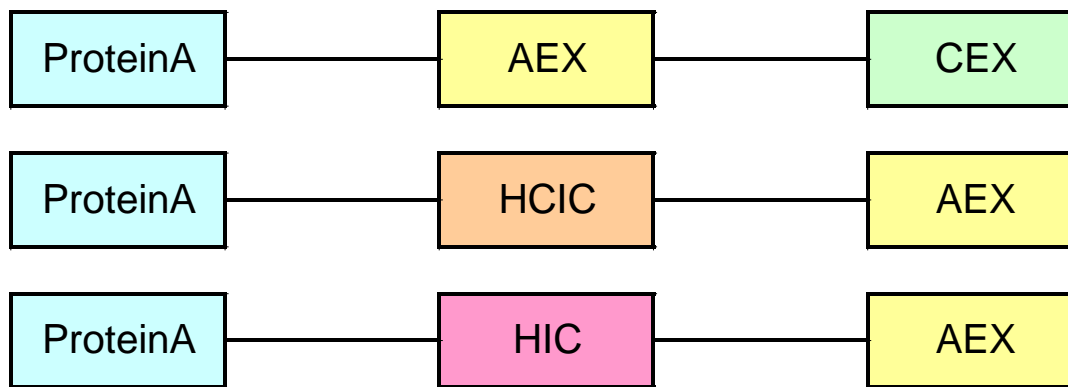


# 典型的单抗纯化用层析工艺

## Protein A process

Capture

Intermediate/Polishing

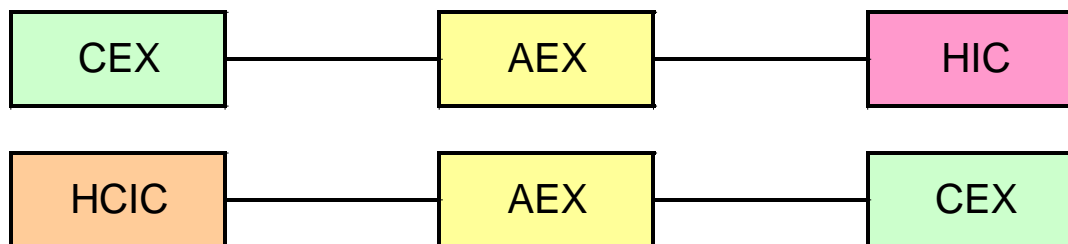


\* HAP may be also applied.

## Non-Protein A process

Capture

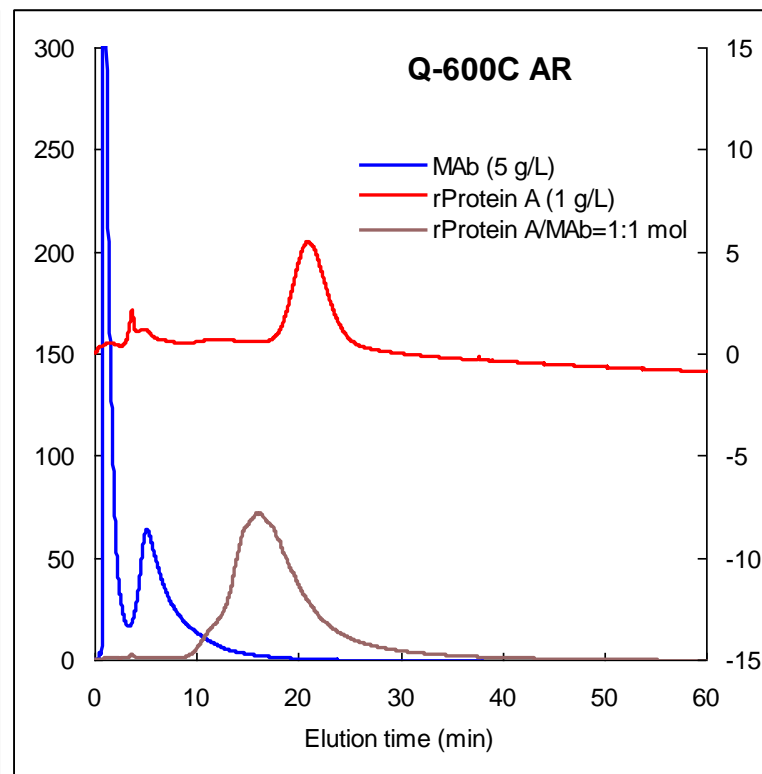
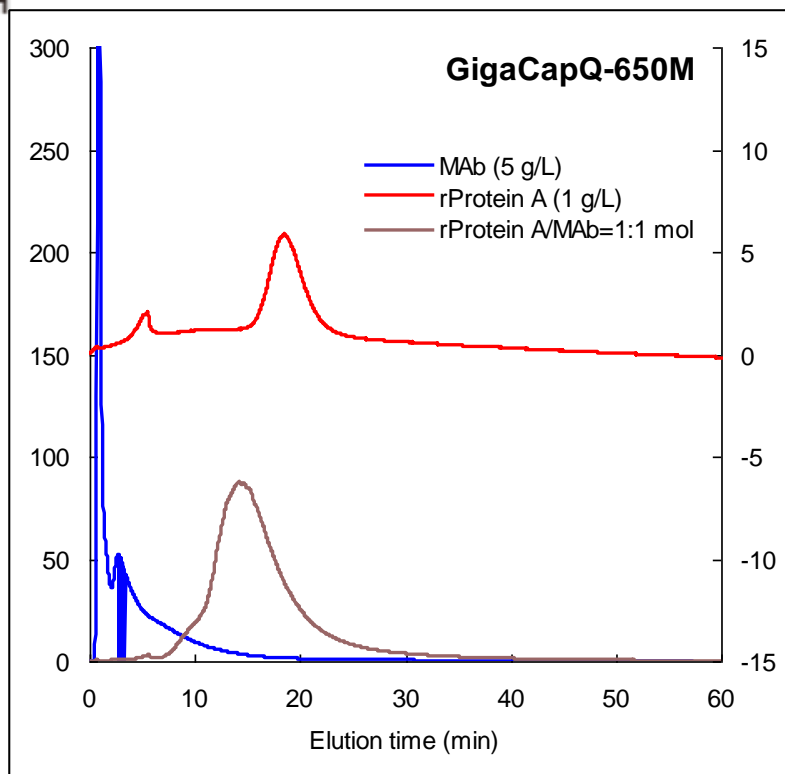
Intermediate/Polishing



\* HAP may be also applied.



## 阴离子交换填料对rProtein A的去除



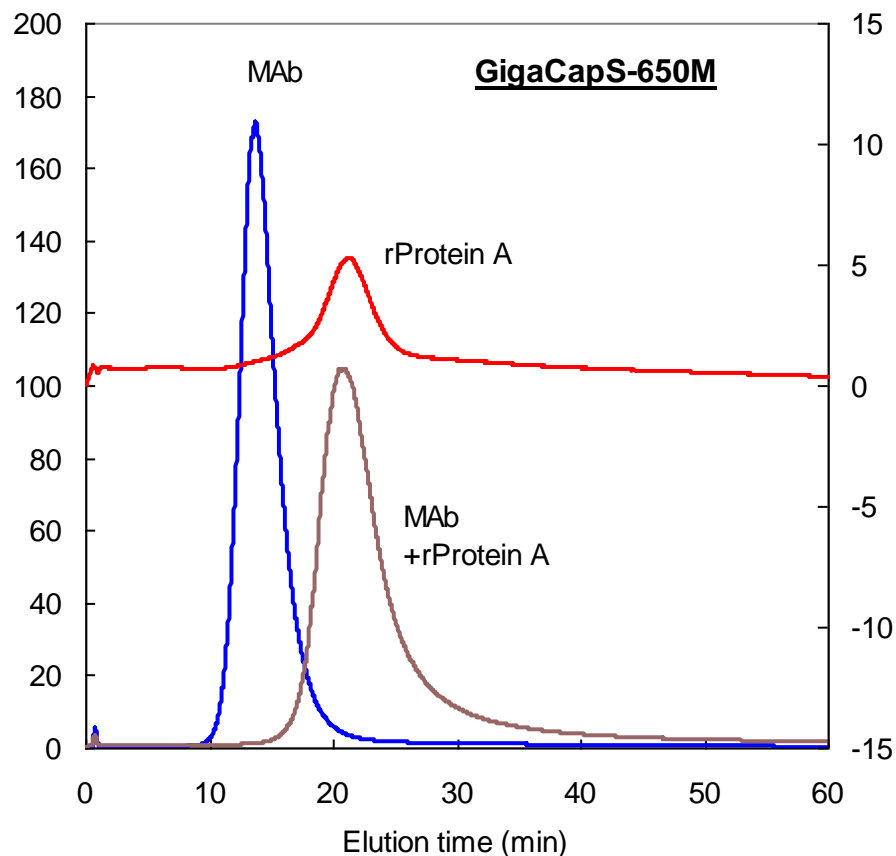
Column ToyoScreen GigaCapQ-650M (1mL)  
ToyoScreen Q-600C AR (1mL)  
Euffer A; 20mmol/L Tris-HCl (pH8.5)  
Euffer B; 0.5mol/L NaCl in Buffer A  
60 min linear gradient from Buffer A to Buffer B  
Flow-rate 1.0mL/min Detectic UV 280nm  
Sample 1) Mab, 5g/L 2) rProtein A, 1g/L  
3) rProtein A/Mab = 1/1(mol)  
100 uL

单独的单抗样品在阴离子交换层析时是流穿的。但rProtein A样品和单抗/rProtein A混合样品是有保留的。





## 阳离子交换填料对rProtein A的去除



Column; ToyoScreen GigaCap S-650M (1mL)  
Buffer A; 20mmol/L sodium phosphate (pH6.0)  
Buffer B; 0.5mol/L NaCl in Buffer A  
60 min linear gradient from Buffer A to Buffer B  
Flow rate; 1.0mL/min  
Detection; UV 280nm  
Sample; 1) MAb (5g/L)    2) rProtein A (1g/L)  
3) rProtein A/Mab = 1/1 mol  
100 uL



## 总结

新一代、键合了耐碱型rProtein A配体的

**TOYOPEARL rProtein A-650F层析介质:**

- 一步层析法便可获得纯度为95%的单克隆抗体
- 高流速、高浓度单抗料液进样时具有更高的吸附载量
- 高流速下，与目前商业化耐碱型蛋白A填料相比，对IgG载量提高了10%-30%
- 对NaOH、其他的变性剂(如盐酸胍、尿素) 以及有机溶剂(如乙醇)稳定，可以很方便地进行填料的清洗
- 良好的层析介质刚性，确保填料可以用于高流速下而不发生柱床塌陷；更易装填至大型层析制备柱用于目标样品的捕获



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（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](mailto:info@tosoh.com.cn)

网址：[www.separations.asia.tosohbioscience.com](http://www.separations.asia.tosohbioscience.com)