



SEPARATION REPORT

高性能亲和色谱柱 TSKgel® FcR-III A-NPR

— 目 录 —

	页码
1. 前言	- 1 -
2. TSKgel FcR-III A-NPR 色谱柱的基本特性	- 1 -
2-1. 填料的特点	- 1 -
2-2. 标准分离条件	- 1 -
2-3. 洗脱液成分的影响	- 3 -
2-4. 样品上样量的影响	- 4 -
2-5. 色谱柱的耐用性	- 4 -
2-6. 清洗方法	- 5 -
2-7. 填料的批间差异	- 5 -
2-8. 保存稳定性	- 6 -
3. 应用实例	- 6 -
3-1. 抗体的分析实例	- 6 -
3-2. 抗体糖链结构和保留能力的关系	- 7 -
3-3. 细胞培养液中的抗体分析	- 7 -
4. 使用注意事项	- 8 -
5. 总结	- 8 -

1. 前言

随着癌症及自身免疫性疾病治疗领域对抗体药物需求的快速增长，全球各地都在新设和扩充抗体药物的生产设备。抗体药物主要通过动物细胞培养进行生产，近几年的研究发现，抗体Fc段的糖链结构会对药效产生很大影响。这可以理解为糖链结构的差异会影响与承担免疫反应效应细胞上的Fc受体的结合，以及引起由此而产生的免疫应答。

因此，生产抗体药物时对糖链结构进行严格的质量控制是至关重要的。此次，东曹生命科学将高效液相亲和色谱（AFC）分析柱TSKgel FcR-III A-NPR实现了商品化。该色谱柱能够根据抗体与Fc受体之一的FcγRIIIA之间的亲和性进行分离。本文将向大家介绍TSKgel FcR-III A-NPR色谱柱的基本特性和应用实例。

2. TSKgel FcR- IIIA-NPR色谱柱的基本性质

2-1. 填料的特点

TSKgel FcR-III A-NPR 是将重组 FcγRIIIA 作为配基，键合在非多孔亲水性聚合物基质的填料上，并填充至 PEEK 色谱柱内的亲和色谱柱。该色谱柱配基是通过天然氨基酸序列替换多个氨基酸，使其物理化学稳定性得以改善后由转基因大肠杆菌表达的FcγRIIIA。

由于FcγRIIIA会特异性结合抗体Fc铰链区，因此即使是含有杂质的细胞培养上清液也可以直接上样，进行抗体的吸附和分离。此外，该色谱柱使用了非多孔填料，分离性能得以大幅提升。

TSKgel FcR-III A-NPR色谱柱的基本参数如表1所示。

表1. TSKgel FcR-III A-NPR 色谱柱的基本参数

货号	0023513	
填料	基质	非多孔亲水性聚合物
	粒径	5 μm
	配基	改进型FcγRIIIA（由大肠杆菌表达）
色谱柱	尺寸	4.6 mm I.D. × 7.5 cm
	材质	PEEK
	出货溶剂	0.025 % ProClin® 300 + 0.65 mmol/L 柠檬酸 + 9.35 mmol/L 柠檬酸钠（pH 6.5）
使用条件	pH 范围	pH 4.0 ~ pH 8.0（短期）、pH 5.0 ~ pH 7.0（长期）
	温度	15 °C ~ 25 °C
	推荐流速	1.0 mL/min
	最大压降	9.0 MPa
保存条件	先替换成出厂溶剂，再冷藏（2 °C ~ 8 °C）	

“ProClin”是 Rohm and Haas Company 的注册商标。

2-2. 标准分离条件

大多数抗体会在中性pH值附近（pH 6.0~7.5）吸附到FcγRIIIA，并在酸性条件下（pH 4.0~5.0）脱吸附，因此使用TSKgel FcR-III A-NPR分离抗体时，一般使用pH值不同的2种溶液进行pH梯度洗脱。

虽然各种缓冲溶液都可以作为洗脱溶液使用，但pH范围宽且具有缓冲能力的柠檬酸钠缓冲溶液最为合适。尤其是在分析由CHO细胞培养的人IgG₁抗体时，标准的洗脱溶液为：使用 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液（pH 6.5）作为吸附用洗脱溶液（洗脱溶液A），使用 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液（pH 4.5）作为洗脱用洗脱溶液（洗脱溶液B）。

用洗脱液A 预先将色谱柱平衡后（注入5倍柱体积以上的溶液），注入样品，使抗体结合。其后线性梯度切换到洗脱液B，使抗体洗脱。最后，再使用洗脱液A重新进行平衡后进行下一次分析。TSKgel FcR-III A-NPR色谱柱的配基FcγRIIIA具有一定的耐酸性，但是请注意，如果长期暴露在酸性缓冲溶液中会导致色谱柱寿命缩短。

此外，部分抗体及样品中所含的杂质会对填料产生非特异性吸附，可能会导致保留时间慢慢缩短。在很多情况下，这种吸附是由于离子性相互作用引起，因此可以通过向洗脱液A及B中添加150 mmol/L左右的NaCl进行抑制。

表2中列举了具有代表性的洗脱液示例。不同抗体其最佳吸附、洗脱条件也不同，因此建议对不同的样品进行条件优化。图1是使用柠檬酸钠缓冲溶液（表2的例1中所示条件）时抗体分离实例和pH变化。

从图2中可知，FcγRIIIA 配基的抗体亲和性会受到分析时的色谱柱温度影响。所以，为了获得稳定的分析结果我们强烈建议使用柱温箱。图2是分别在15、20、25 °C 的条件下色谱柱保留时间的变化。从图中可知，温度升高，对抗体的亲和力下降，抗体的保留时间缩短。

表2. 分离条件示例

	例1	例2	例3
洗脱液	A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 6.5) B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.5)	A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 + 150 mmol/L NaCl (pH 6.5) B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 + 150 mmol/L NaCl (pH 4.0)	A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 + 150 mmol/L NaCl (pH 6.5) B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 + 150 mmol/L NaCl (pH 4.0)
梯度程序	0 ~ 2 分钟 B 0 % 2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %，线性梯度 20 ~ 25 分钟 B 100 % 25 ~ 30 分钟 B 0 %	0 ~ 2 分钟 B 0 % 2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %，线性梯度 20 ~ 25 分钟 B 100 % 25 ~ 30 分钟 B 0 %	0 ~ 7 分钟 B 0 % 7 ~ 25 分钟 B 0 % → 100 %，线性梯度 25 ~ 30 分钟 B 100 % 30 ~ 35 分钟 B 0 %
流速	1.0 mL/min	1.0 mL/min	1.0 mL/min
检测	UV 280 nm	UV 280 nm	UV 280 nm
进样体积	1~ 100 μL	1~ 100 μL	1~ 100 μL
上样量	5~ 50 μg	5~ 50 μg	5~ 50 μg
备注	标准分析条件	适合吸附较强的样品	适合培养液等含杂质的样品

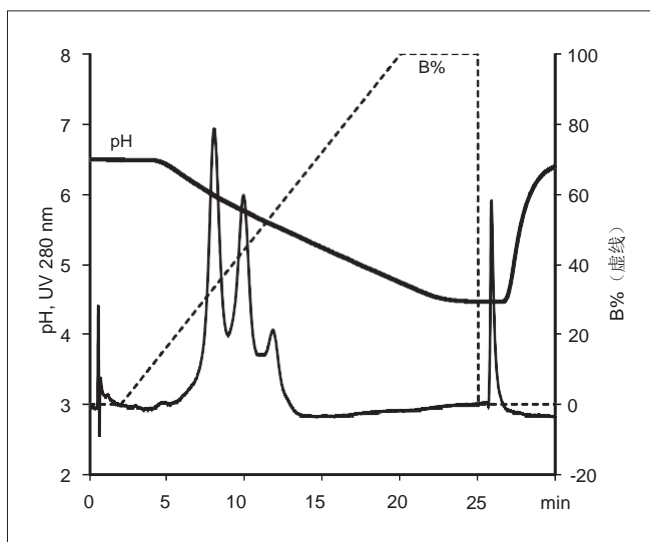


图1. 标准分析条件下的抗体分离实例和 pH 变化

〈分析条件〉

色谱柱: TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. x 7.5 cm)

洗脱液 A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 6.5)

B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.5)

梯度: 0 ~ 2 分钟 B 0 %

2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %，线性梯度

20 ~ 25 分钟 B 100 %

25 ~ 30 分钟 B 0 %

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

样品: 人IgG₁ (Sigma-Aldrich), 10 μg

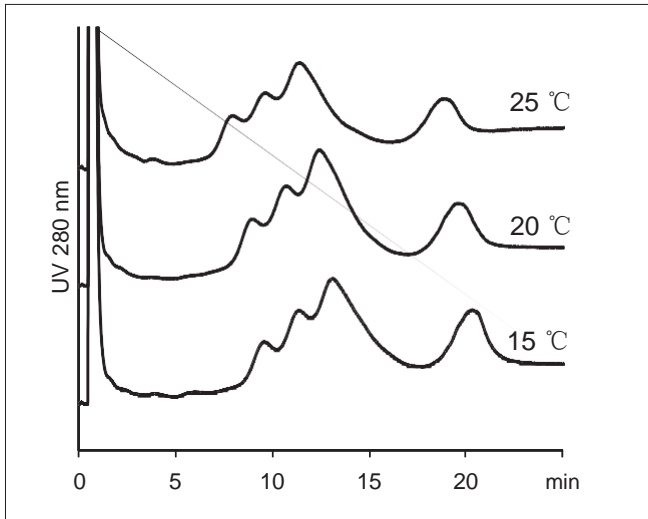


图2. 色谱柱温度对分离的影响

〈分析条件〉

色谱柱: TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)

洗脱液 A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 6.5)

B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.5)

梯度: 0 ~ 2 分钟 B 0 %

2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %, 线性梯度

20 ~ 25 分钟 B 100 %

25 ~ 30 分钟 B 0 %

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 见图

样品: 人丙种球蛋白, 20 μg

2-3. 洗脱液成分的影响

在分析与Fc受体结合大不相同的抗体时, 需要对分离条件进行优化。改变洗脱液的缓冲溶液浓度及NaCl浓度时的单克隆抗体的分离示例如图3所示。FcγRIIIA 配基与

抗体的亲和性除了pH及温度之外, 还会受离子强度的影响, 在很多情况下, 高离子强度条件下保留时间会缩短。另一方面, 如果用洗脱力极弱的洗脱溶液进行分析, 需要注意抗体会残留在色谱柱中, 有可能会影响下一次的分析。

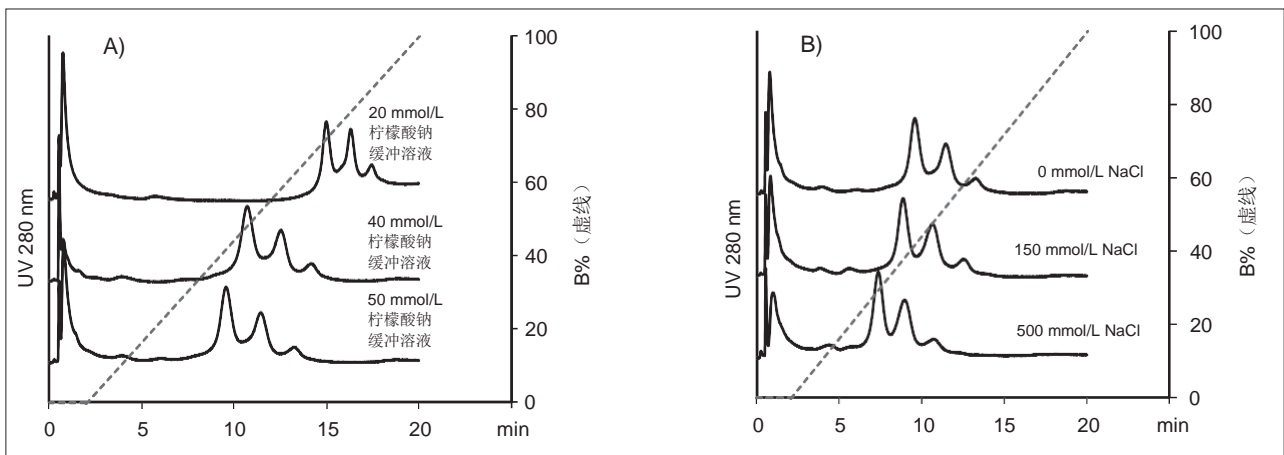


图3. 洗脱液成分对分离的影响

〈分析条件〉

色谱柱: TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)

洗脱液 A: 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 6.5)

B: 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.5)

(缓冲溶液浓度如图中所示)

梯度: 0 ~ 2 分钟 B 0 %

2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %, 线性梯度

20 ~ 25 分钟 B 100 %

25 ~ 30 分钟 B 0 %

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

样品: 单克隆抗体

〈分析条件〉

色谱柱: TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)

洗脱液 A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 + NaCl (pH 6.5)

B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 + NaCl (pH 4.5)

(NaCl 浓度如图中所示)

梯度: 0 ~ 2 分钟 B 0 %

2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %, 线性梯度

20 ~ 25 分钟 B 100 %

25 ~ 30 分钟 B 0 %

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

样品: 单克隆抗体

2-4. 样品上样量的影响

TSKgel FcR-III A-NPR采用了非多孔填料，具有良好的分离性能，但与常规填料相比，样品最高上样量会受到一定的限制。这虽然取决于检测器的灵敏度，但以流

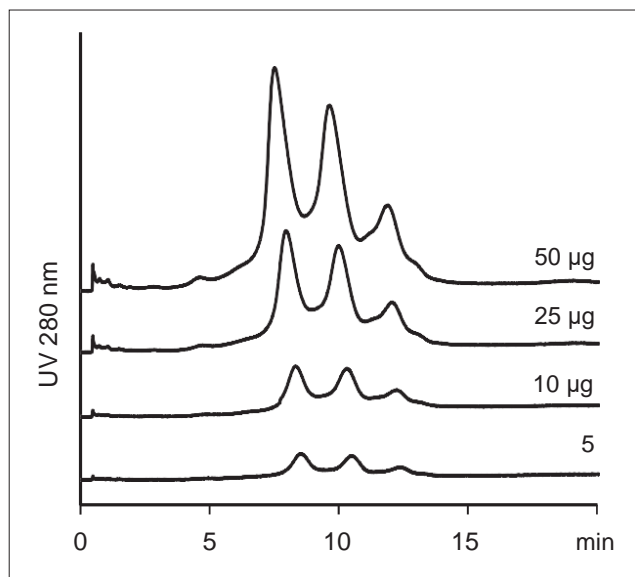


图4. 样品上样量对分离的影响

2-5. 色谱柱的耐用性

以含单克隆抗体的CHO细胞培养上清液为样品，连续进样200次进行分析。使用表2的条件3以抑制杂质等非特异性吸附。每进样20次的色谱图如图5所示，抗体保留时间及分辨率没有出现明显变化，耐用性良好。但需注意

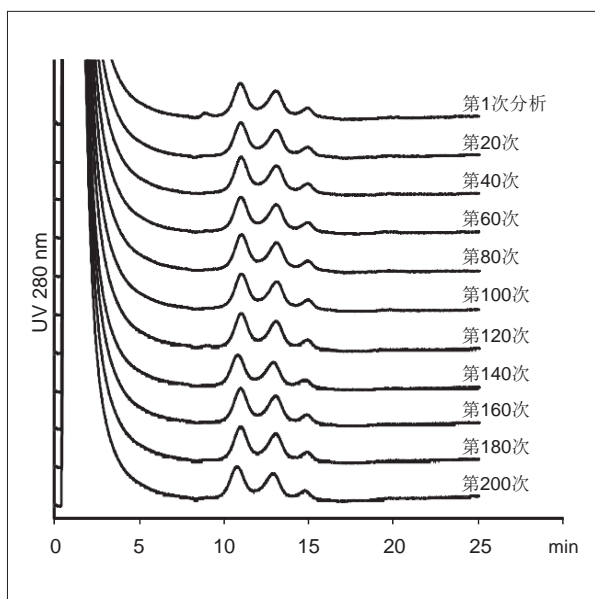


图5. 色谱柱耐用性试验的色谱图

速1.0 mL/min洗脱时为例，每次的抗体上样量在 5 µg ~ 50 µg 之间较为合适。图4是改变抗体上样量时的色谱图。峰分辨率几乎相同，但抗体的保留能力随着抗体上样量的增加而下降。

〈分析条件〉

色谱柱：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. x 7.5 cm)

洗脱液 A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 6.5)

B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.5)

梯度: 0 ~ 2 分钟 B 0 %

2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %, 线性梯度

20 ~ 25 分钟 B 100 %

25 ~ 30 分钟 B 0 %

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

样品: 人IgG₁ (Sigma-Aldrich)

的是，柠檬酸钠缓冲液易产生霉菌等微生物，会造成色谱柱堵塞而使压力急剧上升。为了抑制微生物的产生，需要考虑采取对策，例如用0.2 µm的过滤器对洗脱溶液进行过滤、定期更换成新配制的洗脱液等。此外，将在线过滤器设置在输液泵与进样器之间也具有很好的效果。

〈分析条件〉

色谱柱：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. x 7.5 cm)

洗脱液A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液+150 mmol/L NaCl (pH 6.5)

B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 +150 mmol/L NaCl (pH 4.0)

梯度: 0 ~ 7 分钟 B 0 %

7 ~ 25 分钟 B 0 % → 100 %, 线性梯度

25 ~ 30 分钟 B 100 %

30 ~ 35 分钟 B 0 %

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 20 °C

样品: 含抗体的细胞培养上清液

2-6. 清洗方法

将洗脱力不足的缓冲溶液作为洗脱溶液使用时，有可能杂质会残留在填料表面，从而影响下一次分析。例如，将含有单克隆抗体的CHO细胞培养上清液作为样品，使用40 mmol/L的柠檬酸钠缓冲溶液（洗脱液A：pH 6.5、洗脱液B：pH 4.5）时，样品会残留在色谱柱内，反复分析而导致保留能力下降。出现这种现象时，可以使用进样器注

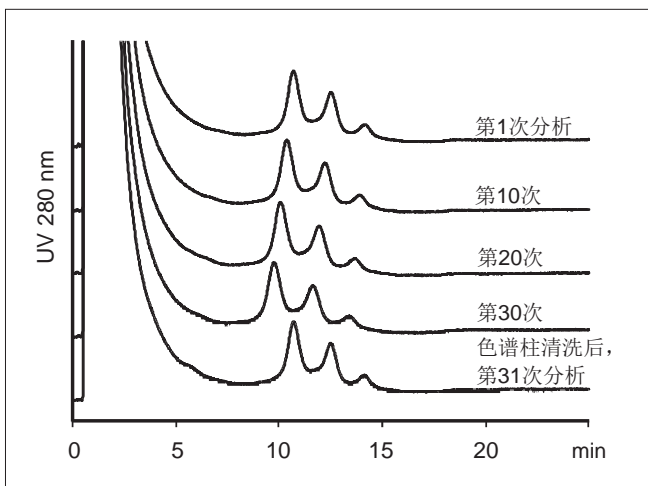


图6. 洗脱不良造成的保留能力下降和色谱柱清洗后的效果

2-7. 填料的批间差异

使用3个批次的填料分析 IgG₁的色谱图如图7所示。填料批次间峰型、洗脱位置未见明显差异，批次间重复性良好。

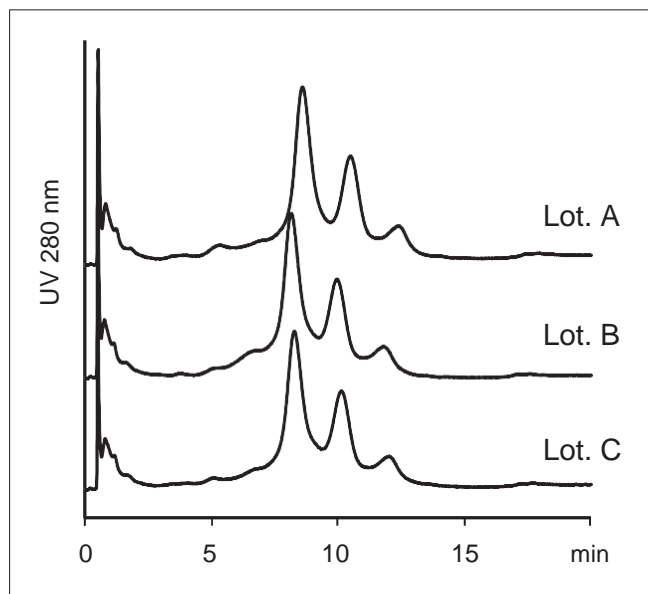


图7. 填料的批次间差异比较

入含500 mmol/L NaCl 的缓冲液或含20 vol%乙醇缓冲液来恢复保留能力。图6 所示的是因色谱柱污染造成的保留时间下降以及通过清洗恢复保留时间的色谱图。

请注意TSKgel FcR-III A-NPR色谱柱的FcγRIIIA 配基没有足够的耐碱性，不可使用氢氧化钠水溶液等碱性溶液作为清洗液。

〈分析条件〉

色谱柱：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)

洗脱液 A：40 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 6.5)

B：40 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.5)

梯度：0 ~ 7 分钟 B 0 %

7 ~ 25 分钟 B 0 % → 100 %，线性梯度

25 ~ 30 分钟 B 100 %

30 ~ 35 分钟 B 0 %

流速：1.0 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：20 °C

样品：含抗体的细胞培养上清液

清洗液：40 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 +

500 mmol/L NaCl (pH 4.5)

清洗方法：一边注入洗脱液A，一边注入50 μL清洗液 3次

〈分析条件〉

色谱柱：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)

洗脱液 A：50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 6.5)

B：50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.5)

梯度：0 ~ 2 分钟 B 0 %

2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %，线性梯度

20 ~ 25 分钟 B 100 %

25 ~ 30 分钟 B 0 %

流速：1.0 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

样品：人IgG₁ (Sigma-Aldrich) , 10 μg

2-8. 保存稳定性

图8 所示为TSKgel FcR-III A-NPR 使用出货溶剂并在冷藏条件下保存时的抗体保留时间维持率和理论塔板数维持率。从图中可知，两种维持率经过12个月后未出现很大

变化，固定在填料上的FcγRIIIA 配基稳定。然而，由于该色谱柱的配基为蛋白质，可以预见因各种蛋白酶及微生物的作用会使色谱柱性能劣化，因此需要在保存时进行妥善管理。

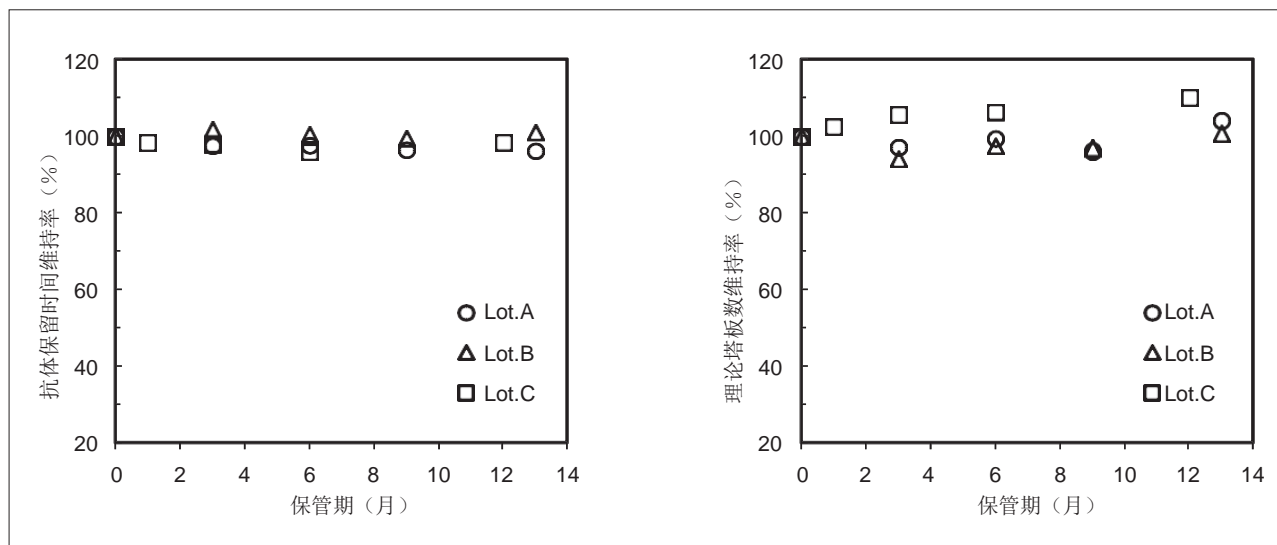


图8. 色谱柱的保存稳定性

〈抗体保留时间的分析条件〉

色谱柱：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)

洗脱液：50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 5.1)

流速：0.3 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

样品：人丙种球蛋白，20 μg

※比较第3个色谱峰的保留时间

〈理论塔板数的分析条件〉

色谱柱：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)

洗脱液：100 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液 +

100 mmol/L 硫酸钠 (pH 6.7)

流速：1.0 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

样品：1% 丙酮水溶液，10 μL

3. 应用实例

3-1. 抗体的分析实例

图9 所示为各种抗体的分析结果。从图中可以发现，在很多情况下，用CHO细胞培养的标准单克隆抗体中会洗脱出3个主峰。此外，还发现峰值面积比率根据抗体样品不

同会存在很大差异。我们比较了岩藻糖型和脱岩藻糖型的曲妥珠单抗生物类似药的色谱图，发现脱岩藻糖型抗体呈现保留时间长的峰组分含量变多的趋势。有文献称，一般具有脱岩藻糖型糖链的抗体其ADCC 活性更高。本次实验结果也与该文献的结论一致。

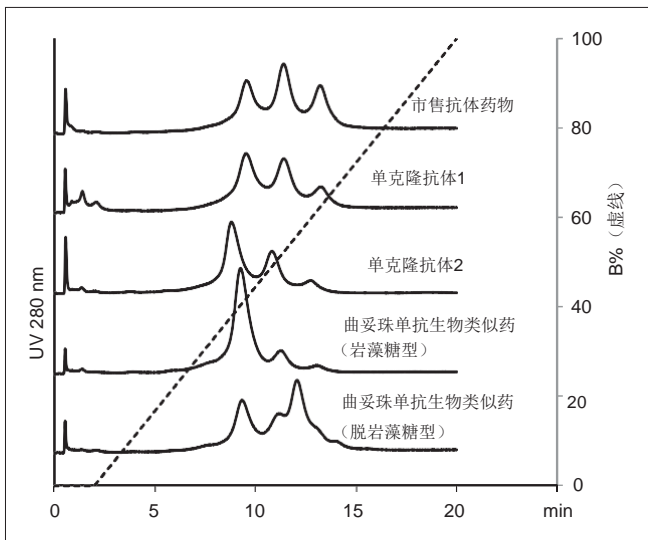


图9. 对各种单克隆抗体药物的分析实例

〈分析条件〉

色谱柱: TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. x 7.5 cm)

洗脱液 A: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 6.5)

B: 50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.5)

梯度: 0 ~ 2 分钟 B 0 %

2 ~ 20 分钟 B 0 % → 100 %, 线性梯度

20 ~ 25 分钟 B 100 %

25 ~ 30 分钟 B 0 %

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

样品: 各种单克隆抗体药物, 各10 μg

3-2. 抗体糖链结构和保留能力的关系

我们采用制备型FcyRIIIA柱, 对由CHO细胞培养的单克隆抗体进行制备分离, 收集3个峰组分, 峰纯度在80%以上。我们对所得到的各组分的抗体糖链结构进行了分析, 并对每个糖链结构的保留能力倾向进行了验证。结果

如表3所示。根据这一结果, 可以理解TSKgel FcR-III A-NPR色谱柱能够识别抗体的糖链, 并基于糖链结构差异实现分离。此外, 我们还发现在糖链末端是否含有半乳糖对亲和性有很大影响。

表3. 抗体糖链结构和保留能力的关系

糖链结构	简称	保留能力	糖链结构	简称	保留能力
	G0F	弱		Man5	弱
	G1F	强		SG2F	强
	G1'F	弱		S2G2F	强
	G2F	强			

3-3. 细胞培养液中的抗体分析

由于抗体以外的成分不会吸附到TSKgel FcR-III A-NPR上, 所以即便是像细胞培养液这种含有大量杂质的样品, 只要设置合适的分析条件, 也可以直接上样进行分析。细胞培养液中的抗体分离实例如图10所示。与纯

化后的抗体分离实例进行比较后发现, 即使样品中含有大量杂质, 也可以得到相同的结果。这种从培养液中直接分离抗体的技术也可用作抗体药物生产工艺培养过程中的监测手段。

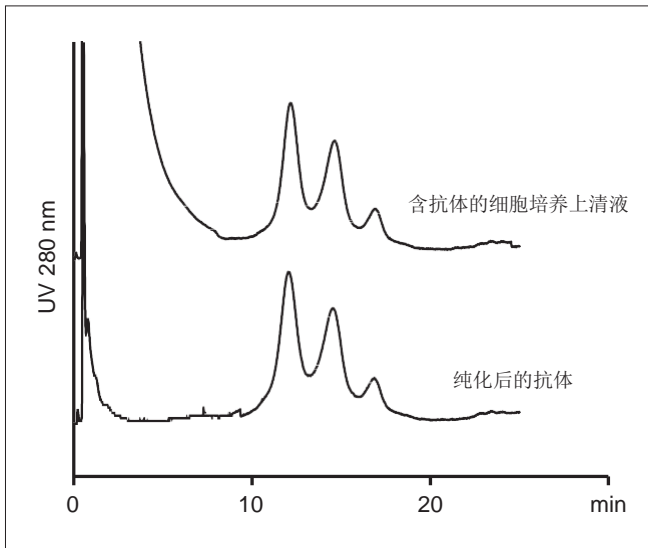


图10. 含抗体的细胞培养上清液及纯化后的抗体之分离比较

〈分析条件〉

色谱柱：TSKgel FcR-III A-NPR（4.6 mm I.D. × 7.5 cm）

洗脱液A：50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 +
150 mmol/L NaCl（pH 6.5）

B：50 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 +
150 mmol/L NaCl（pH 4.5）

梯度：0 ~ 7 分钟 B 0 %

7 ~ 25 分钟 B 0 % → 100 %，线性梯度

25 ~ 30 分钟 B 100 %

30 ~ 35 分钟 B 0 %

流速：1.0 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：20 °C

样品：含抗体的细胞培养上清液、纯化后的抗体

4. TSKgel FcR-III A-NPR 色谱柱的使用注意事项

使用注意事项如表4所述。

表4. 使用注意事项

HPLC系统	<ol style="list-style-type: none"> 使用前对仪器系统内部进行清洗（在连接色谱柱前） <ol style="list-style-type: none"> 系统内部已充分清洗的仪器 以1.0 mL/min的流速注入0.1 mol/L 柠檬酸水溶液大约30分钟，对系统内部进行清洗。 旧系统、系统内部清洗不到位的仪器 <ol style="list-style-type: none"> 以1.0 mL/min的流速注入0.1 mol/L 氢氧化钠水溶液约30分钟； 以1.0 mL/min的流速注入纯水约30分钟； 以1.0 mL/min的流速注入0.1 mol/L 柠檬酸水溶液大约30分钟。 <p>在1）、2）全都用上清液洗后，请替换成洗脱溶液 A，以1.0 mL/min的流速注入约15分钟后执行空白梯度。</p> <p>之后连接色谱柱，执行平衡、空白梯度，再开始使用。</p>
洗脱液	<p>在本文中，我们使用柠檬酸缓冲溶液作为洗脱液。由于该洗脱液容易产生微生物，建议现配现用。此外，不仅仅是柠檬酸缓冲溶液，同时也建议洗脱溶液在配制后，用孔径0.2 μm的过滤器过滤后再使用。</p> <p>另外，在本文中使用的柠檬酸缓冲溶液的配制方法是：将柠檬酸溶解到纯水后，再用氢氧化钠水溶液调节pH值。</p>
样品溶液	样品溶液建议用孔径0.2 μm 的过滤器过滤后再进样。
色谱柱的清洗	请用进样器分多次注入含 0.5 mol/L NaCl 的洗脱溶液或是含20 % 乙醇的洗脱溶液。
色谱柱的保存	请替换成出厂溶剂（0.025 % ProClin® 300 + 0.65 mmol/L 柠檬酸 + 9.35 mmol/L 柠檬酸三钠（pH 6.5））后冷藏保存（2~8 °C）。
色谱柱的使用期限	色谱柱的使用期限详见色谱柱内包装盒及色谱柱所附的分析报告（Analysis Report）。

5. 总结

以上就是对抗体药物分析用的新型亲和色谱柱TSKgel FcR-III A-NPR的介绍。以前，要对抗体药物进行糖链结构分析及活性评价都需要昂贵的设备及繁琐的操作，如果使

用该色谱柱可以非常简便地获得重复性良好的分析结果，并且分析成本低。该色谱柱不仅仅可以用在抗体药物的质量控制，还能应用于研发前期细胞株的筛查、细胞培养条件的优化、以及对培养过程的过程监控等。



TOSOH

TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区虹梅路1801号A区凯科国际大厦1001室

电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858

邮箱：info.tbs@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com