

Application News

No.L452A

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

蛍光検出器 RF-20Axs を用いた 抗体医薬品の高感度糖鎖プロファイリング

High Sensitivity Profiling of Glycans in Antibody Drugs Using RF-20Axs

抗体医薬品中の糖鎖は、抗原性、体内動態、高次構造の安定性等に関与することや、医薬品の安全性・有効性に影響を及ぼす可能性があることなどが知られています。また、抗体医薬品の培養条件の変動によって糖鎖が不均一になることも懸念されており、これら糖鎖を生産工程で管理する必要性が高まりつつあります。現段階では日本薬局方に糖鎖に関連する試験法は収載されていませんが、評価手法については広く求められています。

ここでは超高速液体クロマトグラフ “Nexera X2” と高感度蛍光検出器 “RF-20Axs” を用いて、抗体医薬品中の糖鎖を分析した例をご紹介します。カラムには、Core-Shell 型高速分析用カラム “Aeris™ PEPTIDE XB-C18” を用いました。このカラムはペプチドのような高分子化合物の分析において充填剤への浸透性が最適化されているため、抗体医薬品に含まれる糖鎖や夾雑成分の分離に有効です。

A. Nomura T. Yamaguchi Y. Sato *

※ SHIMADZU GLC Ltd.

■糖鎖分析における検出器の感度と直線性 Sensitivity and Linearity of the Detectors in PA-Glycan Analysis

PA 化糖鎖 (PA-Sugar Chain009 タカラバイオ株式会社製) を用いて、蛍光検出器 “RF-20Axs” の感度と直線性を確認しました。分析条件を Table 1 に示します。

Fig. 1 には蛍光検出器 “RF-20Axs” と従来機 “RF-10Axl” を直列に接続し、PA 化糖鎖 10 fmol (5 nmol/L, 2 μ L 注入) 分析における検出器間の感度比較を行いました。蛍光検出器 “RF-20Axs” はノイズが低く、良好な S/N が得られることが示されました。Fig. 2 には蛍光検出器 “RF-20Axs” を用いて 1 ~ 100 fmol (0.5 ~ 50 nmol/L, 2 μ L 注入) の検量線結果を示しました。

これらの結果から蛍光検出器 “RF-20Axs” はメインピーク以外の微量不純物の確認にも適していることが示されました。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Instrument	: Nexera X2
Column	: Shim-pack XR-ODS III (50 mm L. $\times$ 2.0 mm I.D., 1.6 μ m)
Mobile Phase*	: A) 20 mmol/L Ammonium Formate 0.0095% (v/v) Formic Acid-Water (pH 4.5) B) 20 mmol/L Ammonium Formate 0.0095% (v/v) Formic Acid-Methanol A/B=95/5 (v/v)
Flow Rate	: 0.5 mL/min
Column Temp.	: 40 $^{\circ}$ C
Detection	: RF-20Axs (Ex = 320 nm, Em = 400 nm)
Injection Vol.	: 2 μ L

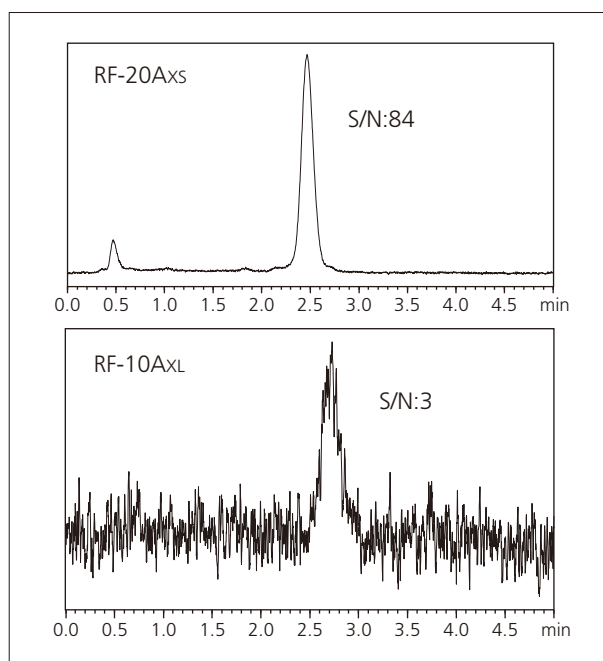


Fig. 1 PA 化糖鎖 10 fmol のクロマトグラム
Chromatograms of 10 fmol PA-Glycan

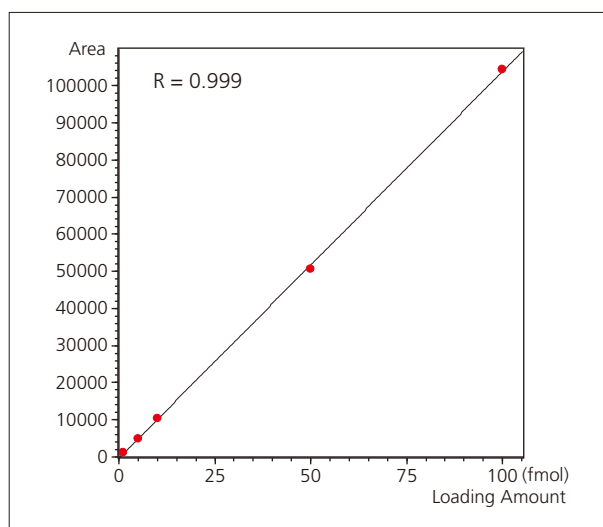


Fig. 2 検量線 (1~100 fmol 注入)
Calibration Curve (1 - 100 fmol Injected)

※移動相調製方法

ギ酸アンモニウム (M.W.: 63.026) 1.26 g (20 mmol) を 1 L の精製水もしくはメタノールに溶解し、ギ酸 95 μ L を添加して調製した。

■抗体医薬品（製剤）の糖鎖分析

Analysis of Glycans in Antibody Drugs

Fig. 3 の前処理手順に沿って 2 種類の抗体医薬品（製剤）から糖鎖を切出し、精製した後、PA 化（ピリジルアミノ化）により糖鎖を蛍光誘導体化しました。

Fig. 4 には抗体医薬品（製剤）のクロマトグラムを、Table 2 にはその分析条件を示します。抗体医薬品 A と B を比較した結果、約 50 分のピーク※（糖鎖）の含有量において抗体医薬品 A の方が多いことが分かりました。また、レスポンスが異なるピークが多数あることが確認されました。

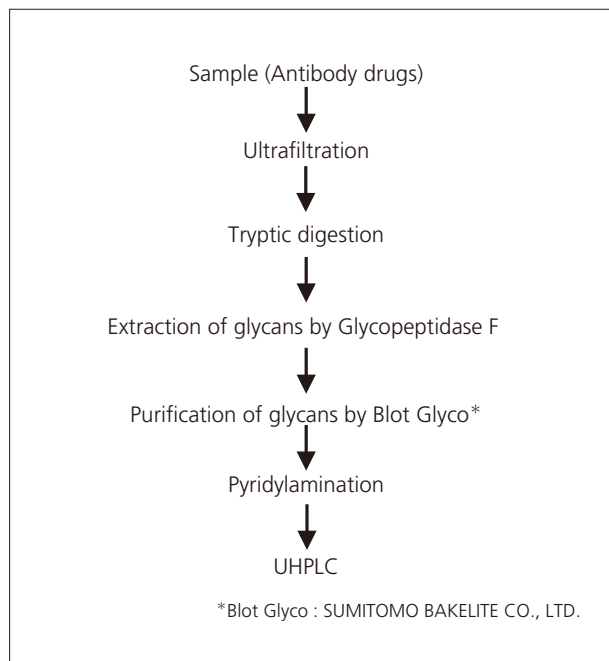


Fig. 3 試料前処理
Sample Preparation

抗体医薬品中の糖鎖の分析は、静岡県立大学 薬学部 生体機能分子分析学分野 轟木堅一郎先生にご協力いただきました。

Aeris™ カラムについての詳細は下記までお問い合わせください。

株式会社 島津ジーエルシー

TEL 03-5835-0126, gsupport@glc.shimadzu.co.jp

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Instrument	: Nexera X2
Column	: Aeris™ PEPTIDE XB-C18 (150 mm L. × 2.1 mm I.D., 1.7 μm)
Mobile Phases	: A) 20 mmol/L Ammonium Formate 0.0095 % (v/v) Formic Acid-Water (pH 4.5) B) 20 mmol/L Ammonium Formate 0.0095 % (v/v) Formic Acid-Methanol
Time Program	: B Conc. 0 % (0 min) → 5 % (60 min) → 10 % (70 min) → 100 % (70.01 min → 80 min) → 0 % (80.01 min → 90 min)
Flow Rate	: 0.4 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: RF-20Axs (Ex = 320 nm, Em = 400 nm)
Injection Vol.	: 3 μL

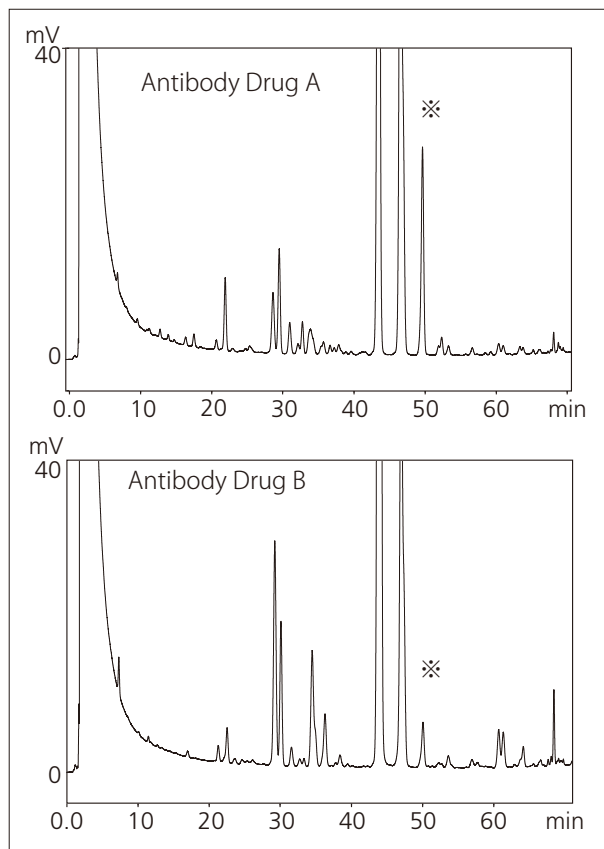


Fig. 4 抗体医薬品中の PA 糖鎖のクロマトグラム
Chromatograms of PA-Glycans from Antibody Drugs

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

A改訂版発行：2013年12月
初版発行：2013年7月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。

3100-12302-525-1K
2013.12