

新一代抗体分析用 **SEC** 色谱柱 TSKgel SuperSW mAb 以及 TSKgel UltraSW Aggregate 的介绍

—— 目 录 ——

1.前言	1
2.TSKgel SuperSW mAb 及 TSKgel UltraSW Aggregate 的基本特性	1
2-1.填料的特点	1
2-2.标准曲线与分离性能	2
2-3.洗脱液中盐浓度的影响	4
2-4.测定时流速的影响	5
2-5.与其它同类 SEC 色谱柱的对比	7
2-6.耐用性	8
3. 分离示例	10
3-1.木瓜蛋白酶分解 IgG 的分离	10
3-2.抗体类药物的高速分析	11
3-3.抗体类药物的精密分析	12
3-4.抗体经热处理后生成的多聚体的分析	13
4. 总结	13

1. 前言

由于单克隆抗体与目标分子的结合具有较高特异性，因此有望成为高效且副作用较少的治疗药物，近年来，众多企业开展了相关研发工作。目前，IgG作为已完成研发并投入使用的抗体类药物的原料药，已知其在生产工艺及保存过程中可能会形成二聚体或多聚体，因此仍存在引发副作用的风险因素。基于对这一观点的考量，在对IgG制品实施质量管理的基础上，还必须对单体、二聚体及多聚体进行定量分析。本次以单体及二聚体的分离为主要用途的抗体分析用SEC（Size-exclusion chromatography；体积排阻色谱法）色谱柱、以及以多聚体分离为主要用途的多聚体分析用SEC色谱柱已实现了商品化。

在本报告中，介绍了抗体分析用SEC色谱柱TSKgel SuperSW mAb HR及TSKgel SuperSW mAb HTP、与多聚体分析用SEC色谱柱TSKgel UltraSW Aggregate的特性和分离示例。

2. TSKgel SuperSW mAb 及 TSKgel UltraSW Aggregate 的基本特性

2-1. 填料的特点

表-1所示为TSKgel SuperSW mAb及TSKgel UltraSW Aggregate的色谱柱特性，以及与常用于抗体分离的现有色谱柱TSKgel G3000SW_{XL}的性能对比。TSKgel SuperSW mAb HR是以25 nm孔径硅胶表面导入二醇基后形成的4 μm微粒为填料装填的色谱柱。与现有的5 μm微粒的TSKgel G3000SW_{XL}相比，具有更高的分离性能，适用于抗体二聚体与单体的分离。另一方面，TSKgel UltraSW Aggregate是以30 nm孔径硅胶表面导入二醇基后形成的3μm微粒为填料的色谱柱，适用于大分子量（分子体积）、抗体多聚体的分离。表-2所示为新上市的TSKgel SuperSW mAb系列及TSKgel UltraSW Aggregate的产品特性一览。

表-1 色谱柱特性

TSKgel	SuperSW mAb HR	SuperSW mAb HTP	UltraSW Aggregate	G3000SW _{XL}
色谱柱尺寸	7.8 mm I.D.x30 cm	4.6 mm I.D.x15 cm	7.8 mm I.D.x30 cm	7.8mm I.D.x30 cm
基质 官能团 微粒直径 孔径 极限排阻分子量(球形蛋白质) 分子量测定范围(球状蛋白质)	硅胶 二醇基 4 μm 25 nm 8.0×10 ⁵ Da 10 ⁴ ~5×10 ⁵ Da	硅胶 二醇基 3 μm 30 nm 2.5×10 ⁶ Da*) 10 ⁴ ~1.5×10 ⁶ Da	硅胶 二醇基 3 μm 30 nm 2.5×10 ⁶ Da*) 10 ⁴ ~1.5×10 ⁶ Da	硅胶 二醇基 5 μm 25 nm 8.0×10 ⁵ Da 10 ⁴ ~5×10 ⁵ Da
用途	抗体二聚体 / 单体 / 片段的精确分析	抗体二聚体 / 单体的快速分析	抗体多聚体的精密分析	蛋白质的分离

*) 推算值

表-2 产品一览
分析柱

货号	产品名称	色谱柱尺寸 (mm I.D.xcm)	理论塔板数	不对称系数
0022854	TSKgel SuperSW mAb HR	7.8x30	≥ 30,000	1.2—1.8
0022855	TSKgel SuperSW mAb HTP	4.6x15	≥ 15,000	0.8—1.4
0022856	TSKgel UltraSW Aggregate	7.8x30	≥ 35,000	1.2—1.8

保护柱

货号	产品名称	色谱柱尺寸 (mm I.D.xcm)	对应的分析柱 (货号)
0022857	TSKgel guardcolumn SuperSW mAb	6.0x4	0022854
0022858	TSKgel guardcolumn SuperSW mAb	3.0x2	0022855
0022859	TSKgel guardcolumn UltraSW	6.0x4	0022856

2-2. 标准曲线与分离性能

使用TSKgel SuperSW mAb HR、TSKgel SuperSW mAb HTP、TSKgel UltraSW Aggregate及TSKgel G3000SW_{XL}分析标准蛋白质的色谱图如图1所示。具有相同孔径的TSKgel SuperSW mAb HR与TSKgel G3000SW_{XL}中，甲状腺球蛋白的二聚体及多聚体不会渗入小孔内而排出，进入间隙体积(V_0)。

另一方面，孔径较大的TSKgel UltraSW Aggregate中，甲状腺球蛋白的二聚体渗入并吸附在小孔内，洗脱比 V_0 慢。图2所示为甲状腺球蛋白的色谱图对比。在TSKgel UltraSW Aggregate上，甲状腺球蛋白的多聚体、二聚体及单体实现了分离。由此可见，TSKgel UltraSW Aggregate色谱柱因具有较大的孔径并能够使样品进入小孔内，比较适合用来分析分子量在500,000以上的蛋白质。

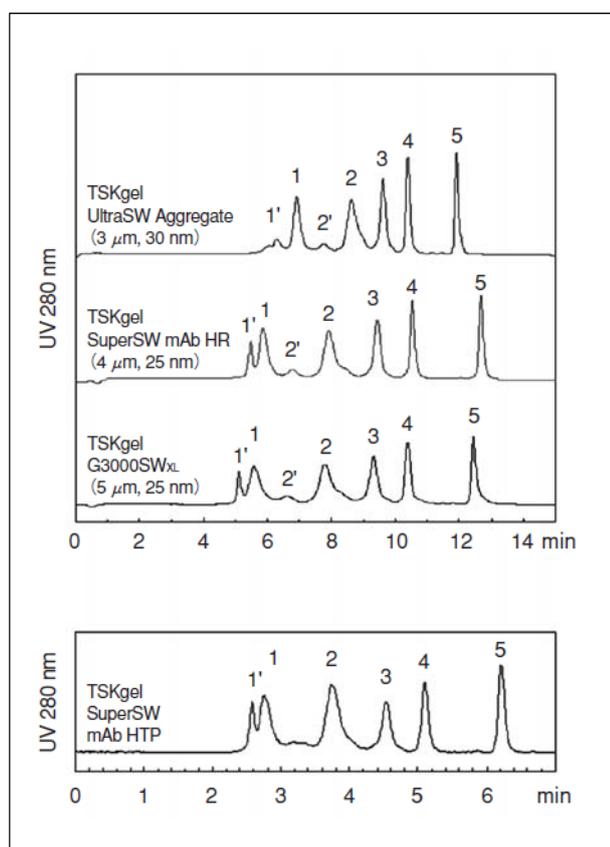


图 1：标准蛋白质的色谱图

分析条件

色谱柱：A. TSKgel UltraSW Aggregate

B. TSKgel SuperSW mAb HR

C. TSKgel G3000SW_{XL}

D. TSKgel SuperSW mAb HTP

色谱柱尺寸：7.8 mm I.D.×30 cm (A, B, C)

采用标准蛋白质制成的标准曲线如图3所示。分子量在10,000~500,000范围内，TSKgel SuperSW mAb HR与TSKgel UltraSW Aggregate相比，标准曲线的斜率更低，意味着可获得更好的分离效果。

图4所示为各色谱柱中分子量标记物的色谱图，表-3所示为各吸收峰的分离效果(分离度:Rs)。在所测定蛋白质的分子量范围方面，标准曲线斜率较低的TSKgel SuperSW mAb HR可获得高于TSKgel UltraSW Aggregate的分离效果。同时，与标准曲线斜率相同的TSKgel G3000SW_{XL}相比，微粒直径较小的TSKgel SuperSW mAb HR的分离效果提高了约1.3倍。

: 4.6 mm I.D.×15 cm (D)

洗脱液：200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃

流速：1.0 mL/min (A, B, C)，0.35 mL/min (D)

检测波长：UV 280 nm

温度：25°C

进样量：10 μL (A, B, C)，5 μL (D)

样品：1. 甲状腺球蛋白 (MW 640,000)

(0.5 g/L; A, B, C, 2.0 g/L; D)

(1'.甲状腺球蛋白二聚体及凝聚物)

2. γ-球蛋白 (MW 155,000)

(1.0 g/L; A, B, C, 1.5 g/L; D)

(2'.γ-球蛋白二聚体)

3. 卵白蛋白 (MW 47,000)

(1.0 g/L; A, B, C, 1.5 g/L; D)

4. 核糖核酸酶A (MW 13,700) (1.5 g/L)

5. p-氨基苯甲酸 (MW 137) (0.01 g/L)

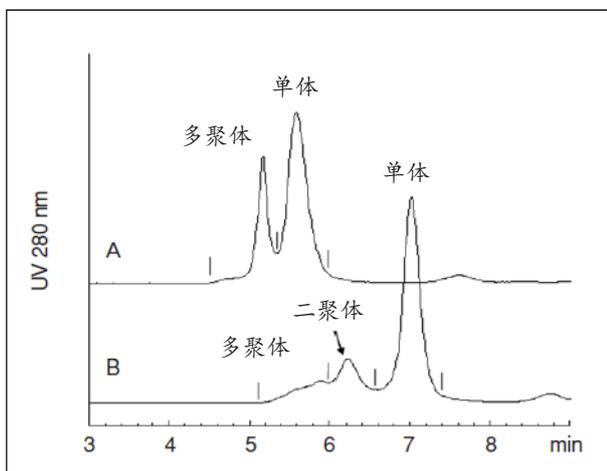


图 2: 甲状腺球蛋白的色谱图

分析条件

色谱柱: A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 色谱柱尺寸: 7.8 mm I.D.×30 cm
 洗脱液: 200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH6.7) +0.05% NaN₃
 流速: 1.0 mL/min
 检测波长: UV 280 nm
 温度: 25°C
 进样量: 10 μL
 样品: 甲状腺球蛋白 (2.0 g/L)

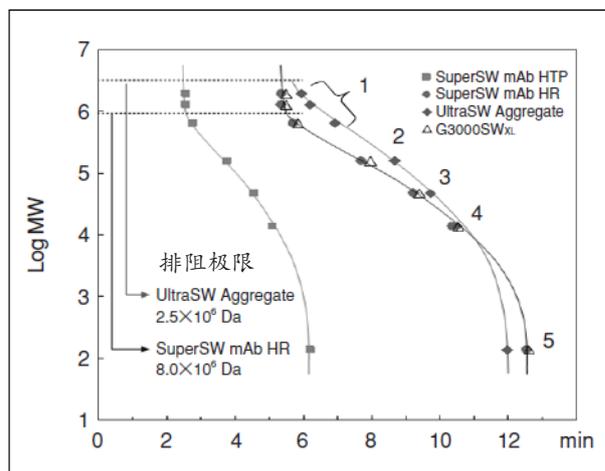


图 3: 标准曲线

分析条件

色谱柱: A. TSKgel UltraSW Aggregate
 B. TSKgel SuperSW mAb HR
 C. TSKgel G3000SW_{XL}
 D. TSKgel SuperSW mAb HTP
 色谱柱尺寸: 7.8 mm I.D.×30 cm (A, B, C)
 : 4.6 mm I.D.×15 cm (D)
 洗脱液: 200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃
 流速: 1.0 mL/min (A, B, C), 0.35 mL/min (D)
 检测波长: UV 280 nm
 温度: 25°C
 进样量: 10 μL (A, B, C), 5 μL (D)
 样品: 1. 甲状腺球蛋白三聚体、二聚体、单体 (单体MW 640,000)
 2. γ-球蛋白 (MW 155,000)
 3. 卵白蛋白 (MW 47,000)
 4. 核糖核酸酶A (MW 13,700)
 5. p-氨基苯甲酸 (MW 137)

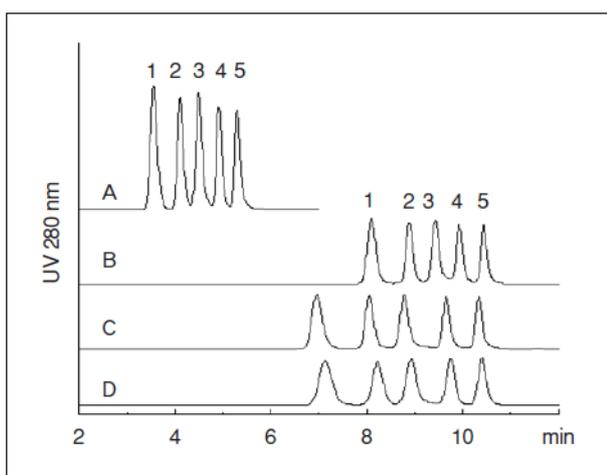


图 4: 市售的蛋白质分子量标记物的色谱图

分析条件

色谱柱: A. TSKgel SuperSW mAb HTP
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 C. TSKgel SuperSW mAb HR
 D. TSKgel G3000SW_{XL}
 色谱柱尺寸: 4.6 mm I.D.×15 cm (A)
 : 7.8 mm I.D.×30 cm (B, C, D)
 洗脱液: 200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃
 流速: 0.35 mL/min (A), 1.0 mL/min (B, C, D)
 检测波长: UV 280 nm
 温度: 25°C
 进样量: 5 μL (A), 10 μL (B, C, D)
 样品: 蛋白质分子量标记物
 (东方酵母工业株式会社)
 1. 谷氨酸脱氢酶 (MW 290,000)
 2. 乳酸脱氢酶 (MW 142,000)
 3. 烯醇酶 (MW 67,000)
 4. 肌激酶 (MW 32,000)
 5. 细胞色素c (MW 12,400)

表-3 各吸收峰的分​​离效果 (Rs) 对比

色谱柱	分离度 Rs				
	1~2	2~3	3~4	4~5	平均
A. TSKgel SuperSW mAb HTP	2.24	1.68	1.95	1.83	1.93
B. TSKgel UltraSW Aggregate	2.68	2.01	1.95	2.17	2.20
C. TSKgel SuperSW mAb HR	3.03	2.29	2.93	2.58	2.71
D. TSKgel G3000SW _{XL}	2.37	1.72	2.22	2.00	2.08

2-3. 洗脱液盐浓度的影响

SEC模式分离时,测定时必须抑制填料与测定物质之间的非特异性相互作用(离子化作用、疏水性作用与氢键作用)。以硅胶为基质的SW型填料中,由于会与填料表面残留的硅烷醇基发生离子型相互作用(离子排斥,离子交换),对洗脱液盐浓度的优化是非常重要的。

图5、图6所示为,采用50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 6.7),通过改变硫酸钠的浓度后,标准蛋白质的洗脱效果。等电点(pI)低于洗脱液pH的甲状腺球蛋白(pI 4.5)、 γ -球蛋白(pI 5.1)及卵白蛋白(pI 4.6)由于在洗脱液中会带有负电荷,因此在较低的盐浓度中,会由于与残留的硅烷醇基之间的离子排斥而快速洗脱。一般情况下,由于离子排斥效果在盐浓度较低的环境中会受到抑制,因此,

当洗脱液中硫酸钠浓度高于100 mmol/L时,洗脱时间即可保持恒定。

另外,等电点(pI)高于洗脱液pH的细胞色素c(pI 10.1)及溶菌酶(pI 11.2)在洗脱液中带有正电荷,由于与残留硅烷醇基的离子交换作用,在盐浓度较低的环境下会吸附于填料,因此吸收峰会呈现拖尾现象,且洗脱时间较慢。随着洗脱液中硫酸钠浓度的升高,洗脱时间加快,当浓度高于150 mmol/L以上时可显示良好的吸收峰形,洗脱时间基本保持恒定。但是,由于蛋白质的存在,盐浓度过度升高后,会产生疏水作用而导致洗脱时间减缓,必须根据缓冲液与盐的种类及浓度,选择最合适的条件。关于洗脱液组成的详细选择,请参考《分离报告No.18“TSKgel SW系列色谱柱在蛋白质分离中的应用”》。

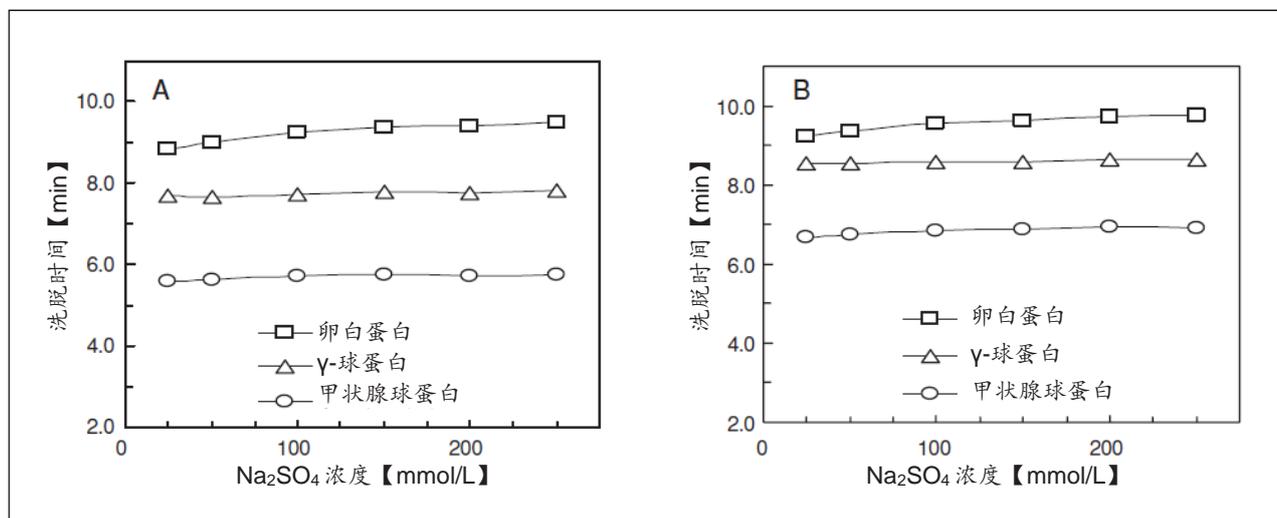


图 5: 盐浓度对洗脱时间的影响 (酸性蛋白质)

分析条件

色谱柱: A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 色谱柱尺寸: 7.8 mm I.D. x 30 cm
 洗脱液: 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) +
 X mmol/L Na₂SO₄ + 0.05% NaN₃
 流速: 1.0 mL/min

检测波长: UV 280 nm
 温度: 25°C
 进样量: 10 μ L
 样品: 甲状腺球蛋白 (1.5 g/L)
 γ -球蛋白 (1.5 g/L)
 卵白蛋白 (1.5 g/L)

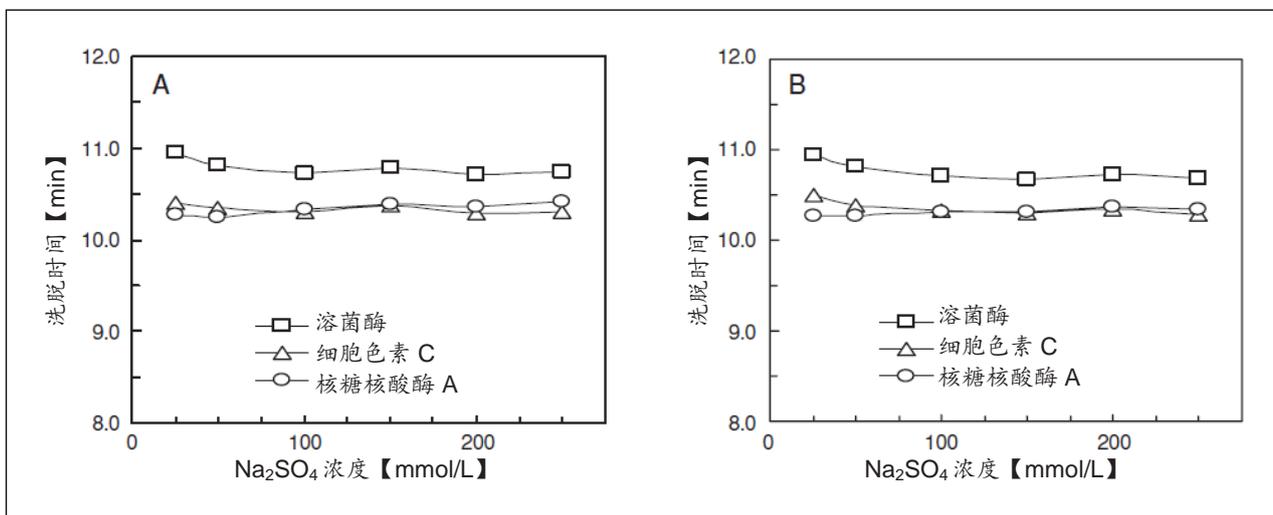


图 6: 盐浓度对洗脱时间的影响 (碱性蛋白质)

分析条件

色谱柱: A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 色谱柱尺寸: 7.8 mm I.D.x30 cm
 洗脱液: 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) +
 X mmol/L Na₂SO₄+0.05% NaN₃
 流速: 1.0 mL/min

检测波长: UV 280 nm
 温度: 25°C
 进样量: 10 μL
 样品: 核糖核酸酶A (1.5 g/L)
 细胞色素C (1.5 g/L)
 溶菌酶 (1.5 g/L)

2-4. 测定流速的影响

测定流速对理论塔板数的影响与填料的微粒直径及测定物质的分子量 (分子尺寸) 等因素相关。通过采用不同分子量的标准蛋白质及小分子物质, 对测定流速对理论塔板高度 (HETP) 的影响进行了研究。

图7所示为TSKgel SuperSW mAb HR及TSKgel UltraSW Aggregate上各蛋白质的van Deemter曲线。小分子物质如对-氨基苯甲酸在流速减缓后, 由于扩散而导致其HETP增大。但是, 分子量较大的蛋白质则随着流速减缓而呈现HETP减小, 色谱柱的柱效也随之提高。流速对HETP的影响是随分子量增大而变大。

同时, 在TSKgel UltraSW Aggregate上流速对HETP的影响较小的原因推测是, 与TSKgel SuperSW mAb HR相比, 填料的微粒直径较小。

图8所示为TSKgel SuperSW mAb HR及TSKgel SuperSW mAb HTP上IgG二聚体与单体的分离效果和流速的相关性。通过减缓测定时的流速, 可提高色谱柱的柱效, 因此, IgG二聚体与单体的分离效果也得以提升。

另外, 图9所示为TSKgel UltraSW Aggregate

上IgG多聚体分离与流速的相关性, 发现对于分子量 (分子尺寸) 较大的多聚体, 通过降低测定时的流速, 也可提高色谱柱的柱效, 从而提升分离效果。如图10所示, 通过将测定时的流速从1.0 mL/min降低至0.2 mL/min, 可实现IgG多聚体中五聚体的分离。但是, 降低测定流速后, 由于在管路等部位会发生扩散, 也有可能致色谱柱的柱效降低, 因此必须引起注意。

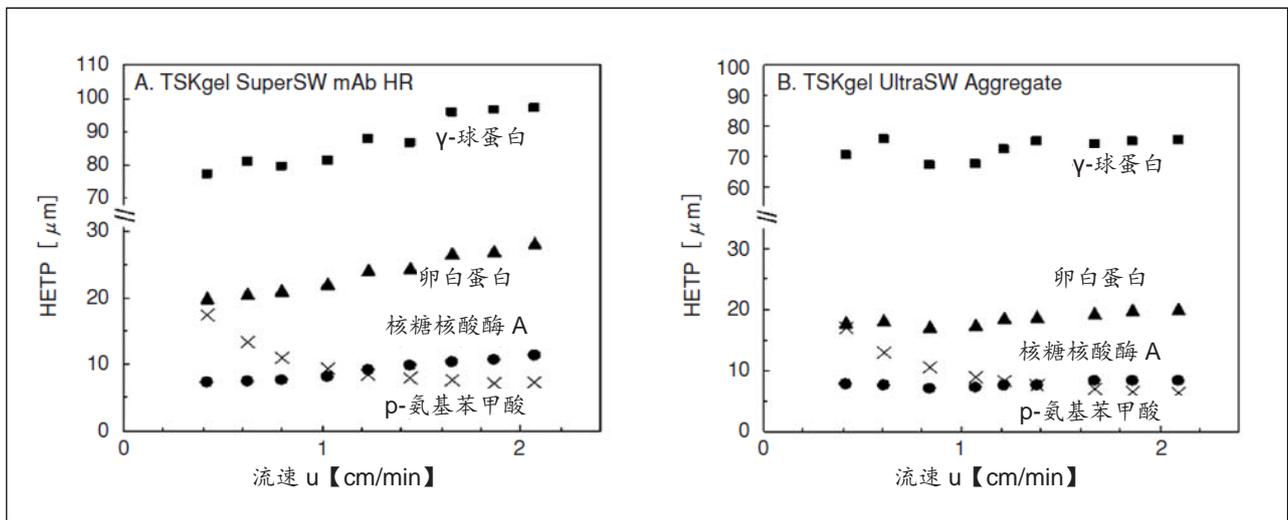


图 7：流速的影响（1）蛋白质的 van Deemter 曲线

分析条件

色谱柱：A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 色谱柱尺寸：7.8 mm I.D.x30 cm
 洗脱液：200 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃
 检测波长：UV 280 nm
 温度：25°C

进样量：10 μL
 样品：γ-球蛋白 (MW 155,000) (1.0 g/L)
 卵白蛋白 (MW 47,000) (1.0 g/L)
 核糖核酸酶A (MW 13,700) (1.5 g/L)
 p-氨基苯甲酸 (MW 137) (0.01 g/L)

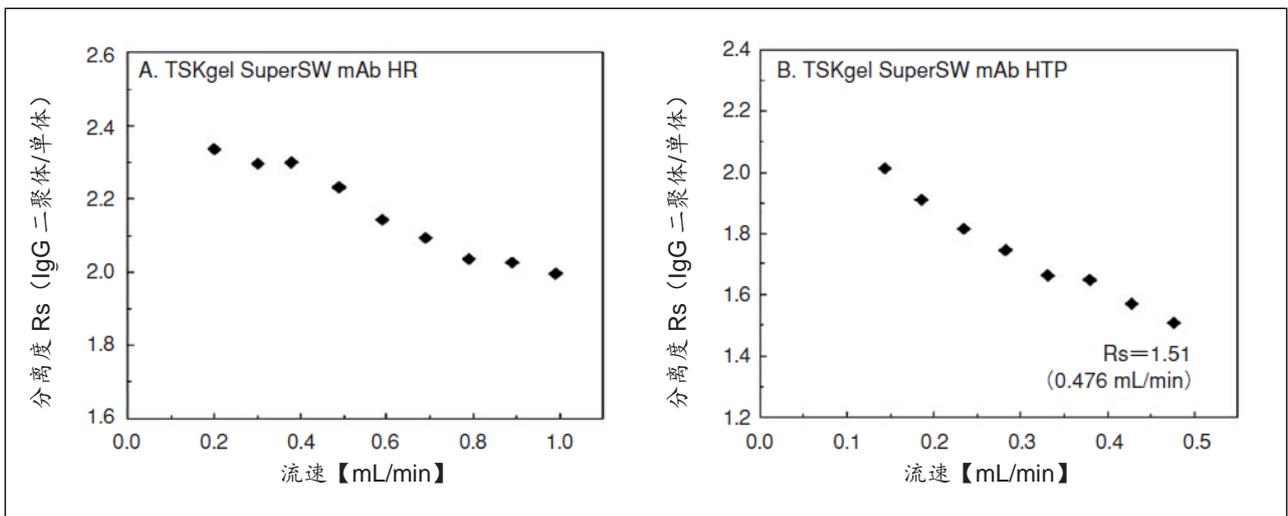


图 8：流速的影响（2）IgG 二聚体、单体的分离度 Rs 与流速的相关性

分析条件

色谱柱：A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel SuperSW mAb HTP
 色谱柱尺寸：7.8 mm I.D.x30 cm (A)
 : 4.6 mm I.D.x15 cm (B)
 洗脱液：200 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃

检测波长：UV 280nm
 温度：25°C
 进样量：10μL (A) , 5μL (B)
 样品：肌肉注射专用免疫球蛋白(IgG)制剂(1.5g/L)

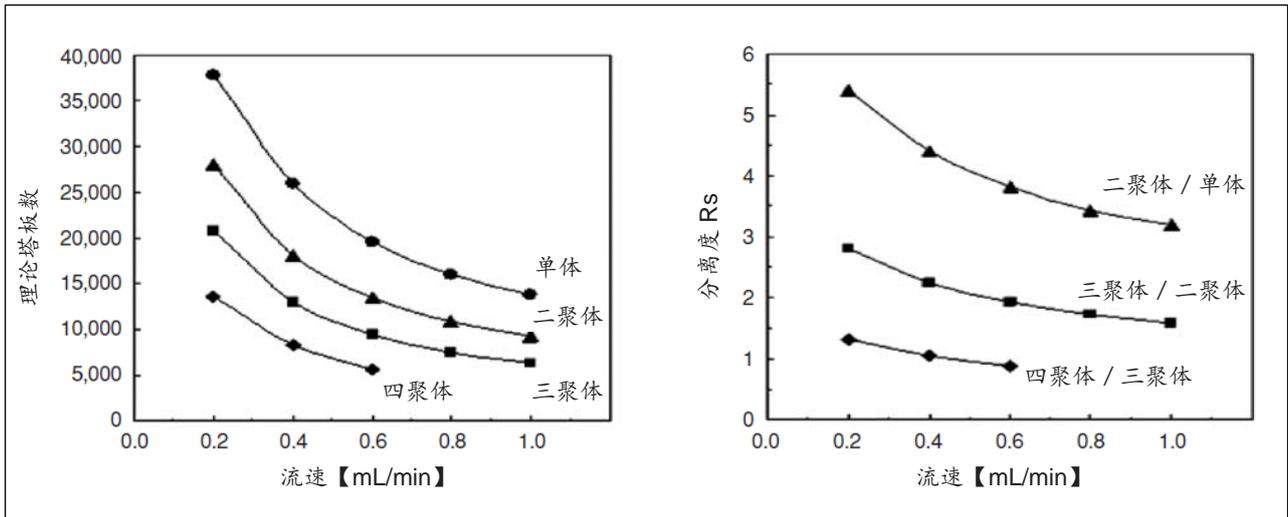


图 9：流速的影响 (3) IgG 多聚体的分离与流速的相关性

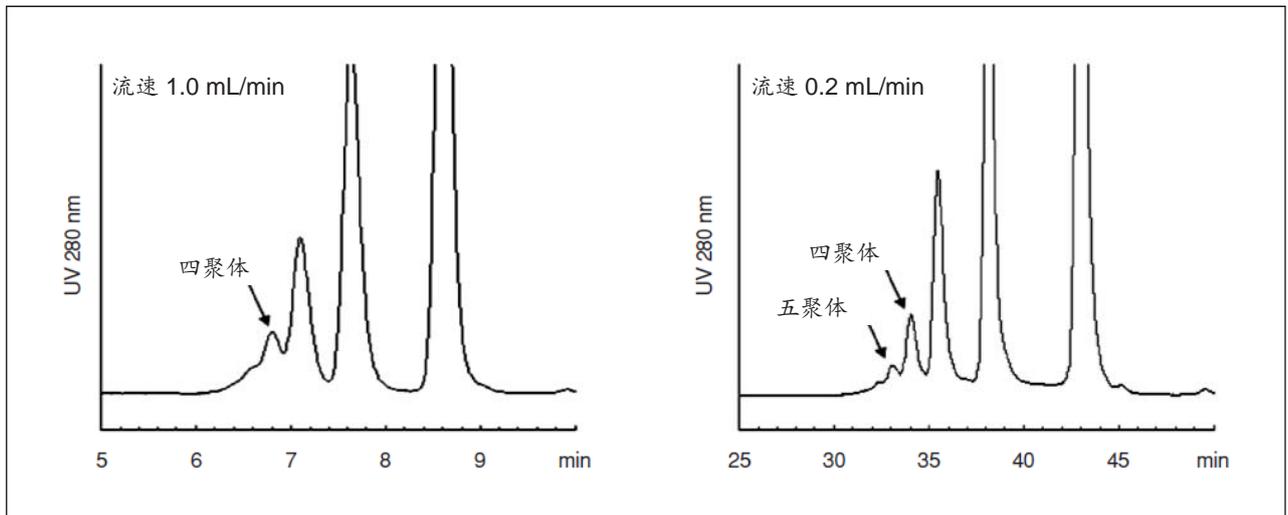


图 10：流速的影响 (4) IgG 凝聚物的分离与流速的相关性 (色谱图)

分析条件

色谱柱：TSKgel UltraSW Aggregate
 色谱柱尺寸：7.8 mm I.D.x30 cm
 洗脱液：200 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% Na₃
 流速：1.0, 0.2 mL/min

检测波长：UV 280 nm
 温度：25°C
 进样量：10 μL
 样品：单克隆抗体 (人) (5 g/L)

2-5. 与其它同类 SEC 色谱柱的对比

针对IgG二聚体与单体的分离，与市售的其它同类型SEC色谱柱进行了对比。图11所示为色谱图的对比结果。TSKgel SuperSW mAb HR在IgG二

聚体与单体的分离效果上显示了最佳的分离效果。同时，高通量的TSKgel SuperSW HTP只要其他公司5 μm SEC色谱柱1/2的测定时间即可获得同等的分离效果。

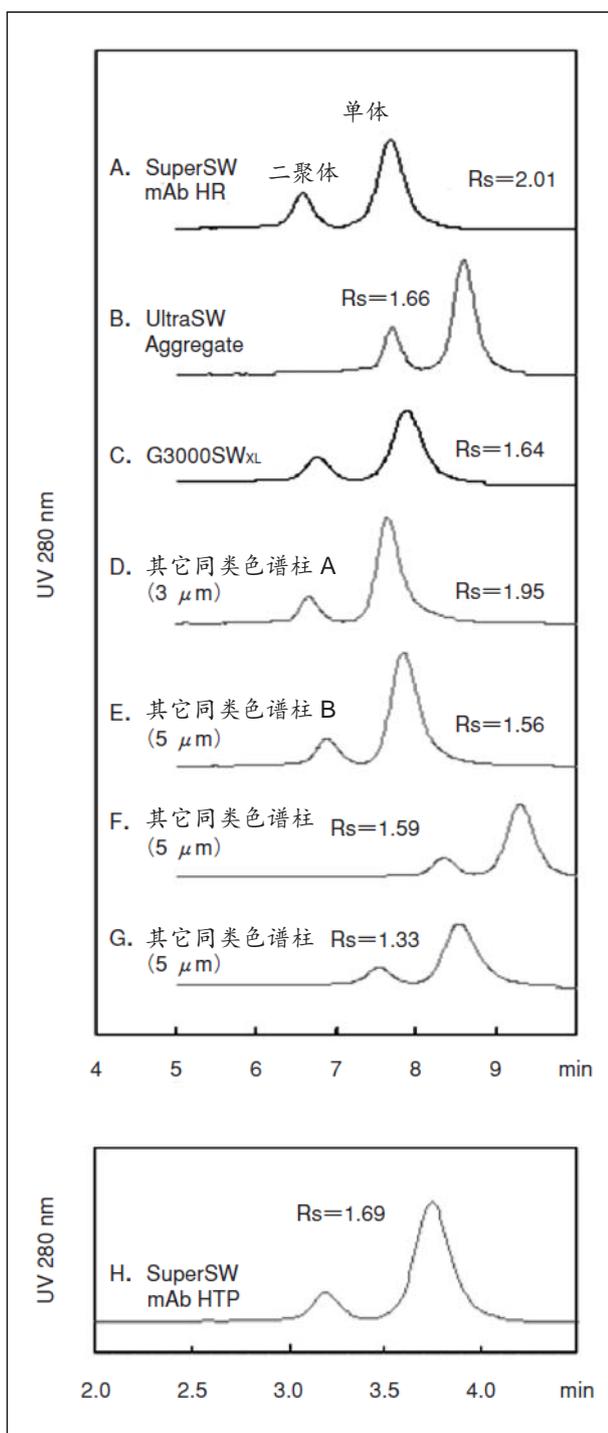


图 11: IgG 的色谱图对比

2-6. 耐用性

在TSKgel SuperSW mAb HR及TSKgel UltraSW Aggregate上用蛋白质以15分钟的间隔反复进样后, 针对使用寿命, 通过小分子化合物p-氨基苯甲酸的洗脱效果进行了确认。图12、图13所示为TSKgel SuperSW mAb HR与TSKgel UltraSW Aggregate上p-氨基苯甲酸的洗脱容量及理论塔板数的维持率。两种色谱柱均各取3根色谱柱确认了

分析条件

色谱柱: A. TSKgel SuperSW mAb HR
 B. TSKgel UltraSW Aggregate
 C. TSKgel G3000SW_{XL}
 D. 其它同类SEC色谱柱A (3 μm)
 E. 其它同类SEC色谱柱B (5 μm)
 F. 其它同类SEC色谱柱C (5 μm)
 G. 其它同类SEC色谱柱D (5 μm)
 H. TSKgel SuperSW mAb HTP

色谱柱尺寸: 7.8 mm I.D.×30 cm (A~E)
 : 8.0 mm I.D.×30 cm (F, G)
 : 4.6 mm I.D.×15 cm (H)

洗脱液: 200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃

流速: 1.0 mL/min (A~G), 0.35 mL/min (H)

检测波长: UV 280 nm

温度: 25°C

进样量: 10 μL (A~G), 3.5 μL (H)

样品: 肌肉注射专用免疫球蛋白 (IgG) 制剂
 (1.0 g/L; A~G, 4.5 g/L; H)

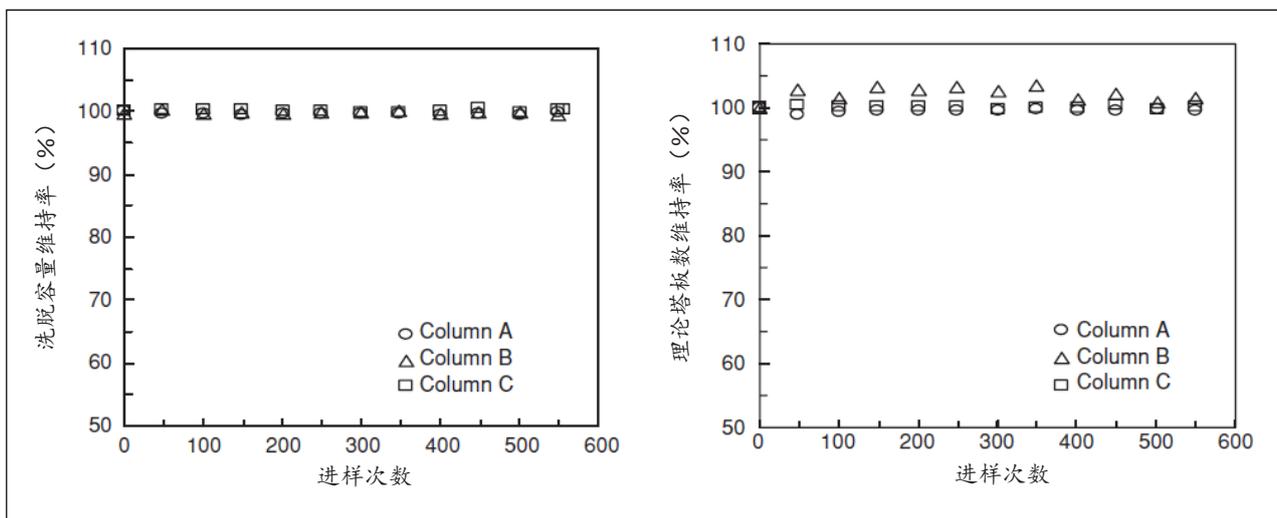


图 12: 进样次数及耐用性 (TSKgel SuperSW mAb HR)

分析条件

色谱柱: TSKgel SuperSW mAb HR
 色谱柱尺寸: 7.8 mm I.D. x 30 cm
 洗脱液: 200 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 0.05% NaN₃
 流速: 1.0 mL/min
 检测波长: UV 280 nm
 温度: 25°C
 进样量: 10 μL
 进样间隔: 15 min (试样①→②→③→④)

样品: ① 甲状腺球蛋白 (1.5 g/L), γ-球蛋白 (1.5 g/L), 卵白蛋白 (1.5 g/L), 核糖核酸酶 A (1.5 g/L), p-氨基苯甲酸 (10 mg/L)
 ② 甲状腺球蛋白 (1.5 g/L), β-乳球蛋白 (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)
 ③ γ-球蛋白 (1.5 g/L), 细胞色素 C (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)
 ④ 牛血清白蛋白 (1.5 g/L), 溶菌酶 (1.5 g/L), DNP-L-丙氨酸 (20 mg/L)

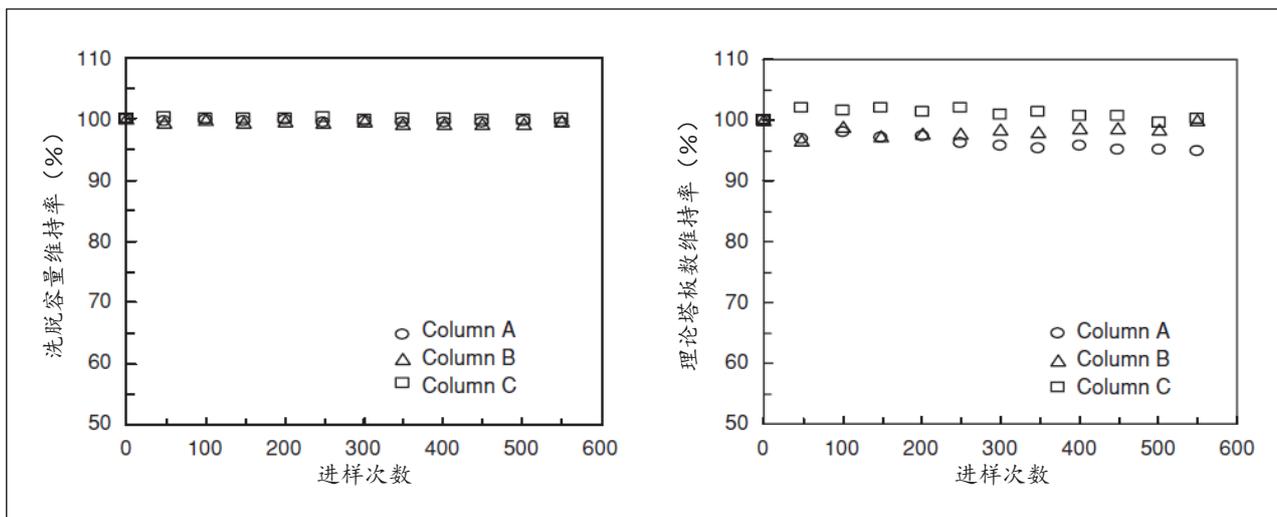


图 13: 进样次数及耐用性 (TSKgel UltraSW Aggregate)

分析条件

色谱柱: TSKgel UltraSW Aggregate
 色谱柱尺寸: 7.8 mm I.D. x 30 cm
 洗脱液: 200 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.7) + 0.05% NaN₃
 流速: 1.0 mL/min
 检测波长: UV 280 nm
 温度: 25°C
 进样量: 10 μL
 进样间隔: 15 min (试样①→②→③→④)

样品: ① 甲状腺球蛋白 (1.5g/L), γ-球蛋白 (1.5g/L), 卵白蛋白 (1.5g/L), 核糖核酸酶 A (1.5g/L), p-氨基苯甲酸 (10mg/L)
 ② 甲状腺球蛋白 (1.5g/L), β-乳球蛋白 (1.5g/L), DNP-L-丙氨酸 (20mg/L)
 ③ γ-球蛋白 (1.5g/L), 细胞色素 C (1.5g/L), DNP-L-丙氨酸 (20mg/L)
 ④ 牛血清白蛋白 (1.5g/L), 溶菌酶 (1.5g/L), DNP-L-丙氨酸 (20mg/L)

3. 分离示例

3-1. 经木瓜蛋白酶分解后的 IgG 的分离

通过SEC对IgG经木瓜蛋白酶分解的过程进行观察。采用TSKgel SuperSW mAb HTP、TSKgel SuperSW mAb HR、TSKgel UltraSW Aggregate及TSKgelG3000SWXL实施测定后的色谱图如图14所示。其洗脱的分解产物为F(ab')₂、Fab及Fc，但本样品中Fab与Fc的吸收峰位置重叠。各色谱柱

均显示IgG的二聚体及单体随分解时间的增加而减小。另一方面，分解物的吸收峰则随时间逐渐增大。如表-4所示，在对分解产物进行分离时，TSKgel SuperSW mAb HR可获得最好的分离效果，在TSKgel SuperSW mAb HTP上，通过1/2的测定时间即可获得与现有TSKgel G3000SW_{XL}同等的分离效果。

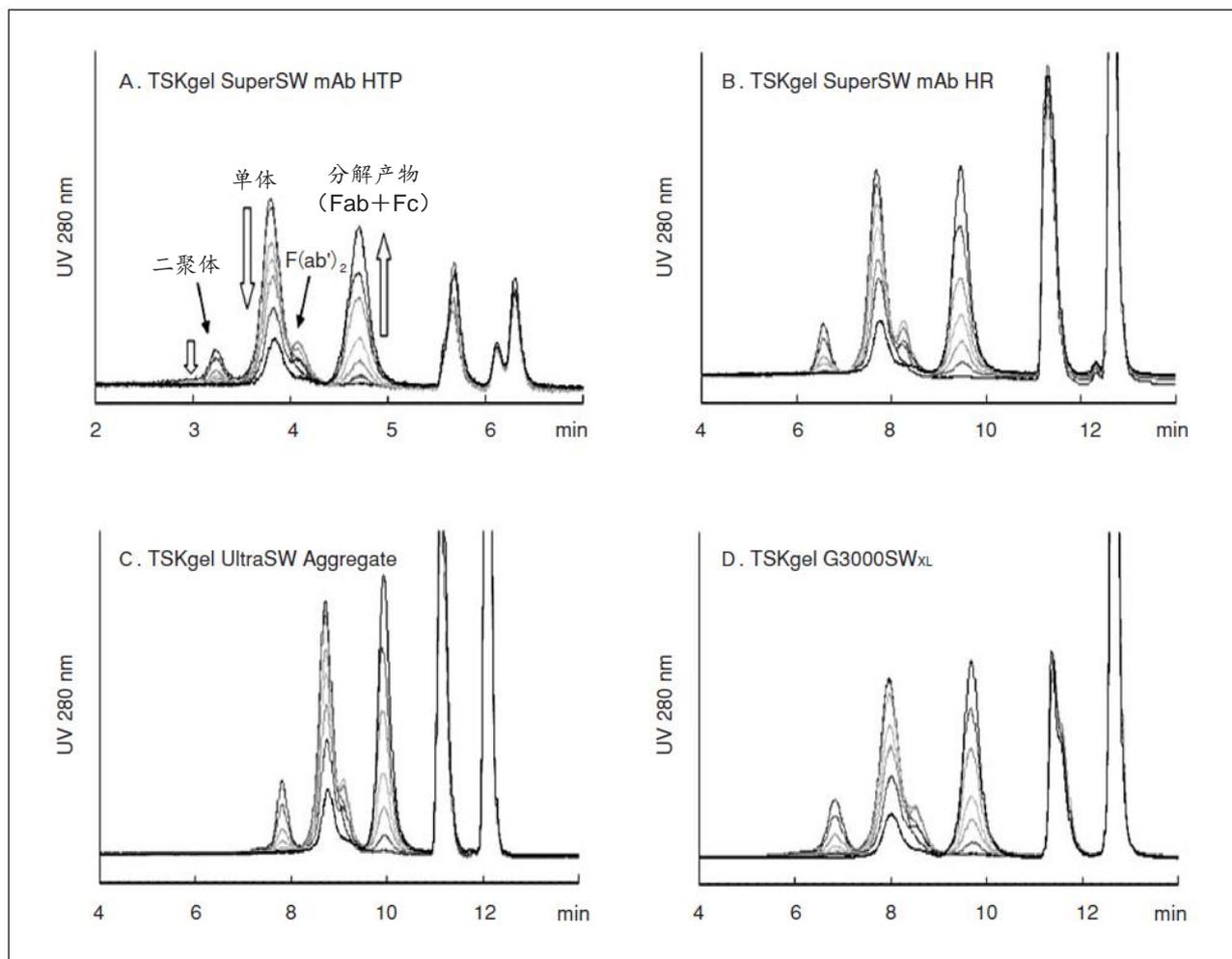


图 14: 木瓜蛋白酶分解 IgG 的分离

表-4 木瓜蛋白酶分解 IgG 的分离

色谱柱	未分解 IgG				木瓜蛋白酶分解 IgG (分解时间 1,440 min)	
	洗脱时间 【min】 (单体)	理论塔板 数 (二聚 体)	理论塔板 数 (单体)	分离度 Rs (二聚体/ 单体)	理论塔板 数 (分解 物)	分离度 Rs (单体/ 分解物)
A. TSKgel SuperSW mAb HTP (4.6 mm I.D.×15 cm)	3.798	2,005	1,909	1.78	2,489	2.46
B. TSKgel SuperSW mAb HR (7.8 mm I.D.×30 cm)	7.683	2,895	2,320	2.02	3,826	2.87
C. TSKgel UltraSW Aggregate (7.8 mm I.D.×30 cm)	8.710	5,563	4,279	1.90	7,807	2.49
D. TSKgel G3000SW _{XL} (7.8 mm I.D.×30 cm)	7.963	1,912	1,781	1.63	3,883	2.50

分析条件

色谱柱: A. TSKgel SuperSW mAb HTP
 B. TSKgel SuperSW mAb HR
 C. TSKgel UltraSW Aggregate
 D. TSKgel G3000SW_{XL}

色谱柱尺寸: 4.6mm I.D.×15cm (A)
 : 7.8mm I.D.×30cm (B, C, D)

洗脱液: 200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃

流速: 0.35 mL/min (A), 1.0 mL/min (B, C, D)

检测波长: UV 280 nm

温度: 25°C

进样量: 5 μL (A), 10 μL (B, C, D)

样品: 木瓜蛋白酶分解IgG (10 g/L)
 (分解时间 0, 5, 15, 30, 60, 120, 1440min)

3-2. 抗体类药物的快速分析

使用TSKgel SuperSW mAb HTP对单克隆抗体类药物进行了快速分析。如图15所示, 通过用最大流速0.5 mL/min进行测定, IgG的单体可在3.5分钟的短时间内完成测定。同时, 测定的流速较快时, 与常用流速0.35 mL/min相比, IgG二聚体与单体的分离效果将会降低, 但对应分析要求, 可达到充分的分离效果。

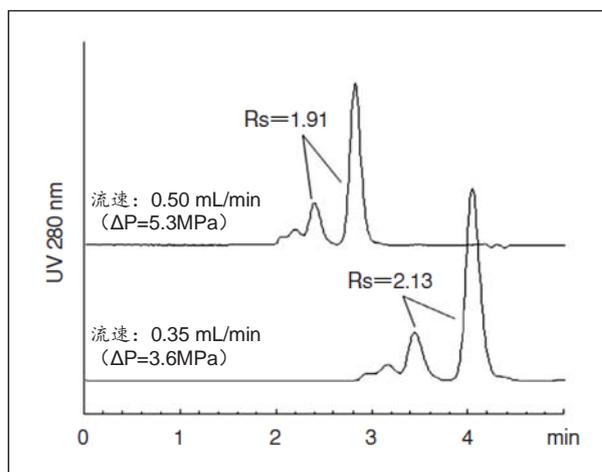


图 15: 抗体类药物的快速分析

分析条件

色谱柱: TSKgel SuperSW mAb HTP

色谱柱尺寸: 4.6 mm I.D.×15 cm

洗脱液: 200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃

流速: 0.50, 0.35 mL/min

检测波长: UV 280 nm

温度: 25°C

进样量: 5 μL

样品: 单克隆抗体类药物 (鼠-人重组型) (10 g/L)

3-3. 抗体类药物的精确分析

使用TSKgel G3000SW_{XL}、TSKgel SuperSW mAb HR及TSKgel UltraSW Aggregate对单克隆抗体类药物进行了精确分析。色谱图的结果对比如图16所示。在使用TSKgel G3000SW_{XL}获得的色谱图(A)中,分别可观察到单体、二聚体、三聚体的吸收峰, V_0 为洗脱的部分多聚体。同时,单体吸收峰的尾部可见少量洗脱的分解产物形成肩峰。在TSKgel SuperSW mAb HR的色谱图(B)中, V_0 为洗脱的部分多聚体,与TSKgel G3000 SW_{XL}相同,但单体、二聚体、三聚体的分离效果提高,如单体吸收峰的放大图所示,可观察到分解产物的吸收峰。在TSKgel UltraSW Aggregate的色谱图(C)中,还可测定四聚体以上的多聚体。由此,可根据测定对象的分子量,选择不同的色谱柱可对多聚体与二聚体、单体及分解产物进行精确分析。

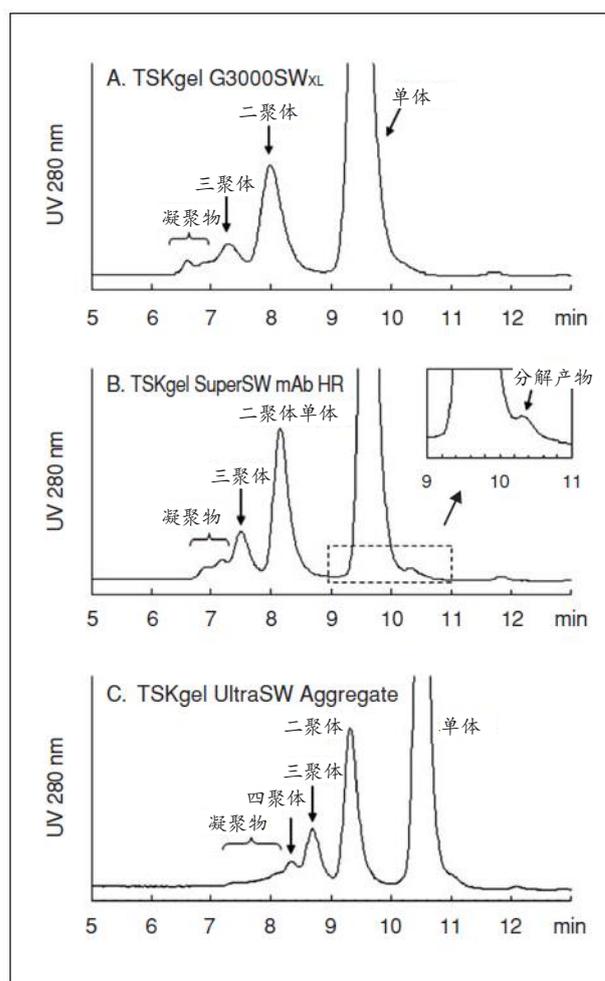


图 16: 抗体类药物的精确分析

分析条件

色谱柱: A. TSKgel G3000SW_{XL}

B. TSKgel SuperSW mAb HR

C. TSKgel UltraSW Aggregate

色谱柱尺寸: 7.8 mm I.D.x30 cm

洗脱液: 200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05% NaN₃

流速: 0.8 mL/min

检测波长: UV 280 nm

温度: 25°C

进样量: 10 μ L

样品: 单克隆抗体类药物 (鼠-人重组型) (10 g/L)

3-4. 抗体热处理后所生成多聚体的分析

使用TSKgel SuperSW mAb HR及TSKgel UltraSW Aggregate，对单克隆抗体实施热变性后生成的多聚体进行了测定。获得的色谱图如图17所示。在TSKgel SuperSW mAb HR上，通过热变性生成的多聚体洗脱于 V_0 中，无法获取生成的凝聚物

分子量（分子尺寸）的相关信息。但是，在孔径较大的TSKgel UltraSW Aggregate上，生成的多聚体充分的渗入小孔内，通过尺寸排除而洗脱出来。如TSKgel UltraSW Aggregate的色谱图所示，可见随着热处理时间的增加，分子量（分子尺寸）较大的多聚体也会增加。

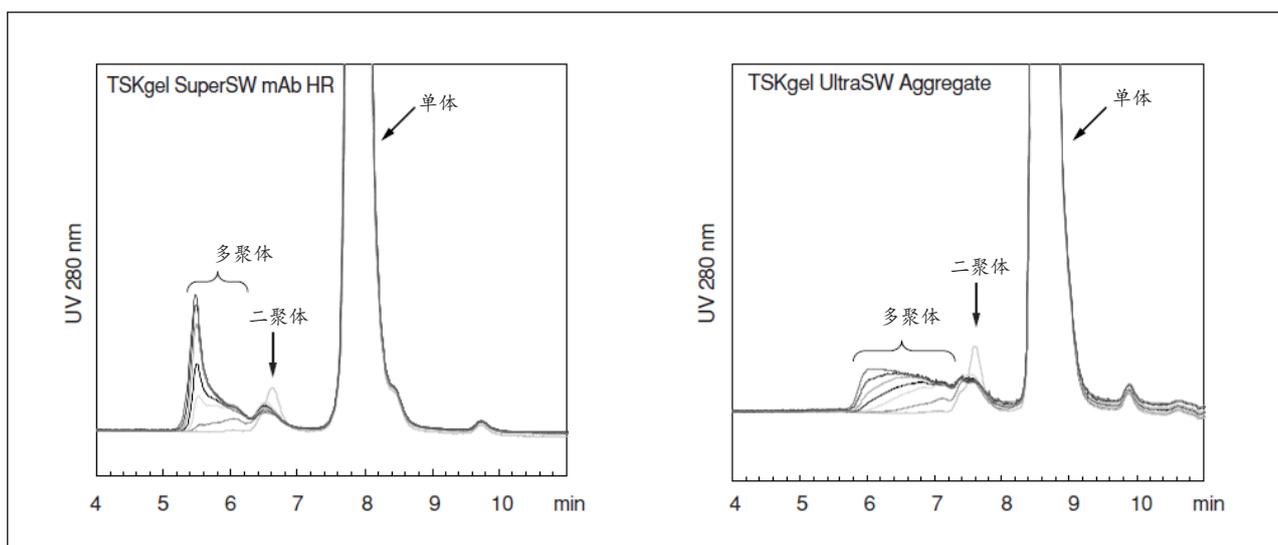


图 17：抗体热处理所生成多聚体的分析

分析条件

色谱柱：TSKgel SuperSW mAb HR
TSKgel UltraSW Aggregate
色谱柱尺寸：7.8 mm I.D.×30 cm
洗脱液：200 mmol/L磷酸缓冲液 (pH 6.7) +0.05%
NaN₃
流速：1.0 mL/min
检测波长：UV 280 nm

温度：25°C
进样量：10 μL
样品：单克隆抗体（人）（2.5 g/L），
60°C，5~90 min 加热处理

4. 总结

综上所述，对TSKgel SuperSW mAb HR、TSKgel Super SW mAb HTP及TSKgel UltraSW Aggregate进行了简要的说明。通过使用上述色谱

柱，不仅是抗体的二聚体与单体，还可对抗体类药物生产工艺及保存过程中产生的多聚体与分解产物等杂质进行精确分析与高通量分析。



TOSOH

TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区宜山路 1289 号 B 座 3F, 301 室
电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858
电子邮件：info@tosoh.com.cn
网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com