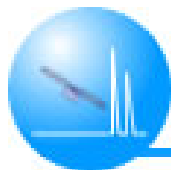


モノクローナル抗体 (MAb)の分析

～イオン交換, サイズ排除, 逆相の各モード～



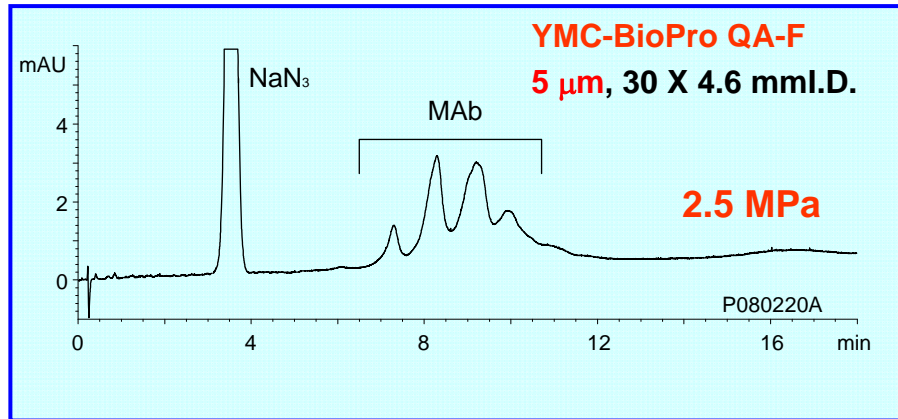
株式会社 ワイエムシイ

(S110414A)

各分離モードの特徴および用途

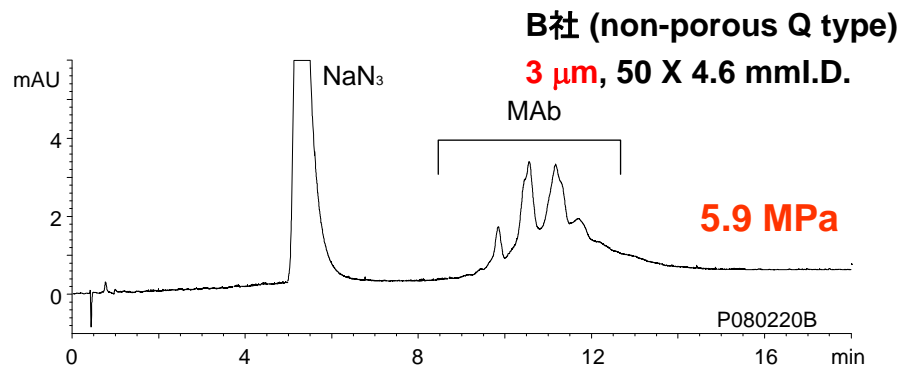
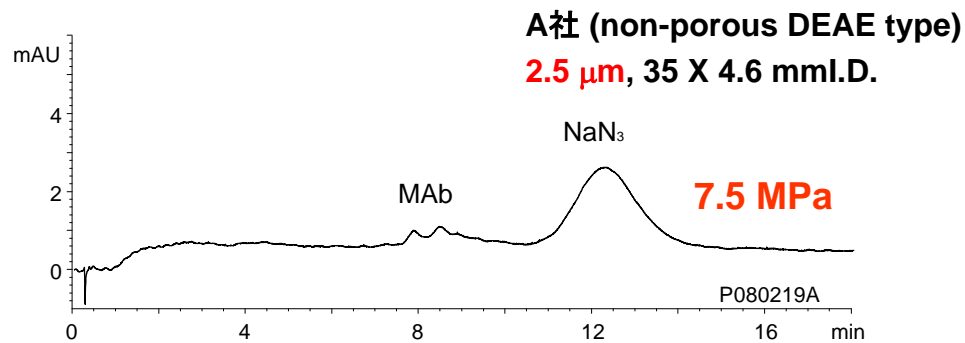
	イオン交換 (IEC) YMC-BioProシリーズ	サイズ排除 (SEC) YMC-Pack Diol	逆相 (RP) Proシリーズ, Wide-Poreカラム etc.
分離の原理	電荷	分子サイズ	疎水性
適用分子量	数百万まで	約100万まで	約10万まで
分離能	+++	++	+++
スピード	++ ~ +++	+	+++
試料負荷量	+++	++	++
試料安定性	+++	+++	+ ~ ++
用途	初期精製～最終精製 大量処理 Crude～精製品の分析	初期精製 or 最終精製 脱塩 (バッファー交換) 精製品の純度確認	主に最終精製 特に高分離が必要な場合 精製品の高精密分析

ノンポーラスアニオン交換カラムでのMAb分析



MAb : Mouse monoclonal IgG1
(Anti-human IgG4, Purified by DEAE chromatography, containing NaN_3)

Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl 10-25%B (0-18 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 10 μL (0.1 mg/mL)
Sample	: Monoclonal mouse IgG1 (Purified by DEAE chromatography, containing NaN_3)



YMC-BioPro QA-Fでは短い分析時間で高分解能の分離が得られます。

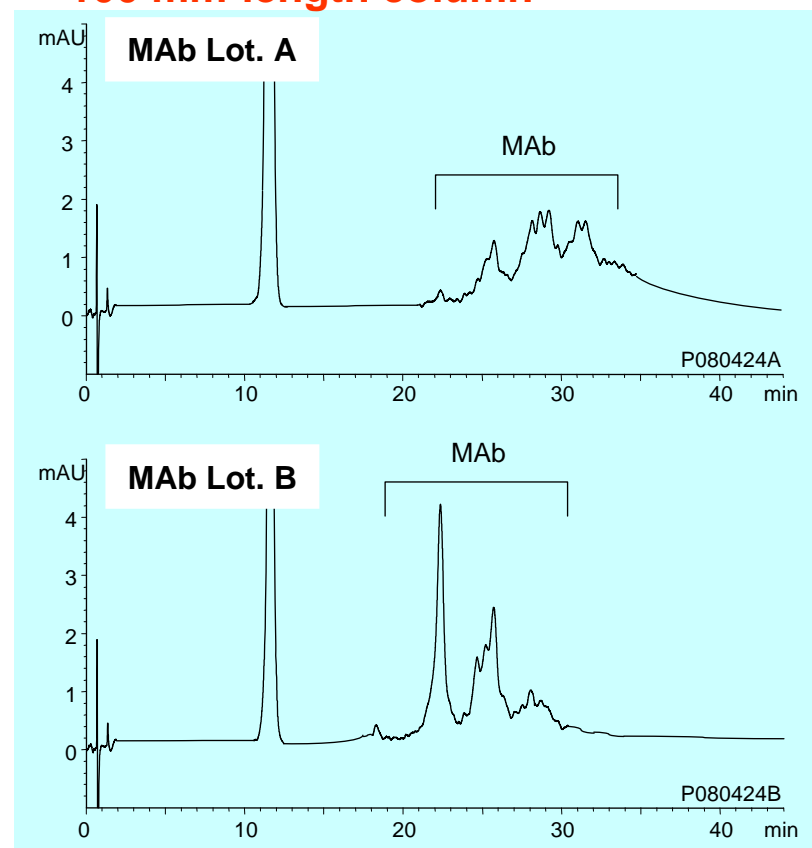
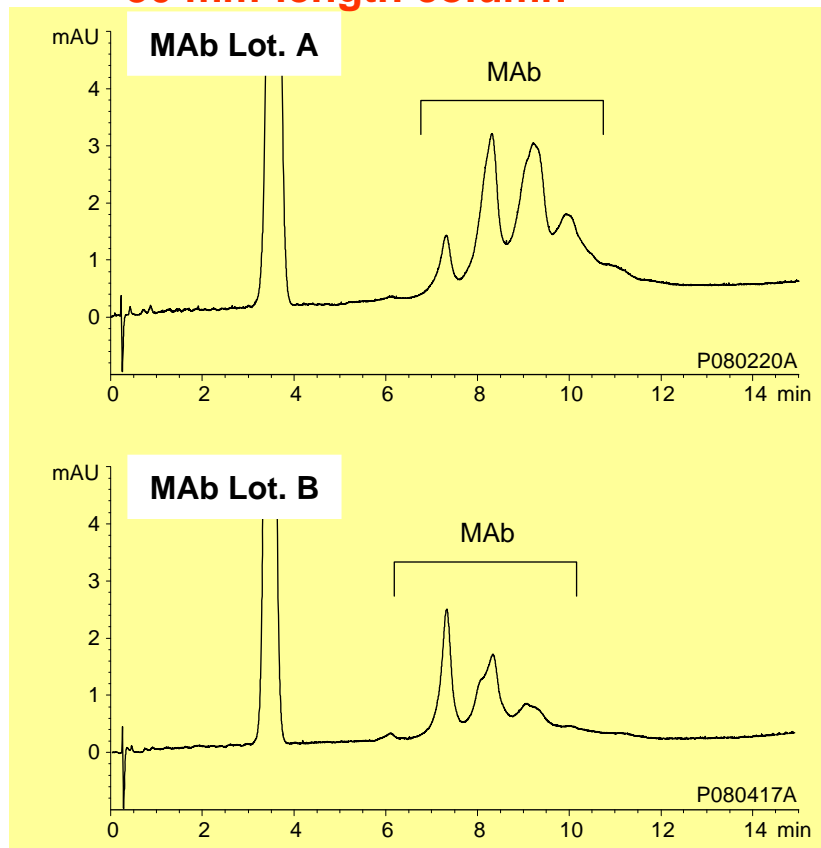
ノンポーラスカラム YMC-BioPro QA-FでのMAb 分析

30 mm長カラムと100 mm長カラムの比較

30 mm-length column

YMC-BioPro QA-F

100 mm-length column



Column	YMC-BioPro QA-F 30 X 4.6 mm I.D. YMC-BioPro QA-F 100 X 4.6 mm I.D.
Eluent	A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl
	10-25%B (0-18 min) for 30 mm length column 10-25%B (0-60 min) for 100 mm length column
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 10 µL for 30 mm length column 14 µL for 100 mm length column
Sample	: Monoclonal mouse IgG1 (0.1 mg/mL) (Purified by DEAE chromatography, containing Na3)

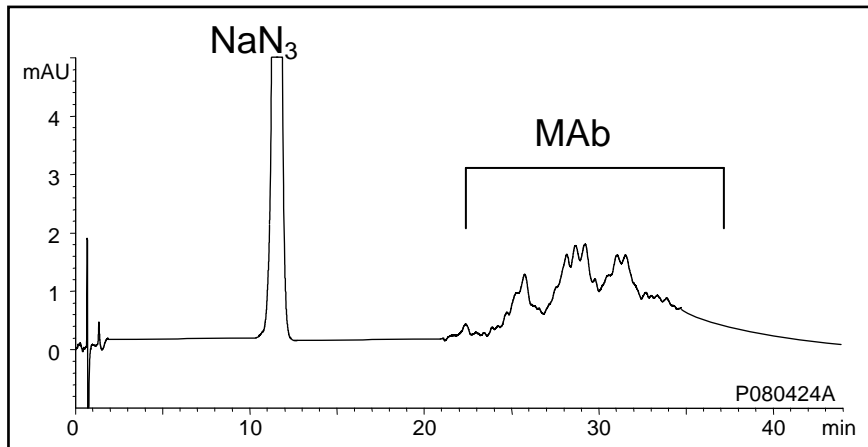
DEAEクロマトグラフィで精製された市販MAbについて試薬ロットが異なるものを、30 mm長と100 mm長の各サイズのYMC-BioPro QA-F で分析しています。各クロマトグラムで試薬のロット差が認められ、100 mm長カラムではより詳細な識別が可能です。

ノンポーラスカラム YMC-BioProでのMAb 分析

SAX (QA-F) と SCX (SP-F)の比較

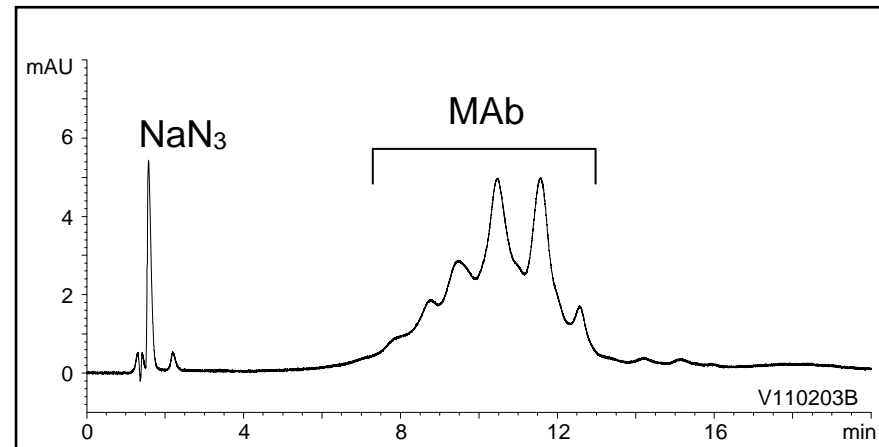
MAb : Mouse monoclonal IgG1
(Anti-human IgG4, Purified by DEAE chromatography, containing NaN_3)

Non-Porous type YMC-BioPro QA-F
5 μm , 100 X 4.6 mmI.D.



Eluent : A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1)
B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl
10-25%B (0-60 min)
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 25°C
Detection : UV at 220 nm
Injection : 14 μL

Non-porous type YMC-BioPro SP-F
5 μm , 100 X 4.6 mmI.D.



Eluent : A) 20 mM MES-NaOH (pH 5.6) containing 30 mM NaCl
B) 20 mM MES-NaOH (pH 5.6) containing 180 mM NaCl
20-40%B (0-20 min)
Flow rate : 180 cm/hr (0.5 mL/min)
Temperature : 30°C
Detection : UV at 280 nm
Injection : 10 μL (1 mg/mL)

YMC-BioProは強アニオン交換カラムQA-F、強カチオン交換カラムSP-Fともに MAb分析に有効です。

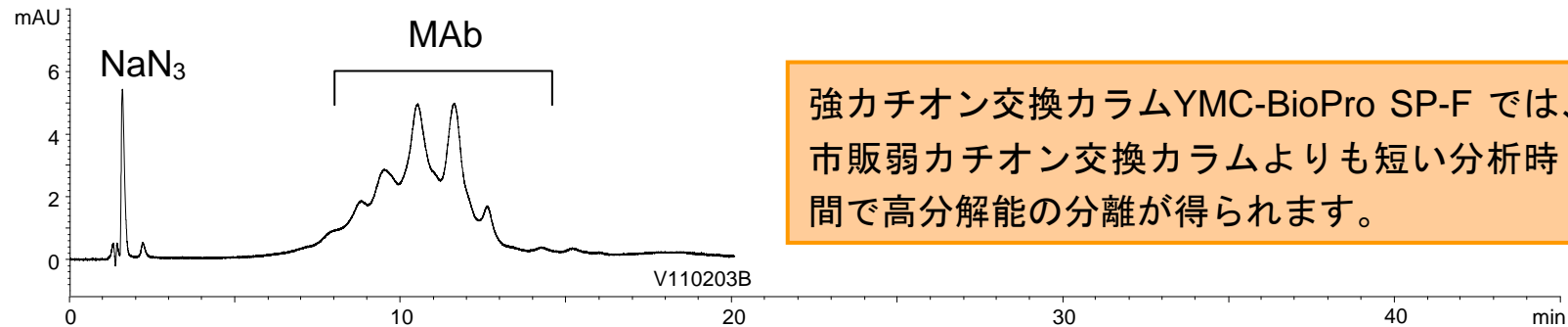
ノンポーラスカチオン交換カラムでのMAb分析

SCX (SP-F) と WCX の同一のグラジエント条件における比較

MAb : Mouse monoclonal IgG1
(Anti-human IgG4, Purified by DEAE chromatography, containing NaN_3)

YMC-BioPro SP-F

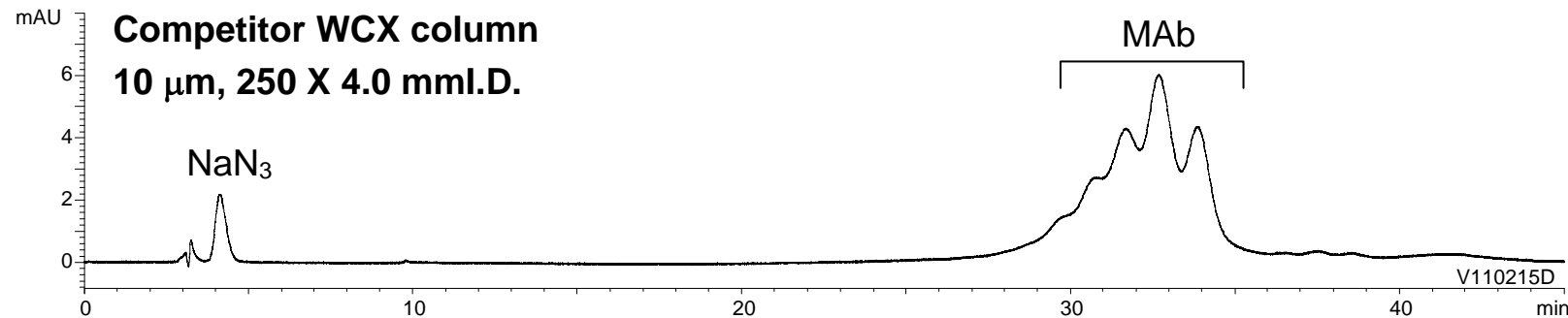
5 μm , 100 X 4.6 mml.D.



強カチオン交換カラムYMC-BioPro SP-F では、市販弱カチオン交換カラムよりも短い分析時間で高分解能の分離が得られます。

Competitor WCX column

10 μm , 250 X 4.0 mml.D.

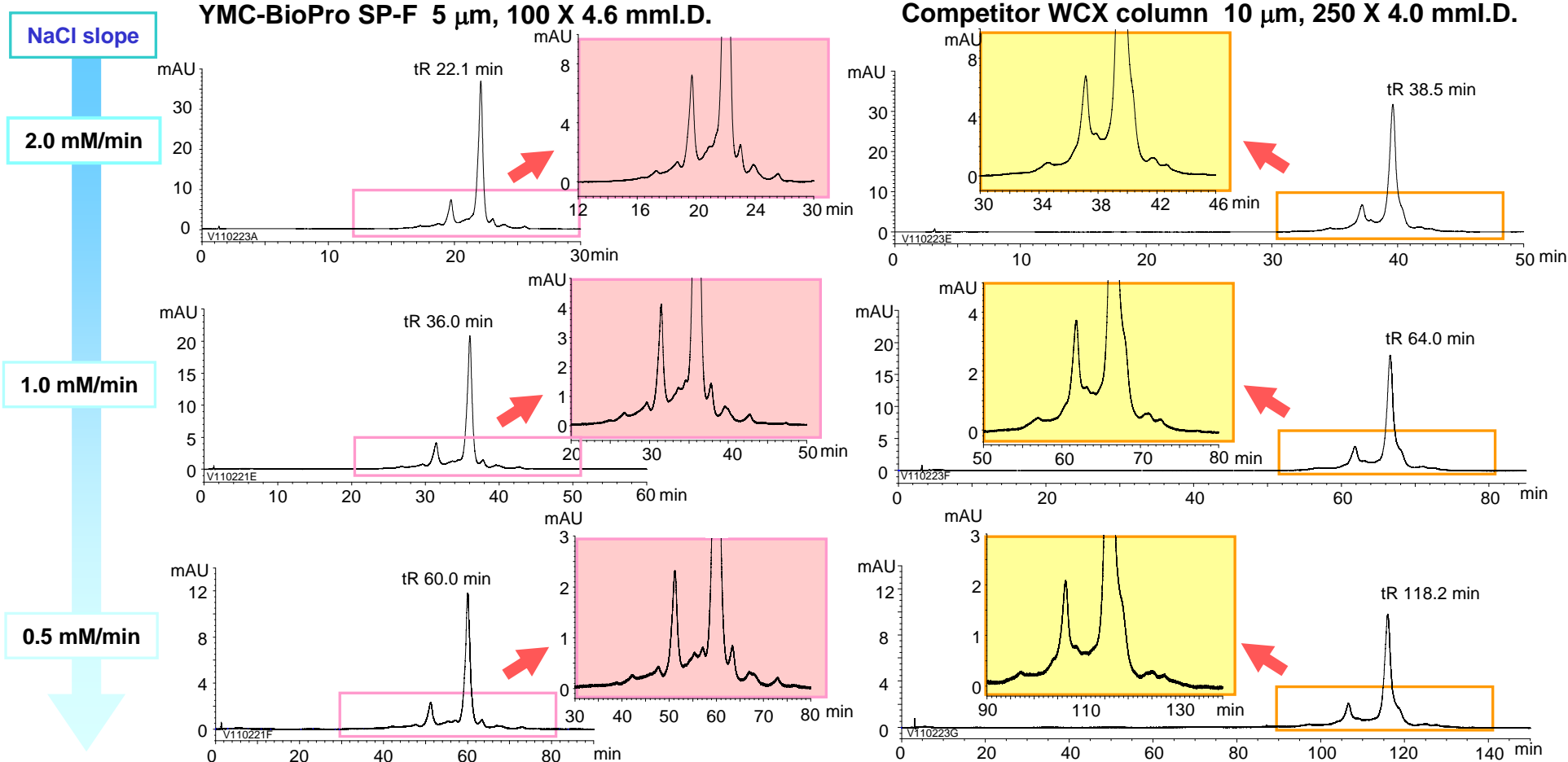


Eluent	: A) 20 mM MES-NaOH (pH 5.6) containing 30 mM NaCl B) 20 mM MES-NaOH (pH 5.6) containing 180 mM NaCl 20-80%B (0-60 min)
Flow rate	: 180 cm/hr (0.378 mL/min)
Temperature	: 30°C
Detection	: UV at 280 nm
Injection	: 10 μL (1 mg/mL)

ノンポーラスカチオン交換カラムでのMAb分析

SCX (SP-F) と WCX の同一のグラジエント条件における比較

MAb : Humanized monoclonal IgG1



Eluent	: A) 20 mM MES-NaOH (pH 5.6) B) 20 mM MES-NaOH (pH 5.6) containing 0.2 M NaCl
Initial gradient conc.	: 35% B (70 mM NaCl)
Gradient slope	: 1%B/min (2 mM NaCl/min), 0.5%B (1 mM NaCl/min), 0.25%B (0.5 mM NaCl/min)
Flow rate	: 180 cm/hr (0.5 mL/min for 100 X 4.6 mmI.D., 0.378 mL/min for 250 X 4.0 mmI.D.)
Temperature	: 30°C
Detection	: UV at 280 nm
Sample	: MAb (Humanized monoclonal IgG 1) (1 mg / mL)
Injection	: 10 μ L

SCX (YMC-BioPro SP-F) とWCX (市販品)について、pH 5.6での同一のグラジエント条件でMAb分離を比較しています。NaClの勾配は低い方が分離良好です。YMC-BioPro SP-F では、いずれの条件においてもMAb 分離はWCX (市販品)よりも良好です。

ノンポーラスカチオン交換カラムでのMAb分析

SCX (SP-F) と WCX の最適化条件における比較

MAb : Humanized monoclonal IgG1

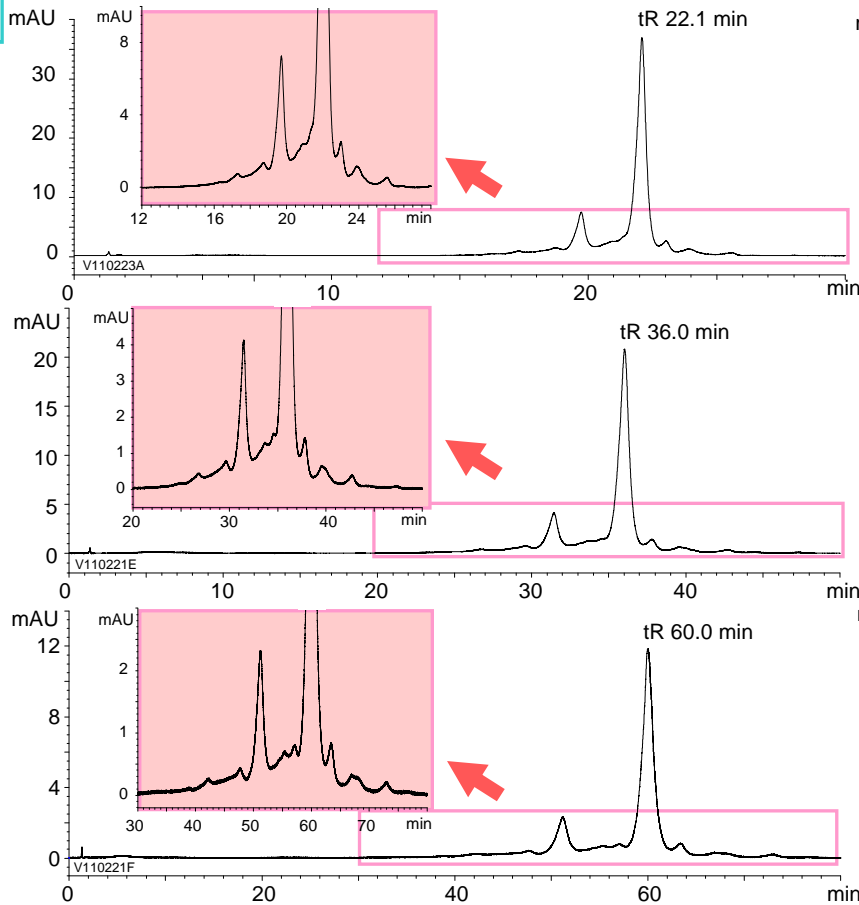
NaCl slope

2.0 mM/min

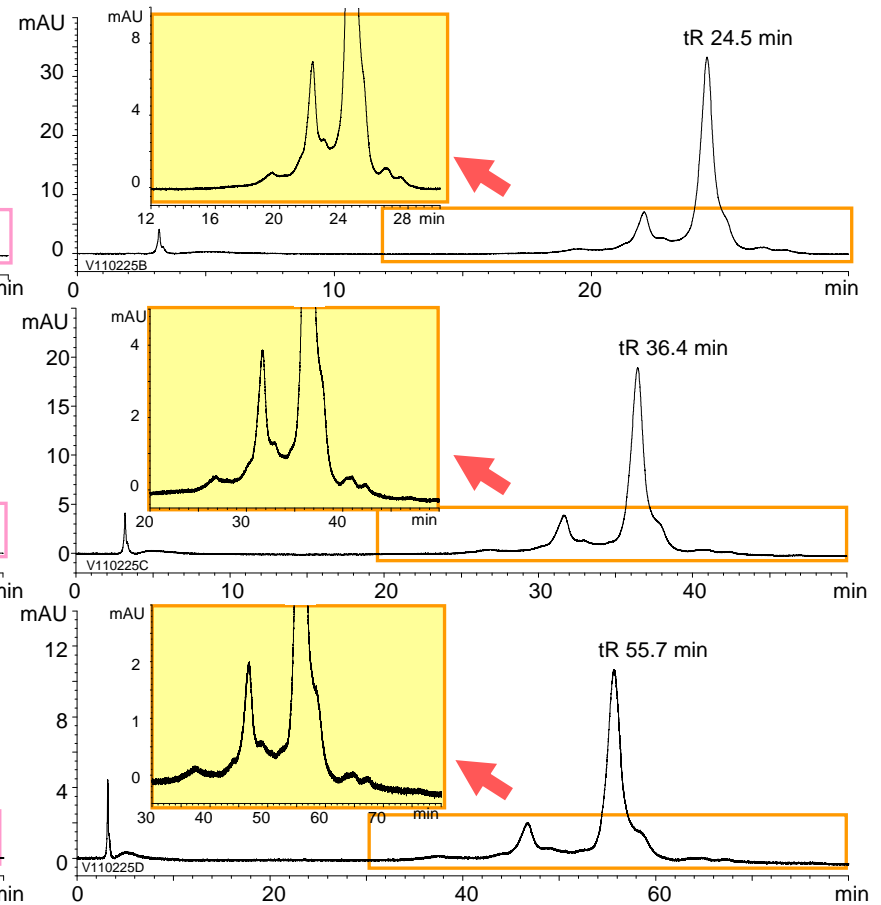
1.0 mM/min

0.5 mM/min

YMC-BioPro SP-F 5 μ m, 100 X 4.6 mmI.D.



Competitor WCX column 10 μ m, 250 X 4.0 mmI.D.



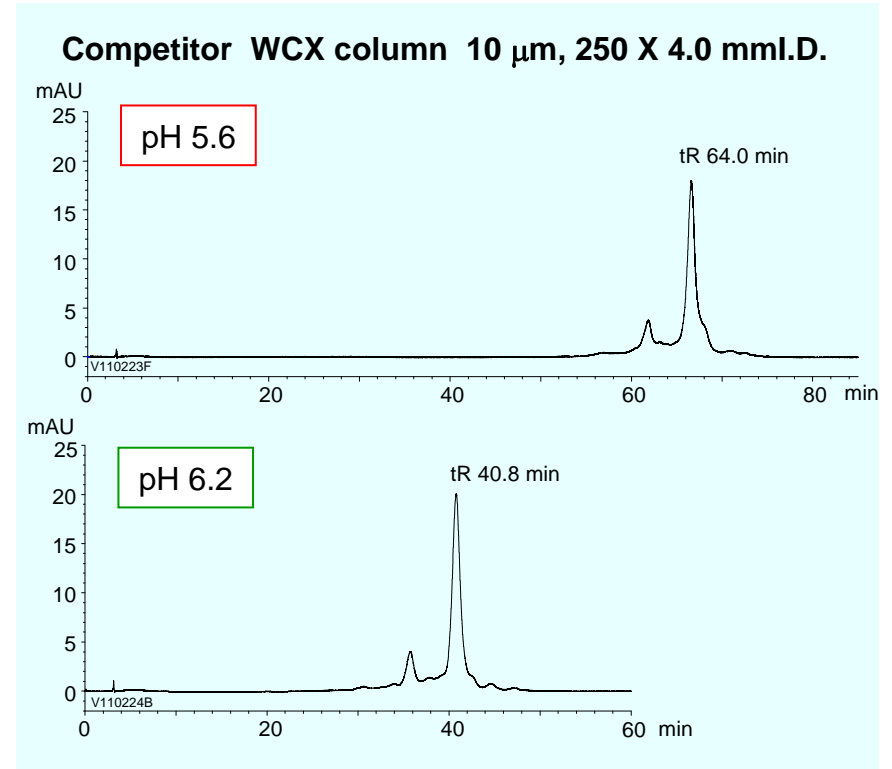
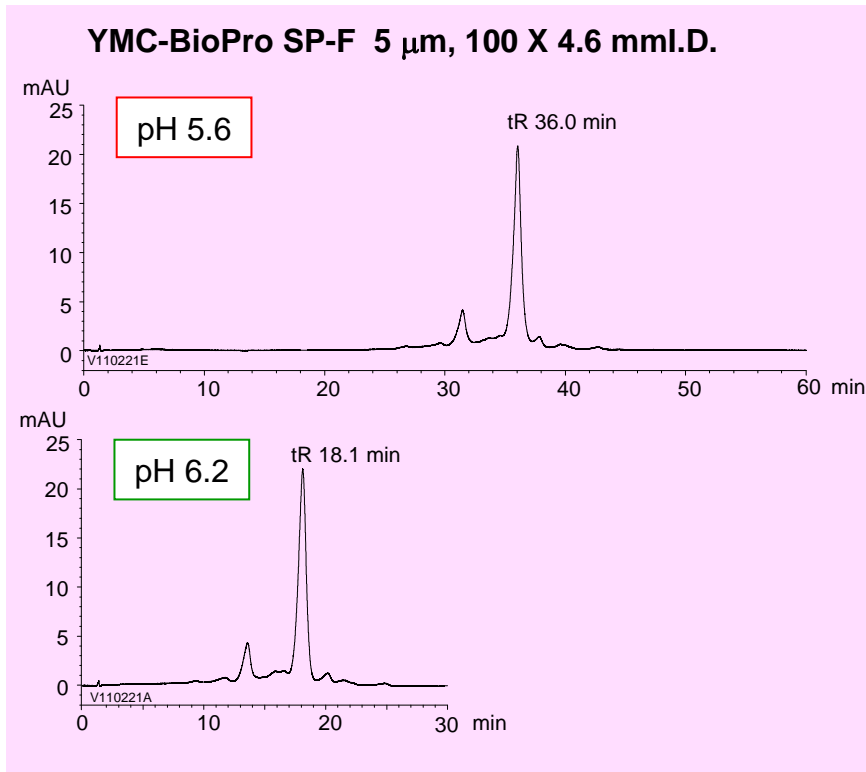
Eluent	: A)20 mM MES-NaOH (pH 5.6) B)20 mM MES-NaOH (pH 5.6) containing 0.2 M NaCl
Initial gradient conc.	: 35% B (70 mM NaCl)
Gradient slope	: 1%B/min (2 mM NaCl/min), 0.5%B (1 mM NaCl/min), 0.25%B (0.5 mM NaCl/min)
Flow rate	: 180 cm/hr (0.5 mL/min for 100 X 4.6 mmI.D.)
Temperature	: 30°C
Detection	: UV at 280 nm
Sample	: MAb (Humanized monoclonal IgG1) (1 mg / mL)
Injection	: 10 μ L

Eluent	: A)20 mM MES-NaOH (pH 5.6) B)20 mM MES-NaOH (pH 5.6) containing 0.2 M NaCl
Initial gradient conc.	: 50% B (100 mM NaCl)
Gradient slope	: 1%B/min (2 mM NaCl/min), 0.5%B (1 mM NaCl/min), 0.25%B (0.5 mM NaCl/min)
Flow rate	: 180 cm/hr (0.378 mL/min for 250 X 4.0 mmI.D.)
Temperature	: 30°C
Detection	: UV at 280 nm
Sample	: MAb (IgG1) (1 mg / mL)
Injection	: 10 μ L

ノンポーラスカチオン交換カラムでのMAb分析

SCX (SP-F) と WCX のpHが異なる条件における比較

MAb : Humanized monoclonal IgG1

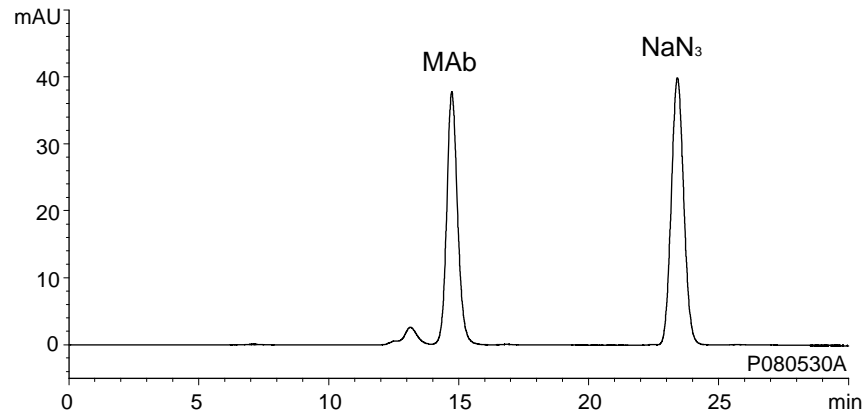


Eluent	: A)20 mM MES-NaOH (pH 5.6 or 6.2) B)20 mM MES-NaOH (pH 5.6 or 6.2) containing 0.2 M NaCl
Initial gradient conc.	: 35% B (70 mM NaCl)
Gradient slope	: 0.5%B (1 mM NaCl/min)
Flow rate	: 180 cm/hr (0.5 mL/min for 100 X 4.6 mmI.D.) (0.378 mL/min for 250 X 4.0 mmI.D.)
Temperature	: 30°C
Detection	: UV at 280 nm
Sample	: MAb (Humanized monoclonal IgG1), (1 mg / mL)
Injection	: 10 μ L

モノクローナル抗体 (MAb) サイズ排除とイオン交換の比較

SEC

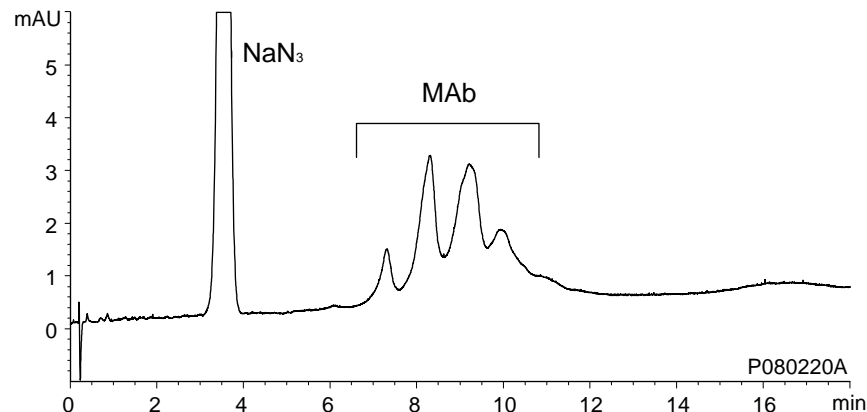
YMC-Pack Diol-200 5 μ m, 300 X 4.6 mm I.D.



Eluent	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)
Flow rate	: 0.17 mL/min
Temperature	: ambient (25°C)
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 10 μ L
Sample	: a commercially available mouse monoclonal IgG1 (0.05 mg/mL) (purified by DEAE chromatography, containing NaN ₃)

IEC

YMC-BioPro QA-F 5 μ m, 30 X 4.6 mm I.D.



Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl 10-25%B (0-18 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 10 μ L
Sample	: a commercially available mouse monoclonal IgG1 (0.1 mg/mL) (purified by DEAE chromatography, containing NaN ₃)

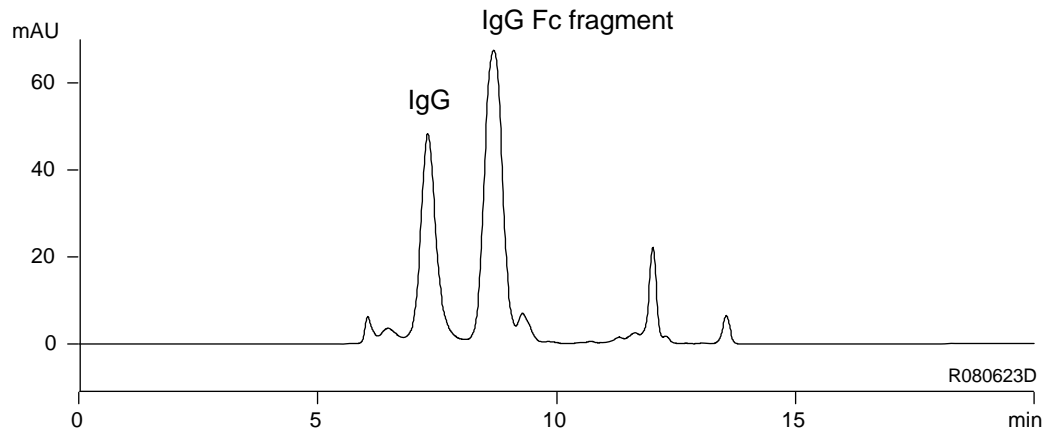
※MAb = Mouse monoclonal IgG1 (Anti-human IgG4)

DEAE精製後のMAb (IgG) は、サイズ排除ではほぼ単一のピークに、イオン交換ではアイソフォームに由来すると考えられる複数のピークに分離しています。

IgGおよびそのフラグメント サイズ排除と逆相の比較

SEC

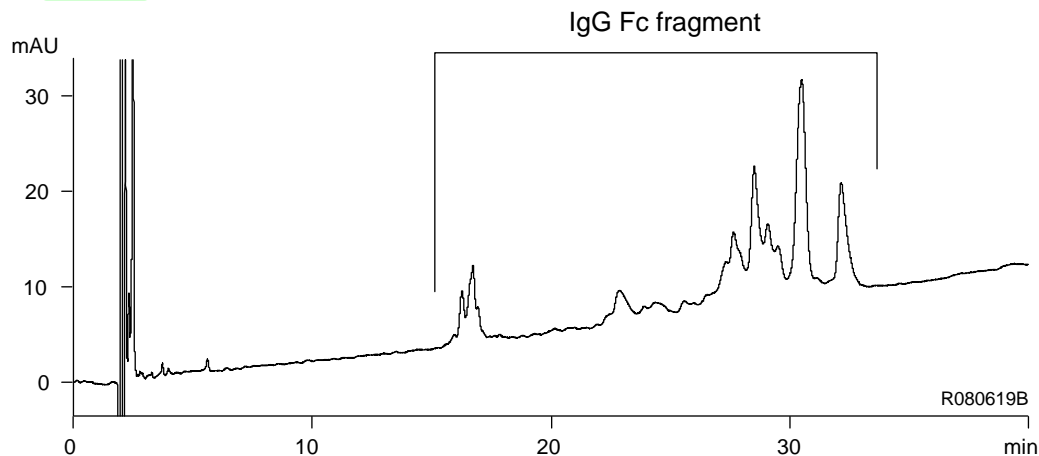
YMC-Pack Diol-200 5 μ m, 300 X 8.0 mmI.D.



Eluent	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 6.9) containing 0.2 M NaCl
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: ambient (27°C)
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 5 μ L (0.5 mg/mL)

RP

YMC-Pack C4 (30 nm) 5 μ m, 150 X 4.6 mmI.D.



Eluent	: A) water / TFA (100/0.1) B) acetonitrile / TFA (100/0.1) 25-45%B (0-40 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 37°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 5 μ L (1.0 mg/mL)

IgGとそのフラグメントのように分子量に差があるサンプルではサイズ排除が有効です。
逆相ではIgGフラグメントの高分解能分析が可能です。