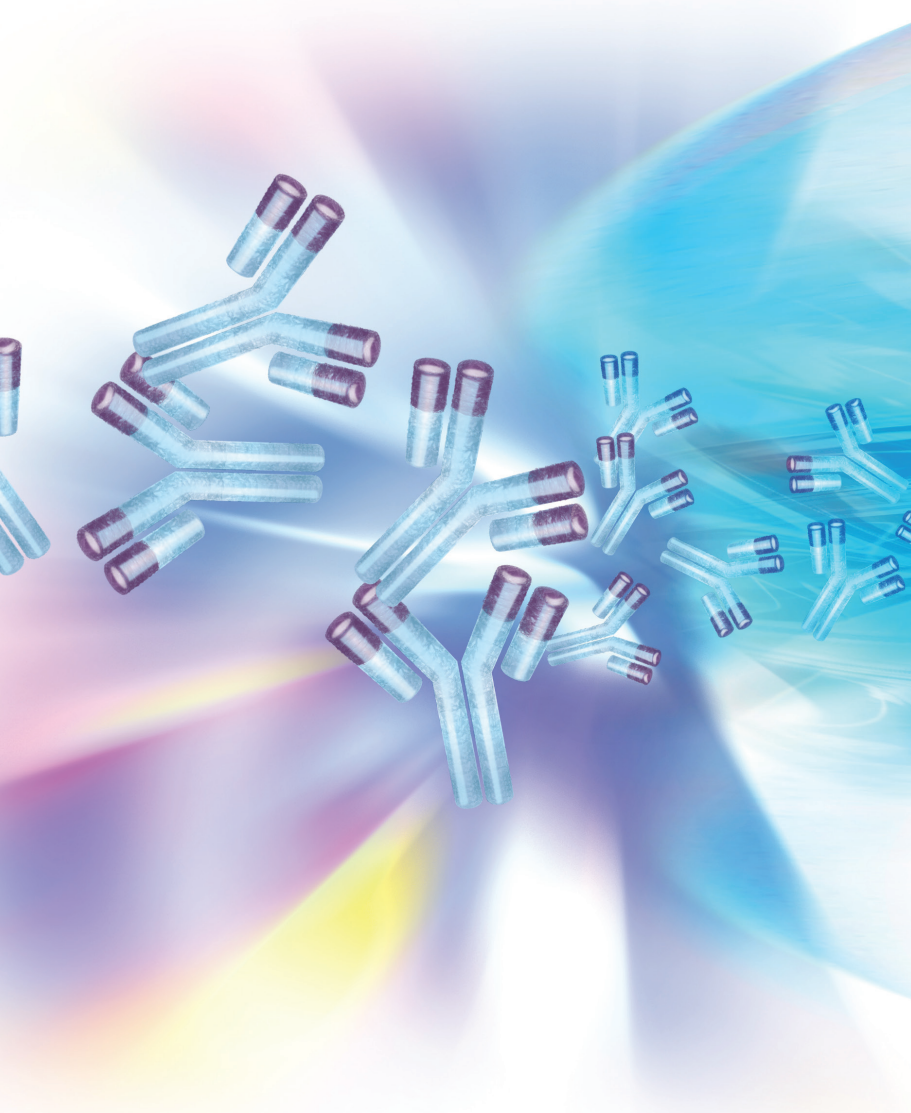




Thermo Scientific
BioLC 色谱柱



单克隆抗体 分析表征

旨在提高生产率和生产量
的创新技术及工作流程



目录

单克隆抗体表征	2
单克隆抗体表征的典型流程	4
单克隆抗体滴度测定	5
采用离子交换色谱法进行的电荷变体分析	6
用于聚合物筛分的尺寸排阻色谱法	11
单克隆抗体分析中采用的疏水作用色谱法	12
完整抗体或碎片的分析	14
用于单克隆抗体变体表征的聚糖分析	16
使用超高效液相色谱 (UHPLC) 进行生物分子表征	18
单克隆抗体分离及表征的LC-MS工作流程	20
订购信息	22

单克隆抗体表征

蛋白质和单克隆抗体 (mAb) 生物药品是日益发展的生物制药市场的主要组成部分，过去十年它使生物技术和生物制药行业发生了重大转变。单克隆抗体治疗是一种最有效的疾病诊断和治疗方法，其涉及疾病范围较广，包括自体免疫性疾病、心血管疾病、传染性疾病、癌症及各类炎症。

蛋白质和单克隆抗体 (mAb) 治疗的研发渠道非常广泛，这进一步强调了对创新性和高效分析工具的需求。在此类药品的研制和生产过程中，对杂质以及结构变体和结构改性进行检测、表征和定量，并对产品稳定性进行监控是必不可少的。这正是展示产品安全及功效的关键所在，也是美国食品和药物管理局 (FDA)、欧洲药品评价局 (EMA)、(中国) 国家食品药品监督管理局 (CFDA) 等机构所提出的要求。

单克隆抗体表征要求

蛋白质特性	表征所需技术	推荐的色谱柱	放行测试所需技术	推荐的色谱柱	表征的进一步要求	推荐的色谱柱
尺寸	SEC MS (完整蛋白质谱分析)	MABPac SEC-1	SEC	MABPac SEC-1	杂质； 片段/聚合物	MABPac SEC-1
电荷	IEC pH-IEC	MABPac SCX-10 MABPac SCX-10 RS pH 梯度缓冲液	IEC pH-IEC	MABPac SCX-10 MABPac SCX-10 RS pH Gradient Buffers	酰化作用、脱酰胺基作用，唾液酸化变体	MABPac SCX-10 MABPac SCX-10 RS
疏水性	HIC	MABPac HIC-10 ProPac HIC-10			ADC 分析 脱酰胺基作用 氧化作用	MABPac HIC-10 ProPac HIC-10
结构表征 (2°和3°结构)	反相	ProSwift RP-2H ProSwift RP-4H			二硫化物图谱 ProPac HIC-10	ProSwift RP-2H ProSwift RP-4H
鉴定 (肽图)	反相	Accucore 150-C18 PepMap 100 C18	反相	Accucore 150-C18 PepMap 100 C18		
聚糖分析	荧光标记： 混合模式AX-HILIC 混合模式AX-反相 HILIC 原生聚糖： 混合模式AX-HILIC 混合模式AX-反相	GlycanPac AXH-1 GlycanPac AXR-1 Accucore Amide-HILIC GlycanPac AXH-1 GlycanPac AXR-1	混合模式 AX-HILIC 混合模式 AX-反相 HILIC	GlycanPac AXH-1 GlycanPac AXR-1 Accucore Amide-HILIC	异质性	GlycanPac AXH-1 GlycanPac AXR-1

物理化学特性

N-末端异质性

- 焦谷氨酸成盐

氨基酸修饰

- 脱酰胺基作用、氧化作用、糖基化反应、异构化反应

裂解

- 铰链区内的分裂

低聚糖

- 岩藻糖基化、半乳糖基化、唾液酸化作用

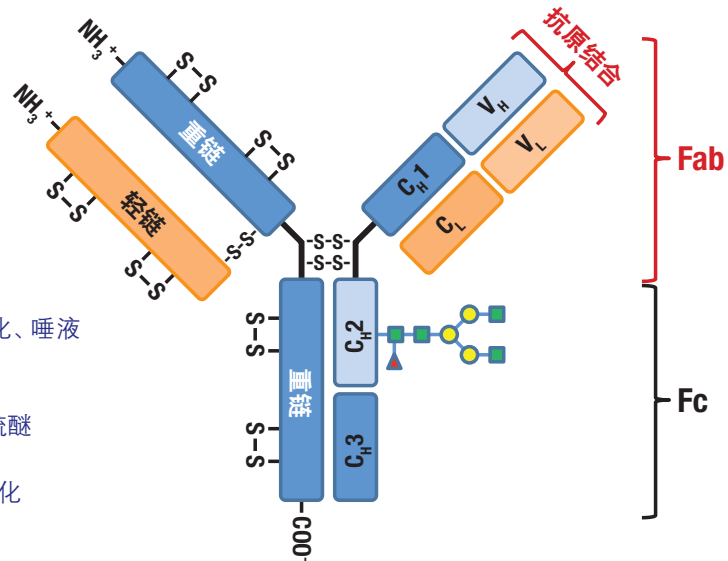
二硫键

- 自由硫醇、二硫键改组、硫醚

C-末端异质性

- 赖氨酸加和、脯氨酸酰胺化

生物学特性

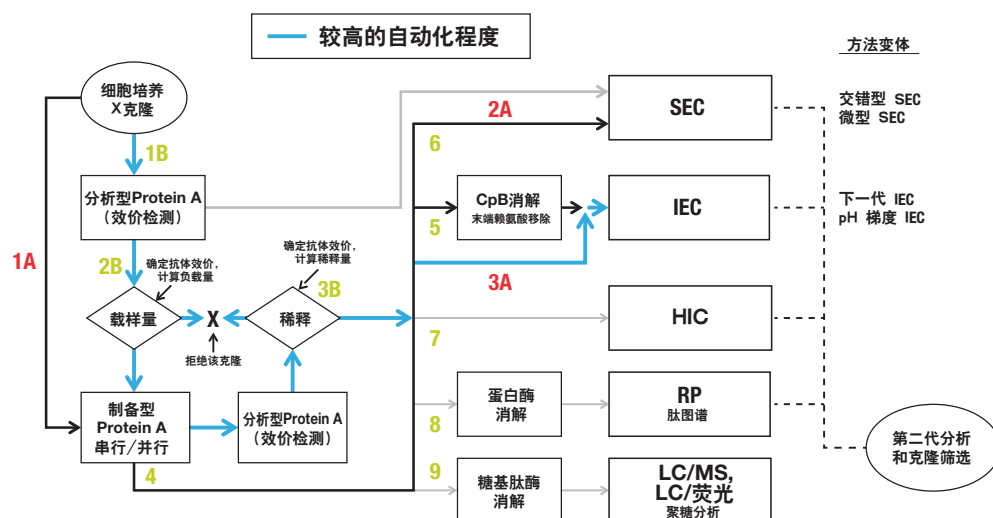


单克隆抗体通常表现出复杂的微观不均一性。由于存在这种翻译后修饰 (PTM) 的可能性，针对单克隆抗体的质量控制和稳定性评估将会成为非常具有挑战性的任务。

液相色谱法已经成为用于单克隆抗体生物治疗药物表征的一个必备工具。



单克隆抗体表征的典型流程



通常情况下，第一步(1A)是利用protein A对收获细胞培养液(HCCF)中的mAb或IgG进行提纯，然后(2A)利用SEC进行聚合物分析，最后(3A)利用IEC进行电荷变体分析。出于这一原因，上述分离模式构成了单克隆抗体研发分析的主要部分。

上述工作流程通常包含以下变化：

- 利用分析型protein A进行最初IgG效价检测(1B)，进行上样量计算(2B)，随后进行稀释(3B)并进入制备protein A阶段(4)。
- 一种可选的羧肽酶B (CpB)消解，用于IEC分离之前的末端赖氨酸移除(5)。
- 预收集工具，用于通过交错型SEC (6)或HIC (7)进行进一步PTM分析。
- 纯化后的IgG 消解后用于肽图分析，用于更加详细的表征和质谱分析(8)。
- 纯化IgG用糖基肽酶(或其它类型的糖苷酶)处理，用于聚糖分析(9)。

用户可将这些分离技术结合起来，以完成更广泛的分析任务，如：

- 纯度和效价检测
- 聚合物分析
- 电荷变体分析
- 发酵监测
- 剪断和截断
- 轻链/重链分析
- 肽图谱
- 聚糖分析
- 翻译后修饰分析(氨基酸置换/截断、脱酰氨基作用、磷酸化作用等)

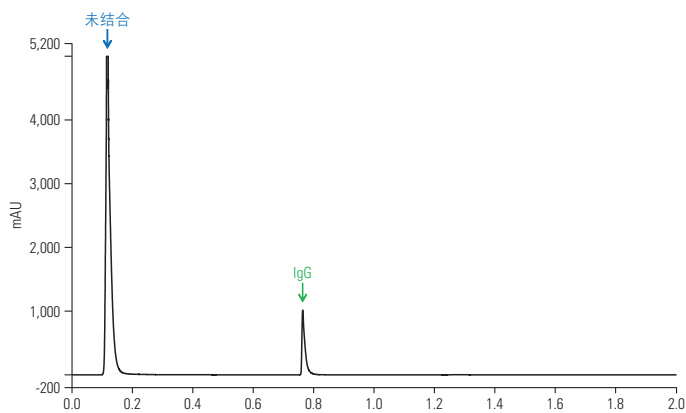
完成上述每一项分析任务均须认真选择色谱法以达到最优结果。我们可支持生物制药行业的科研人员通过使用可产生优异、可靠结果的整体解决方案以达到上述目标。

单克隆抗体滴度测定



在重组单克隆抗体研发的早期阶段，必须对大量收获细胞培养(HCC)样本进行IgG滴度筛选。使用protein A的亲和色谱法，其所提供的高水平特异性可以替换ELISA等免疫亲和性方法。

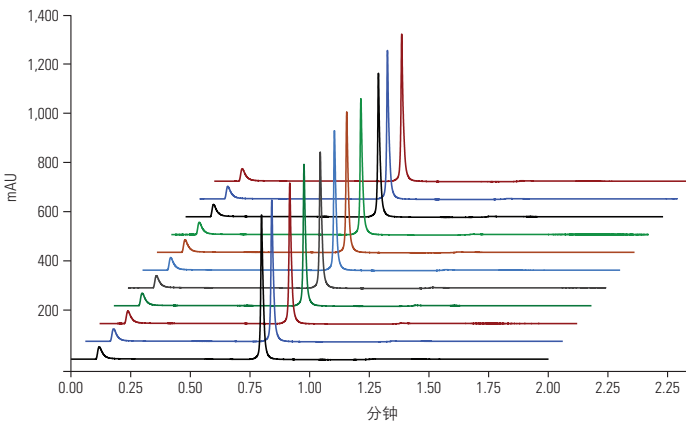
由于具有强大的亲和能力，protein A经常被用于结合大量抗体。通过将protein A连接到某种色谱介质上，可形成一个用于确定HCC中mAb浓度的亲和色谱柱。



色谱柱:	MABPac Protein A, 12 μ m 4.0 $\times$ 35 mm
流动相 A:	50 mM 磷酸钠 150 mM 氯化钠, 5% 乙腈, pH 7.5
流动相 B:	50 mM 磷酸钠, 150 mM 氯化钠, 5% 乙腈, pH 2.5
梯度:	0.2分钟0% B, 0.60分钟100% B, 1.20分钟0% B
流速:	2 mL/min
进样量:	10 μ L
温度:	25 $^{\circ}$ C
检测波长:	280 nm
样本:	收获培养细胞 (HCC)

制药行业分析实验室面临的挑战是如何制定一种高通量、功能强大的效价测定方法。最近研制的新型色谱柱专用于这种应用场合，Thermo Scientific™ MABPac™protein A从一种带有亲水表面的新型聚合树脂研制而成，其上覆盖着一层共价结合重组protein A。

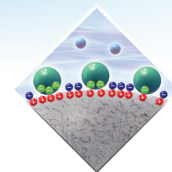
其基质的亲水性最大限度地降低了非特异性结合的可能性，因此能够实现对单克隆抗体浓度的精确定量。MABPacprotein A色谱柱可以与生物兼容系统结合用于样品加载、结合、洗脱和聚集的快速自动化。



色谱柱:	MABPac Protein A, 12 μ m 4.0 $\times$ 35 mm
流动相 A:	50 mM 磷酸钠, 150 mM 氯化钠, 5% 乙腈, pH 7.5
流动相 B:	50 mM 磷酸钠, 150 mM 氯化钠, 5% 乙腈, pH 2.5
梯度:	0.2分钟0% B, 0.60分钟100% B, 1.20分钟0% B
流速:	2 mL/min
进样量:	20 μ L
温度:	25 $^{\circ}$ C
检测波长:	280 nm
样本:	兔 IgG, 1 mg/mL

	t_R (min)	区域 (mAU*min)	PWHH (min)
平均值	0.80	7.76	0.01
% RSD	1.02	2.20	0.00

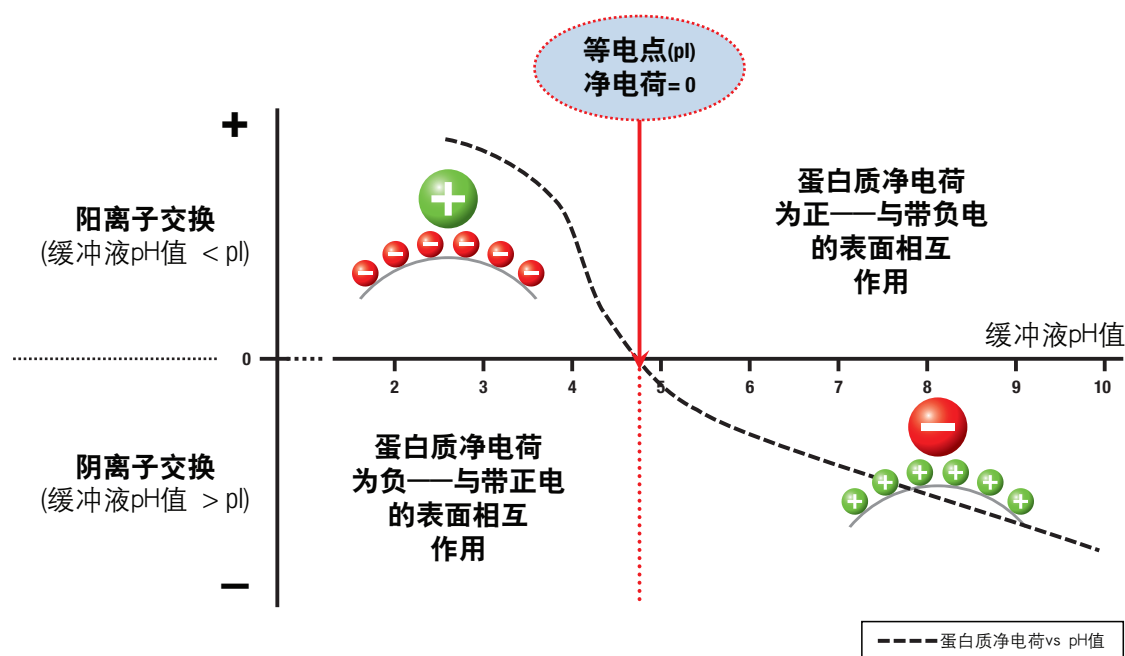
采用离子交换色谱法进行的电荷变体分析



离子交换色谱法(IEC)的固定相,其表面上具有一种带电配合基,这种配合基能够与带有相反电荷的分析物相互作用。这种技术分为阴离子交换色谱法与阳离子交换色谱法。阴离子交换方法中,带正电的表面配合基与带负电的分析物相互作用;而阳离子交换方法中,带负电的表面配合基与带正电的分析物相互作用。采用IEC色谱法,可通过盐梯度或pH梯度实现对单克隆抗体电荷变体的洗脱。

采用基于盐梯度的IEC色谱法时,缓冲液的pH值是固定不变的。起始缓冲液应选择恰当的pH值,其离子强度也应保持在较低的水平上,因为IEC对蛋白的结合力会随着离子强度的提高而降低。随后,通过提高缓冲液的离子强度(盐浓度)加强IEC树脂上各带电基团的缓冲离子与蛋白质之间的竞争程度。结果,IEC树脂与蛋白质间的相互作用减弱,从而导致蛋白质洗脱。

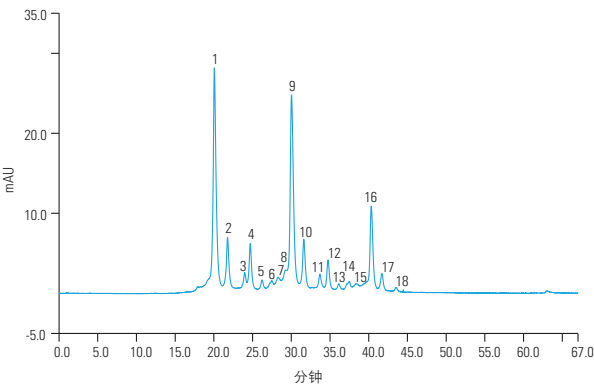
采用基于pH梯度的IEC色谱法时,起始缓冲液的pH值保持在一个恒定水平上,以确保蛋白质获得与固定相相反的电荷,并与之结合。通过改变缓冲液的pH值对蛋白质进行洗脱,从而使蛋白质向等电点状态转变(最终与树脂等电荷),并从色谱柱洗脱。



单克隆抗体要经历多个翻译后修饰过程，包括氧化作用、脱酰胺基作用、糖基化反应、不完全C-末端处理等。这些修饰过程会导致克隆过程中的抗体发生变异，其反过来影响单克隆抗体作为一种生物治疗剂的活性和稳定性。对单克隆抗体治疗剂稳定性进行监控，在证明抗体作为一种药物的安全性和功效方面发挥着至关重要的作用。

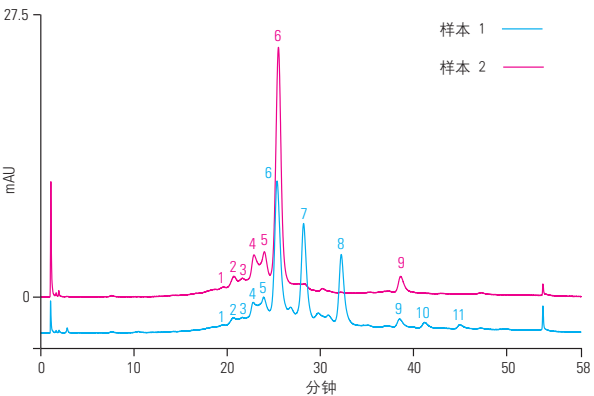
大多数抗体的pI均处于6-10的pH值区间，这正是阳离子交换通常选择适合于单克隆抗体带电变体的分离模式的原因所在。

可以使用一系列阳离子交换MABPac色谱柱专门用于分离单克隆抗体变异体以及其它受电荷影响的变体。



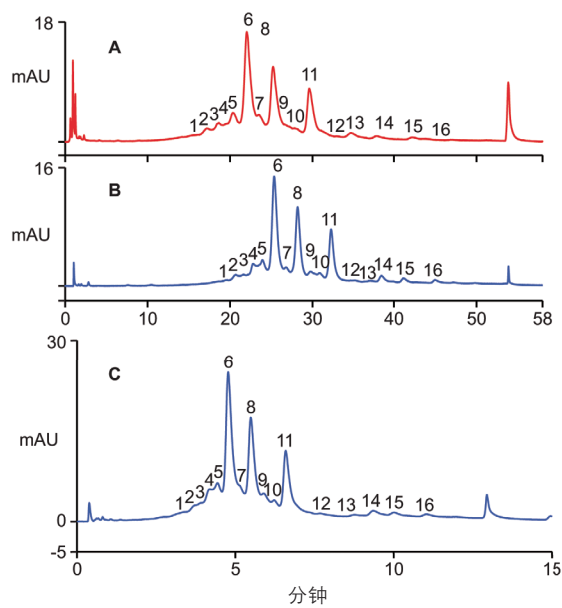
色谱柱:	MABPac SCX-10 , 10 μ m 4.0 $\times$ 250 mm
流动相 A:	20 mM MES (pH 5.6) + 60 mM 氯化钠
流动相 B:	20 mM MES (pH 5.6) + 300 mM 氯化钠
梯度:	60分钟内5–55%
流速:	1 mL/min
进样量:	10 μ L
温度:	30 $^{\circ}$ C
检测波长:	280 nm

针对单克隆抗体异质性最重要也最常见的分析方法是对酸性和碱性变体进行监控和测定。Thermo Scientific™ MabPac™ SCX-10色谱柱分离经羧肽酶B孵育后的赖氨酸缺失变异体。



色谱柱:	MABPac SCX-10 , 10 μ m 4.0 $\times$ 250 mm
流动相 A:	20 mM MES (pH 5.6) + 60 mM 氯化钠
流动相 B:	20 mM MES (pH 5.6) + 300 mM 氯化钠
梯度:	50分钟内15–36%
流速:	1 mL/min
进样量:	5 μ L
温度:	30 $^{\circ}$ C
检测波长:	280 nm
样本:	1. mAb B, 100 μ L中900 μ g (无羧肽酶) 2. mAb B, 100 μ L中900 μ g+ 50 μ g羧肽酶, 在37 $^{\circ}$ C 下培养3小时
两个色谱图:	峰 1–5: 酸性变体
样本 1:	峰 6–8: C-末端 赖氨酸丢失变体 峰 9–11: C-末端 赖氨酸丢失变体
样本 2:	CBP处理后从峰6、7、8中 得到峰6 CBP处理后从峰9、10、11中 得到峰9

MAbPac SCX有更小颗粒提供，大大加快分析速度。

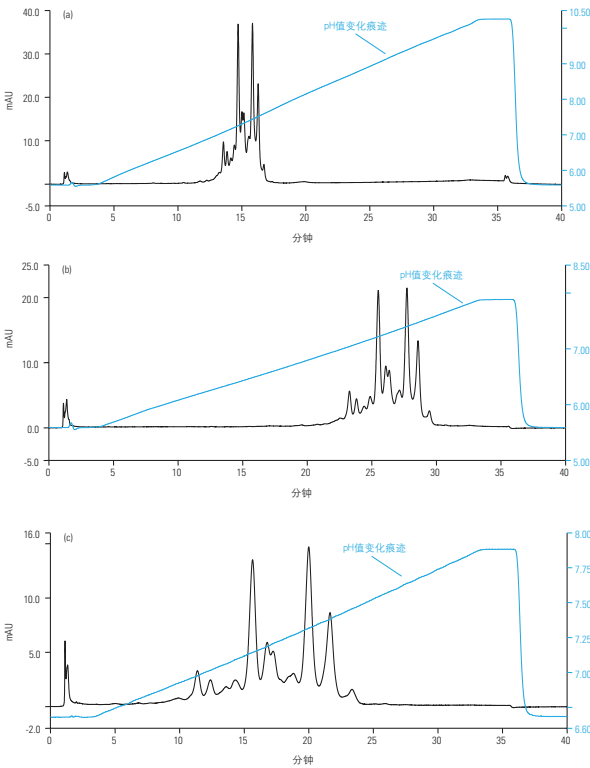


色谱柱:	A) ProPac WCX-10, 4 × 250 mm B) MAbPac SCX-10, (10 μm) 4 × 250 mm C) MAbPac SCX, 3 μm, 4 × 50 mm
流动相:	A: 20 mM MES + 60 mM NaCl, pH 5.6 B: 20 mM MES + 300 mM NaCl, pH 5.6
梯度:	A) 25–46.44% B in 50 min B) 15–36.44% B in 50 min C) 20–35% B in 10 min
流速:	1 mL/min (0.6 mL/min for C)
进样量:	A 和 B: 5 μL (50 μg) C: 15 μL (15 μg)
温度:	30 °C
检测波长:	280 nm
样品:	MAb; A 和 B) 10 mg/mL C) 1 mg/mL
峰:	1-5: 酸性变异体 6, 8, 11: 赖氨酸丢失变异体 12-16: 碱性变异体

采用离子交换pH梯度的平台法

在快节奏的药物研发环境下，采用一种适应大多数单克隆抗体分析的平台法是较为理想的。然而，对某种用于个别单克隆抗体阳离子交换分离的盐梯度法进行调整，经常需要付出大量的努力。通过pH梯度进行的离子交换分离能够使一种通用型平台法具备一定优势，因此不再需要针对个别样本制定分析方法。

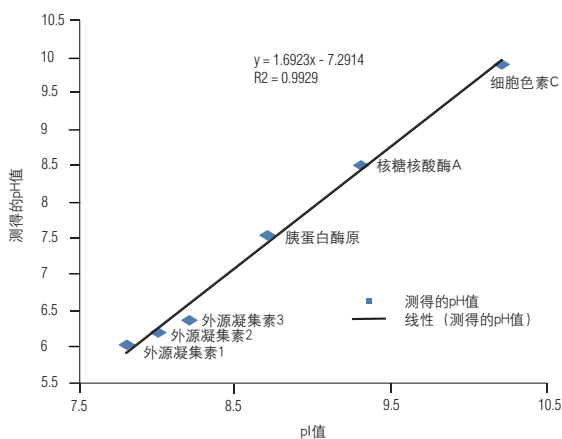
这种方法的特点是使用多组分两性离子缓冲系统，其线性梯度可从100%洗脱液A(低pH值缓冲液)的水平变化至100%洗脱液B(高pH值缓冲液)的水平。一旦在首次运行中确立了目标单克隆抗体的大致pH洗脱范围，便可在一个较窄的pH值范围内使用一个较小的pH梯度轻松实现进一步的分离优化。可以通过调整pH梯度范围实现对一次单克隆抗体分离的优化。当采用0%至100%B(pH5.6至10.2a(顶部))的较大pH梯度时，所有的分析物均应在7.0至8.0的pH值范围内完成洗脱。通过逐步将梯度调整至0–50% B(5.6–7.9 pH值范围，b(中部))和25–50% B(6.75–7.9 pH值范围，c(底部))，利用最少的优化步骤，实现进一步的分离度改善。



色谱柱:	MABPac SCX-10, 10 μ m 4.0 $\times$ 250 mm
洗脱液 A:	pH 梯度缓冲液 A
洗脱液 B:	pH 梯度缓冲液 B
pH 梯度:	(a) 0% B (pH 5.6) 至 100% B (pH 10.2) (b) 0% B (pH 5.6) 至 50% B (pH 7.9) (c) 25% B (pH 6.75) 至 50% B (pH 7.9)

利用pH梯度预测电荷变体pI值

在一个pH梯度内对洗脱液pH值进行监控，可使电荷变体的表征更加简单、更方便预测，因为只有当洗脱液pH值高于生物分子的pI值时，蛋白质和单克隆抗体才可以洗脱。这表明可以根据峰保持时间和测得的pH值，对某一蛋白质组分的pI值进行预测。



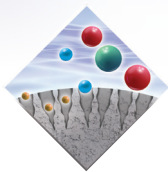
利用离子交换pH梯度的平台法——pH值设计工具缓冲液性能

可利用Thermo Scientific™ pH设计工具软件轻松实现对pH梯度的个性化调整。该程序包阐述了如何利用大量组分配制独特的缓冲液配方，甚至还通过分离梯度对离子强度、缓冲能力以及pH图谱进行了预测。

可利用Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 pH值和电导率在线监测器，对pH梯度的线性度进行进一步的验证。可将其加入UltiMate 3000 BioRS系统，以用作pH梯度离子交换色谱分析的平台。

UltiMate™ 3000 pH值和电导率监测器对HPLC法的制定(尤其对蛋白质和核酸分离)具有重要作用。其能够将流动相pH值及(或)电导率与组分的洗脱时间联系起来。pH值和电导率监测器可对梯度形成和色谱柱平衡进行监测，并帮助我们了解pH梯度离子交换色谱分析中色谱柱的缓冲效果。

用于聚合物筛分的尺寸排阻色谱法

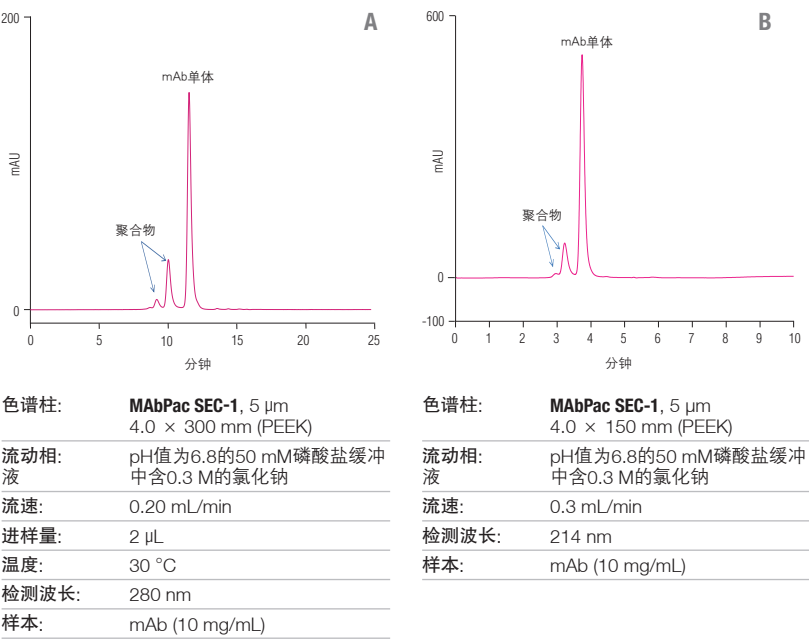


生物制药行业一直致力于单克隆抗体生物治疗药物的研发。形成于哺乳动物细胞培养的单克隆抗体可能包含大量二聚物和多聚合物。研究表明存在于药物中的这些聚合物可能会增强预期的药物疗效，但也可能引起严重的抗原反应和过敏性反应。因此，生物制药厂商须制定出用于监测二聚物和多聚合物的尺寸不均一性和控制水平的分析方法。

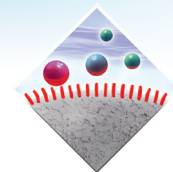
尺寸排阻色谱法 (SEC) 是用于分离单克隆抗体聚合物的一种理想选择。采用 SEC 法时，分离过程仅基于分子尺寸，而不会与介质表面相互作用。不同尺寸的分子渗入硅胶孔的程度不同，导致不同尺寸的分析物经过介质表面的保留时间不同。较大的分子不会扩散至孔深处，因此会被首先洗脱；而较小的分子会扩散至孔内较深的位置，因此会被稍后洗脱。

Thermo Scientific™ MAbPac™ SEC-1 色谱柱专用于单克隆抗体及其聚合物的分离及表征，以及 Fab 和 Fc 片段的分析。MAbPac SEC-1 色谱柱基于高纯、球型、多孔 (300 Å) 的 5 μm 硅胶，使用亲水层将这种硅胶改性，降低其次级相互作用。固定相可用于高、低离子强度的各种流动相，也适用于质谱中常用的挥发性洗脱液。

MAbPac SEC-1 色谱柱具有出色的分离能力，用于抗体聚合物分析。聚合物与单体可实现基线分离。为提高样品通量，可利用 150 mm 长的 MAbPac SEC-1 色谱柱实现更短的运行时间。分析时间不到 4 分钟，即可实现很高的分离度。



单克隆抗体分析中采用的疏水作用色谱法

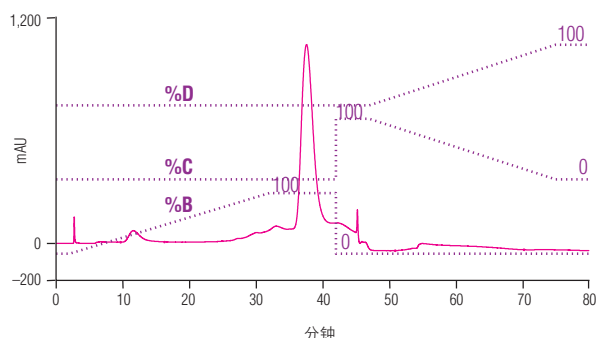


甲硫氨酸的氧化作用和天门冬酰胺的脱酰氨基作用是生物制药化学降解的主要诱因。因此，对这些变体进行充分表征具有重要作用。

疏水作用色谱法(HIC)是蛋白质化学家在不会产生变性作用的温和条件下用于分离蛋白质的一种重要手段。生物分子因其自身疏水性程度而分离。流动相中含有一种盐析剂，其在高浓度下能够通过加强溶质与固定相之间的疏水作用来结合蛋白。

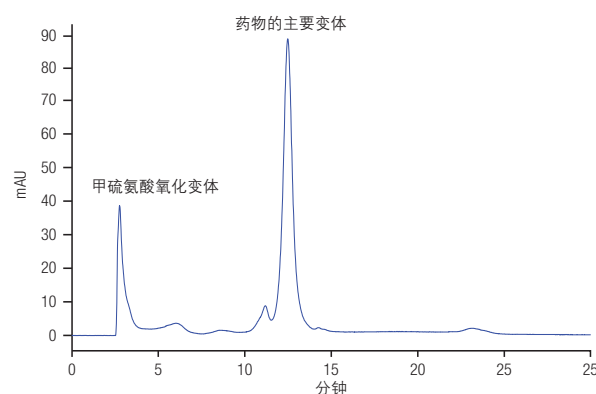
通过降低盐的浓度洗脱已结合的蛋白。由于蛋白在含盐的流动相中相对稳定，因此采用HIC法时通常能够保持其生物活性。这使得HIC法成为高分离分析的一种理想分离方法，也广泛用于纯化。

Thermo Scientific™ ProPac™ HIC-10以硅胶为基质，旨在使其适应HIC分离所需的高水和高缓冲盐的条件。其先进的水解稳定性能够帮助用户实现硅胶色谱柱典型的高分离效率，同时提供聚合物HIC介质通常缺乏的耐压性。ProPac HIC-10具有很高的载样量，使之成为单克隆抗体样本提纯的一种重要工具。



色谱柱:	ProPac HIC-10, 5 μ m 7.8 $\times$ 75 mm
流动相 A:	0.1 M 磷酸二氢钠 (pH 7.0) 中含 1 M 硫酸铵
流动相 B:	0.1 M 磷酸二氢钠 (pH 7.0)
流动相 C:	去离子水
流动相 D:	35% 乙醇
二元梯度:	平衡后 30 分钟内 0–100% B: 28 分钟内 0–100% D
流速:	1 mL/min
进样量:	20 μ L (166 μ g)
检测波长:	214 nm
样本:	单克隆抗体 100 μ L (50 mg/mL) + 0.1 M 磷酸二氢钠 (pH 7.0) 中 含 300 μ L 2 M 硫酸铵 + 200 μ L PBS

ProPac HIC-10 色谱柱的高分辨在氧化变体的分离过程中发挥非常重要的作用，可用于评估单克隆抗体的稳定性。某种单克隆抗体药品中的甲硫氨酸氧化变体可在 ProPac HIC-10 色谱柱上实现分离。此外，通过 HIC 法进行的分离与通过离子交换法进行的分离具有互补性，因此可为单克隆抗体的表征增加更多的选择余地。

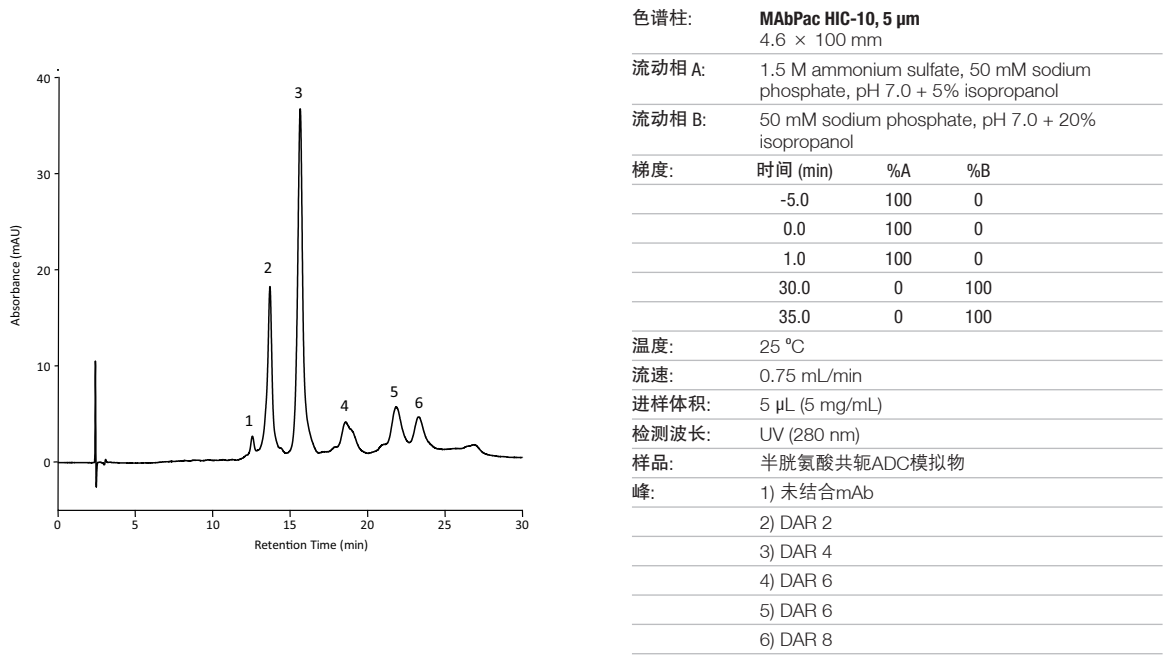


色谱柱:	ProPac HIC-10, 5 μ m 4.6 $\times$ 100 mm
流动相 A:	1M 磷酸二氢钠中含 0.1 M 硫酸铵, pH 7.0
流动相 B:	0.1 M 磷酸二氢钠, pH 7.0
流速:	0.75 mL/min
进样量:	100 μ L (50 μ g)
检测波长:	220 nm
样本:	单克隆抗体

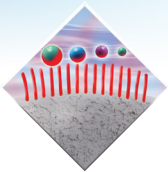
抗体偶联药物（ADC）作为靶向药物用于癌症的治疗近年来受到国内外生物制药公司的广泛关注。有效的ADC设计的关键因素之一是药物抗体率（DAR）。DAR描述的药物结合率除了直接影响效力及治疗的潜在毒性的程度，并可以对稳定性和聚集度等特性有重要的影响。因此，测定DAR在新的ADC疗法的发展至关重要。

赛默飞最新研发的MAbPac HIC-10，专用于 DAR的分析，对抗体和不同结合率的抗体有快速的高分离能力。

分离半胱氨酸共轭ADC模拟物



完整抗体或碎片的分析



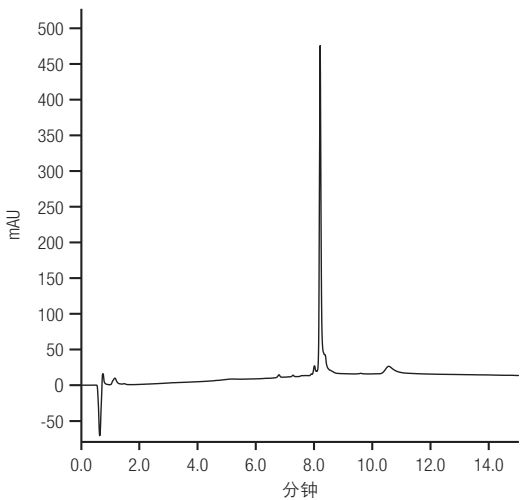
为验证整体分子的正确性，以提供可重现、安全且有效的生物药剂，须对不同糖型的正确蛋白序列以及其含量和相对丰度进行确认。达到这一目的的最简单的方法是与采用高分辨率MS的分离过程相结合。典型情况下，单克隆抗体分析要么在其完整形式下进行，要么裂解成的轻/重链进行。

反相色谱法多年来一直与MS探测配合使用，效果突出。挥发性缓冲液的低浓度与流动相的高有机相组成相结合，形成了稳定且有效喷雾的理想条件。此外，基于分离原理，我们设计了与反相色谱柱不同的，具有更高分离度的新型色谱柱。

完整蛋白质分析

Thermo Scientific™ ProSwift™ RP-4H Monolith HPLC色谱柱可用于完整蛋白质分析，例如对用于治疗慢性淋巴细胞白血病的Campath（一种抗肿瘤药物）单克隆抗体（阿仑单抗）的分析。整体性聚合物材料具有许多优势，例如，对大分子的色谱峰具有较小的展宽和较高的分离度。由于抗体尺寸较大（典型MW值为150 kDa），因此上述优势在抗体分析过程中大有裨益。

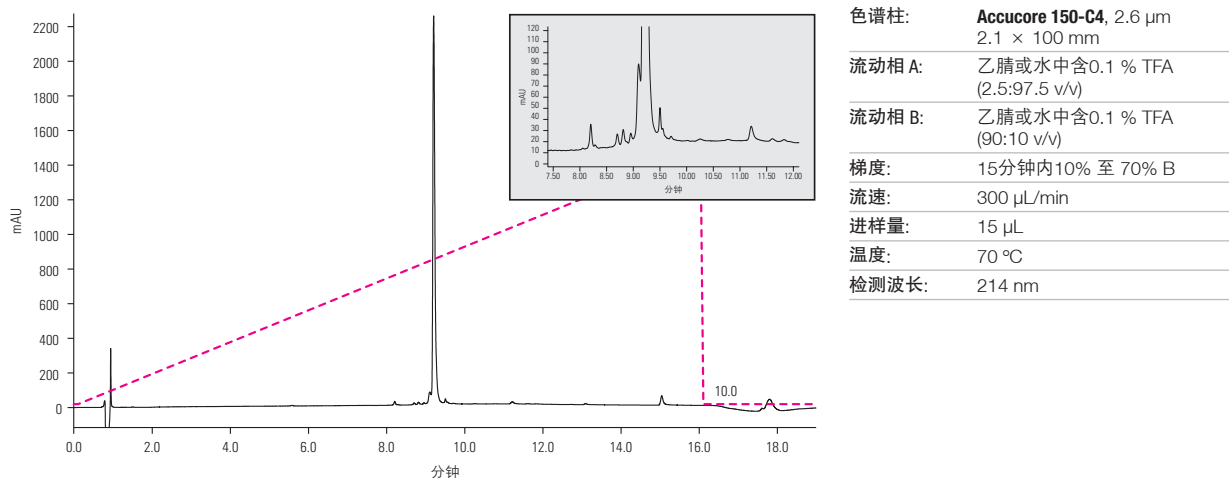
这种分析方法可与高分辨率质谱系统相结合，以确认目标产品的精确分子量，并对变体进行识别。



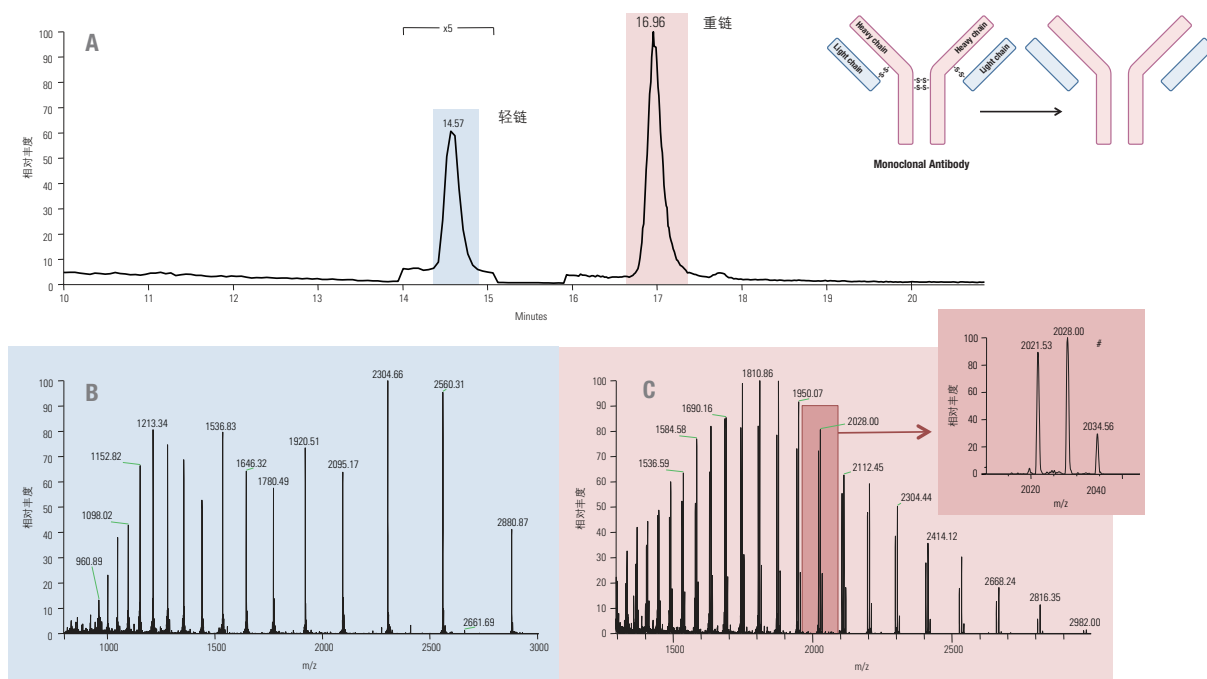
色谱柱:	ProSwift RP 4H 1.0 × 250 mm
洗脱液 A:	2.5% 乙腈, 0.1% TF A
洗脱液 B:	90% 乙腈, 0.1% TFA
梯度:	ProSwift RP-4H在15分 钟内为10%至70% B
流速:	300 µL/min
温度:	70 °C

抗体片段分析

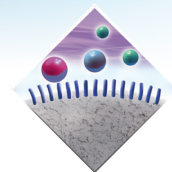
抗体与抗原的相互作用发生在抗原结合片段 (Fab) 区域内，该区域与可结晶片段 (Fc) 区域连接灵活。反相LC- MS/MS流程中的片段抗体分析允许对这两个区域进行较高水平的结构识别。Thermo Scientific™ Accucore™ 150-C4 HPLC色谱柱在单克隆抗体片段分析中的出色性能表现在Campath Fab片段分析中。C4表面多孔硅胶填料的优异性能可实现对多个小变体峰值的分离，请参考下面的色谱图。



可将Fab片段裂解成其轻链和重链组分，以实现进一步的结构测定。与高分离度MS的结合可实现对重链内不同糖型的识别。



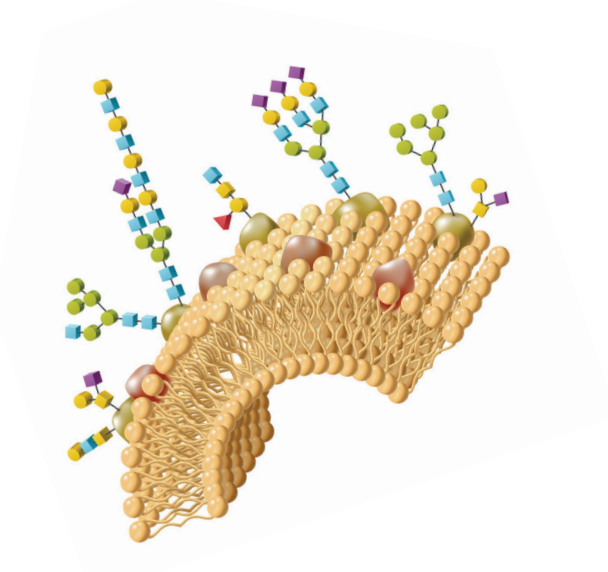
用于单克隆抗体变体表征的聚糖分析



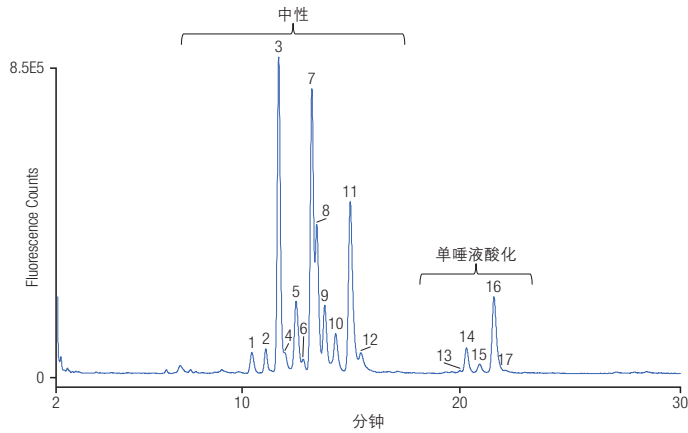
聚糖包括以“自由状态”及共轭形式广泛分布于生物系统内的低聚糖和多聚糖，如糖蛋白、糖脂和蛋白聚糖。它们涉及各种不同类型的生物和生理过程，并且经常成为癌症等疾病状态的关键生物指标。它们的功能，包括重组蛋白质和单克隆抗体等蛋白质药物的功效和安全性，经常依赖于附着在蛋白质上的聚糖结构和类型。聚糖结构具有多样性、复杂性和异质性。抗体糖基化是与结构和功能相关的产品异质化的一个主要来源。糖基化的变化是导致不同批次产品之间出现差异的一个主要因素，其会影响产品的稳表征和Fc体内效应功能。因此，聚糖的结构表征与定量测定在生物治疗和生物制药项目中发挥着至关重要的作用。

HILIC色谱柱主要基于氨基、酰胺基或两性离子键合相，通常用于聚糖分析。这些色谱柱能够分离主要由氢键结合形成的聚糖，所产生的分离物以尺寸和构成为基础。新近开发的Thermo Scientific™ GlycanPac™ AXH-1和AXR-1色谱柱是一种专用于聚糖结构、表征和定量分析的高性能HPLC/UHPLC系列色谱柱。GlycanPac AXH-1和AXR-1色谱柱的固定相基于先进的混合模式色谱技术，可突破与聚糖分离相关的传统限制。利用全新的固定相可进行基于电荷、尺寸和极性分离聚糖。

GlycanPac AXR-1色谱柱表面化学同时与弱阴离子交换(WAX)和反相作用机制相结合，以提供特殊的聚糖选择和行业领先的解决方案。WAX功能使按电荷递增顺序洗脱的带负电聚糖保留下来，同时，反相作用可促进根据同分异构结构和尺寸对带有相同电荷的聚糖进行高分离度分离。GlycanPac AXH-1色谱柱同时与WAX和亲水相互作用液相色谱法(HILIC)保留机制相结合，以实现中性和酸性聚糖的更高解析度。WAX功能为带负电聚糖提供了保留机制和更多选择，同时HILIC模式可促进根据极性和尺寸对带有相同电荷的聚糖进行分离。以上两种色谱柱拟用于HPLC和UHPLC色谱法，并使用荧光或MS检测器对其进行了测试，可使用挥发性缓冲液(如，醋酸铵和甲酸铵)和乙腈，因此可以和MS仪器联用。



下图展示了抗体聚糖层析分离的一个典型实例，其中带有2AA标签的N聚糖来自人IgG，利用1.9 μ m粒度的GlycanPac AXH-1色谱柱对其进行了分离。与Thermo Scientific™ Q Exactive™质谱仪相连接，可对每个色谱峰所代表的聚糖进行定性。基于电荷的聚糖分离相对于其它市售HILIC色谱柱具有一定的优势。可利用SimGlycan®软件进行表征，并识别所有观察到的聚糖。



色谱柱:	GlycanPac AXH-1 , 1.9 μ m 2.1 $\times$ 150 mm
流动相 A:	乙腈 (80%) + 水 (20%)
流动相 B:	甲酸铵 (80 mM, pH = 4.4)
流速:	0.4 mL/min
进样量:	20 Pmoles
温度:	30 $^{\circ}$ C
检测波长:	320/420 nm
样本:	2AA 标记的、从人IgG中获取的N聚糖

时间 (分钟)	% A	% B	流速 (mL/min)	速率
-10	99	1.0	0.4	5
0	99	1.0	0.4	5
30	87.5	12.5	0.4	5

使用SimGlycan®软件对人IgG N聚糖进行MS表征

峰值	中性聚糖 (0电荷)
1	
2	
3	
4	
5a	
5b	
6	
7	
8	
9	未知
10	
11	
12	

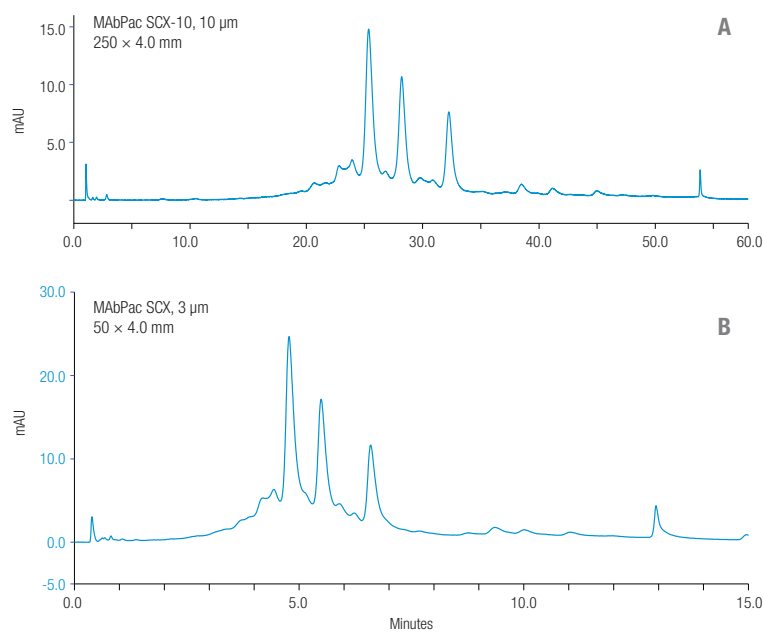
峰值	单唾液酸化聚糖 (-1电荷)
13a	
13b	
14	
15	
16	
17	



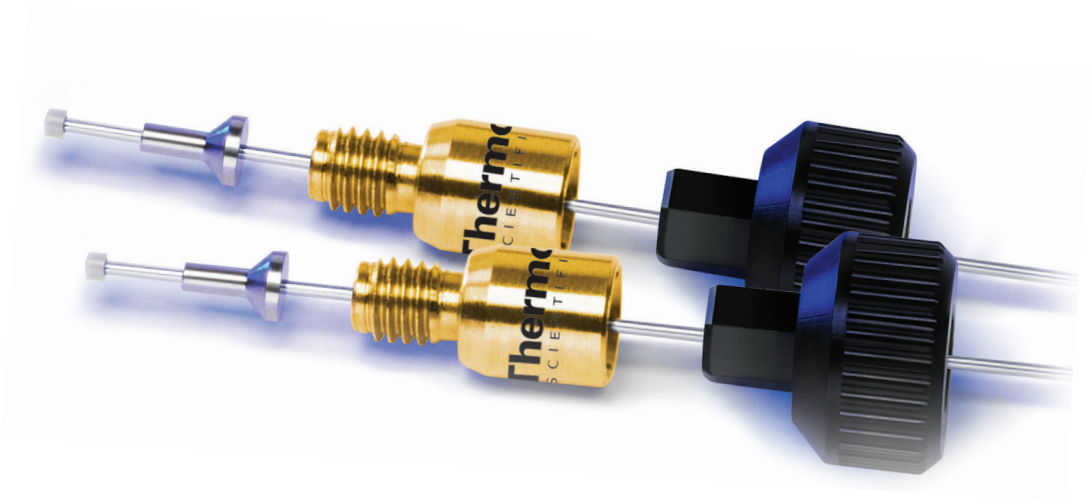
使用超高效液相色谱 (UHPLC) 进行生物分子表征

UltiMate 3000 BioRS系统专门用于生物分子，如蛋白质、肽和其它生物治疗药物的表征。系统采用全新的生物相容性Thermo Scientific™ Dionex™ Viper™ 手拧接头技术，无金属流道遍布整个系统，死体积几乎为零，可确保最佳性能。

可在每一个实验室中配备具有我们的创新型色谱柱技术的最先进UHPLC系统，以实现生物分子表征的最高分离度和灵敏度。

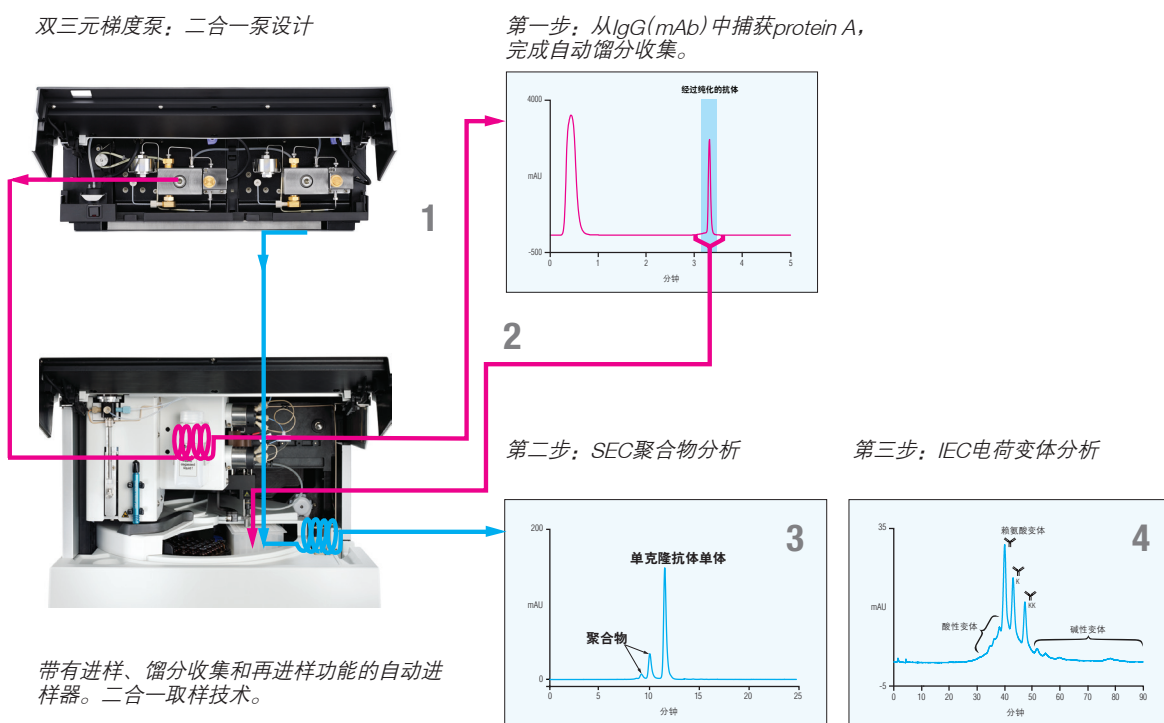


色谱柱 A:	MAbPac SCX-10, 10 µm 4.0 × 250 mm
色谱柱 B:	MAbPac SCX-10, 3 µm 4.0 × 50 mm
流动相 A:	20 mM MES + 60 mM 氯化钠, pH 5.6
流动相 B:	20 mM MES + 300 mM 氯化钠, pH 5.6
梯度 A:	50分钟内15–36.44% B
梯度 B:	10分钟内20–35% B
流速: A	1.0 mL/min
流速: B	B: 0.6 mL/min
温度:	30 °C
检测波长:	280 nm
样本:	For A: 10 mg/mL; 5 µL (50 µg 进样量) For B: 1 mg/mL; 15 µL (15 µg 进样量)



利用集成的阀切换功能，即使在对几百个单克隆抗体样本进行分析时，也可通过全自动多色谱柱设置对样本进行纯化和分析。

将含有抗体的细胞培养液样本注入到一个protein A色谱柱上，用于收集抗体，然后将收集的抗体进行分析——首先上样到SEC色谱柱上，然后上样到IEC色谱柱上。在UltiMate 3000系统上，上述流程可全自动完成。



生物相容性UltiMate 3000自动单克隆抗体分析。

首先对样本进行protein A亲和性纯化(1)和馏分收集(2)。然后将收集的馏分再进样，用于SEC聚合物分离(3)，随后利用IEC对电荷变体进行分析(4)。



单克隆抗体分离及表征的LC-MS工作流程

质谱分析法(MS)，尤其是高分辨率准确质量数(HRAM)MS，已被广泛应用于蛋白质药物开发的几乎所有阶段。现代的HRAM技术可提供各种蛋白质特性的准确信息，如完整的分子量、糖基化形式、氨基酸序列、翻译后修饰以及由样本处理和存储产生的小杂质；除此之外，其还可以提供高阶结构性信息，如修饰后的蛋白质结构变化、蛋白质药物与受体蛋白质之间的非共价键相互作用以及由错误折叠而形成的蛋白质聚集。完整蛋白质水平的分子量分析通常是结构性表征的第一步。

轨道阱质谱技术：与生物分子表征完美契合

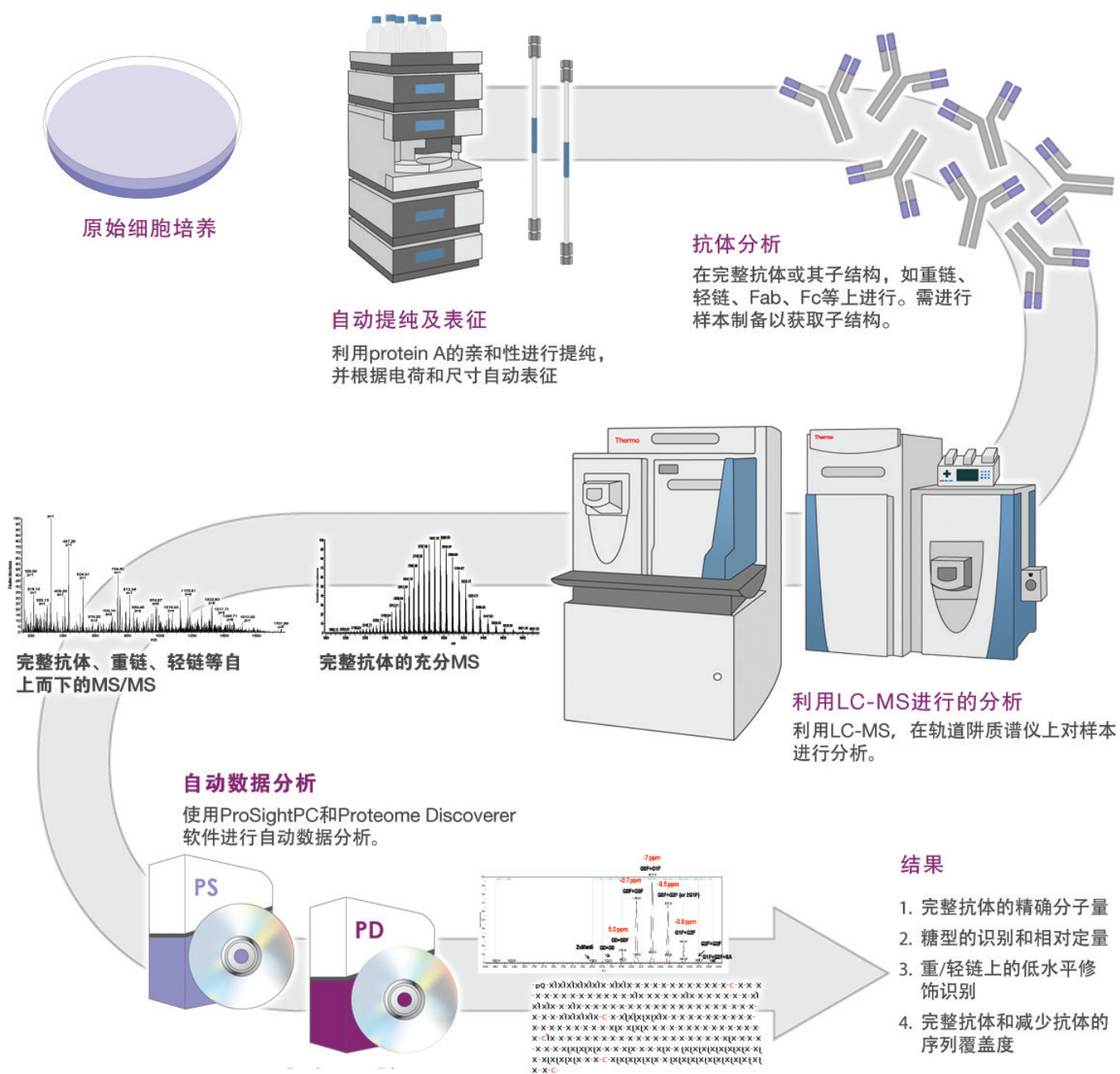
为获取完整单克隆抗体精确且可重现的测量结果，关键的一点在于仪器要具有较高的灵敏度、较高的分辨率、较高的质量准确度和较高的采集速度。四极杆-轨道阱仪器和混合型线性离子阱-轨道阱仪器均非常适合于完整的质量测量和从上到下的排序。Thermo Scientific™ Orbitrap™系列质谱仪对电子设备进行了改进，从而明显提高了抗体分析的灵敏度。

先进的信号处理技术使Exactive Plus、Exactive Plus EMR和Q Exactive的分辨能力在 m/z 200下高达140,000，使Q Exactive Plus在 m/z 200下高达280,000，使Orbitrap Elite在 m/z 400下高达240,000，使Orbitrap Fusion在 m/z 200下高达450,000。同时，其具有较高的质量准确度，可进行精确测量而不会影响采集速度。

将S-lens和基于AGC的采集相结合，可确保在MS和MS/MS模式下均具有较高灵敏度。定期获取高质量光谱，以进行完整质量测量，并对单克隆抗体进行从上到下的排序。



单克隆抗体疗法提取、分离和表征的完整流程



订购信息

应用：亲和力和效价测定

MAbPAC Protein A

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	4.0 mm (内径)
12	HPLC 色谱柱	35	082539

应用：IEC电荷变体分析

ProPac WCX-10

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	2.1 mm (内径)	4.0 mm (内径)	9.0 mm (内径)	22.0 mm (内径)
10	保护柱	50	063480	054994	—	—
	HPLC 色谱柱	50	—	074600	—	—
		100	—	SP5829	—	—
		150	—	SP7603	—	—
		250	063472	054993	063474	SP5482

MAbPac SCX-10

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	2.1 mm (内径)	4.0 mm (内径)	9.0 mm (内径)
3	HPLC 色谱柱	50	—	077907	—
5	HPLC 色谱柱	50	—	078656	—
		150	—	085198	—
		250	—	078655	—
10	保护柱	50	075749	074631	—
	HPLC 色谱柱	50	—	075603	—
		150	—	075602	—
		250	075604	074625	SP6866

MAbPac SCX-10 RS

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	2.1 mm (内径)	4.6 mm (内径)
5	BioRS 色谱柱	50	082675	082674
		150	088242	085209
		250	082515	082673

缓冲液浓缩液

品名	货号
CX-1 梯度缓冲液 A (pH 5.6), 125 mL	083273
CX-1 梯度缓冲液 B (pH 10.2), 125 mL	083275
CX-1 梯度缓冲液试剂盒 (pH 5.6 至10.2), 125 mL	083274
CX-1 梯度缓冲液 A (pH 5.6), 250 mL	085346
CX-1 梯度缓冲液 B (pH 10.2), 250 mL	085348
CX-1 梯度缓冲液试剂盒 (pH 5.6 至 10.2), 250 mL	085349
pH 值设计工具软件	085022

订购信息

应用：聚合物分离

MAbPac SEC-1

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	2.1 mm (内径)	4.0 mm (内径)	7.8 mm (内径)
5	保护柱	50	—	074697	—
	HPLC 色谱柱	150	SP6938	075592	—
		300	SP6937	074696	088460

应用：Met/Trp氧化及Asp变体分析

ProPac HIC-10

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	2.1 mm (内径)	4.6 mm (内径)	7.8 mm (内径)
5	HPLC 色谱柱	75	—	—	063665
		100	063653	063655	—
		250	—	074197	—

应用：抗体耦联药物（ADC）药物抗体率分析

MAbPac HIC-10

Description	粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	4.6 mm (内径)
MAbPac HIC-10 Analytical Column	5	保护柱	10	088482
Guard Cartridges (2/pk)	5	HPLC 色谱柱	100	088480
			250	088481

应用：RP完整和片段单克隆抗体分析

ProSwift RP

功能团	长度 (mm)	1.0 mm (内径)	4.6 mm (内径)
RP-2H	50	—	064296
RP-4H	50	069477	—
RP-4H	250	066640	—

订购信息

适用于生物分子的Accucore色谱柱

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	内径 (mm)	150-C18	150-C4
2.6	保护柱 (4/μk)	10	2.1	16126-012105	16526-012105
			3.0	16126-013005	16526-013005
			4.6	16126-014005	16526-014005
	HPLC 色谱柱	30	2.1	16126-032130	16526-032130
			3.0	16126-033030	16526-033030
			4.6	16126-034630	16526-034630
		50	2.1	16126-052130	16526-052130
			3.0	16126-053030	16526-053030
			4.6	16126-054630	16526-054630
		100	2.1	16126-102130	16526-102130
			3.0	16126-103030	16526-103030
			4.6	16126-104630	16526-104630
		150	2.1	16126-152130	16526-152130
			3.0	16126-153030	16526-153030
			4.6	16126-154630	16526-154630
		250	2.1	—	—

应用：单克隆抗体聚糖分析

GlycanPac AXH-1

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	2.1 mm (内径)	3.0 mm (内径)	4.6 mm (内径)
1.9	UHPLC 色谱柱	100	082473	—	—
		150	082472	—	—
		250	082521	—	—
3	保护柱芯柱 (2/μk)	10	082476	082475	082474
	HPLC 色谱柱	150	082470	082469	082468

GlycanPac AXR-1

粒度 (μm)	规格	长度 (mm)	2.1 mm (内径)	3.0 mm (内径)	4.6 mm (内径)
1.9	UHPLC 色谱柱	100	088136	—	—
		250	088135	—	—
3	保护柱芯柱 (2/μk)	10	088258	088259	088260
	HPLC 色谱柱	150	088251	088252	088255

色谱工作者

资源

Thermo Scientific 色谱柱及耗材目录

该目录范围广泛，其中包括650余页经证明的色谱工具和产品选择指南。该目录已针对iPad®进行优化，您可以利用强大的搜索工具上网搜索。

网址：www.thermoscientific.com/catalog



色谱分析资源中心

我们网站的资源中心为您提供技术支持、应用、技术提示和文献，帮助您更好地掌握分离技术。

网址：www.thermoscientific.com/crc



赛默飞世尔科技(中国)有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

Thermo
SCIENTIFIC
Part of Thermo Fisher Scientific