

Application News

No. L452A

高效液相色谱
High Performance Liquid Chromatography

使用荧光检测器 RF-20Axs 对抗体药物进行高灵敏度糖链分析

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

抗体药物中的糖链对抗原性、生物活性、高级结构的稳定性均有很大的影响，因此直接关系到药品的安全性和有效性。由于培养工艺条件的变化会导致抗体药物中的糖链分布不均匀，所以在生产阶段对糖链的管理非常重要。现阶段虽然在日本药典中并未收录糖链的测定方法等内容，但在相关领域有关于介绍测定方法的需求。

本文为您介绍使用超快速液相色谱仪“Nexera X2”和高灵敏度荧光检测器“RF-20Axs”对抗体药物中的糖链进行分析的方法。该测定方法使用了 Core-Shell 型快速分析液相色谱柱“Aeris™ PEPTIDE XB-C18”。因为该色谱柱用于分离分子量较小的肽或进行肽图分析，所以可有效分离抗体药物中所含的糖链与杂质。

糖链分析中检测器的灵敏度与线性

Sensitivity and Linearity of the Detectors in PA-Glycan Analysis

使用 PA 化糖链 (PA-Sugar Chain009 Takara Bio 株式会社生产)，确认了荧光检测器“RF-20Axs”的灵敏度与线性。表 1 中显示其分析条件。

图 1 为使用荧光检测器“RF-20Axs”和旧机型“RF-10Axl”，对 PA 化糖链 10 fmol (注入 5 nmol/L, 2 μL) 分析中的灵敏度进行比较的谱图。结果显示，荧光检测器“RF-20Axs”的噪音较低，并能取得良好的 S/N。图 2 为使用荧光检测器“RF-20Axs”，1~100 fmol (注入 0.5~50 nmol/L, 2 μL) 的标准曲线。

由图可知，荧光检测器“RF-20Axs”也适合测定主成分以外的微量杂质。

表 1 分析条件
Analytical Conditions

| | |
|----------------|--|
| Instrument | : Nexera X2 |
| Column | : Shim-pack XR-ODS III (50 mm L. × 2.0 mm I.D., 1.6 μm) |
| 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) |
| Flowrate | : 0.5 mL/min |
| Column Temp. | : 40°C |
| Detection | : RF-20Axs (Ex = 320 nm, Em = 400 nm) |
| Injection Vol. | : 2 μL |

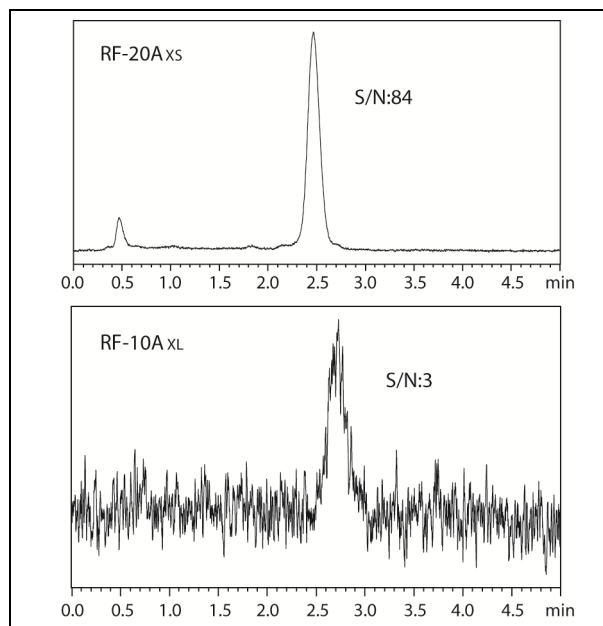


图 1 PA 化糖链 10 fmol 的色谱图
Chromatograms of 10 fmol PA-Glycan

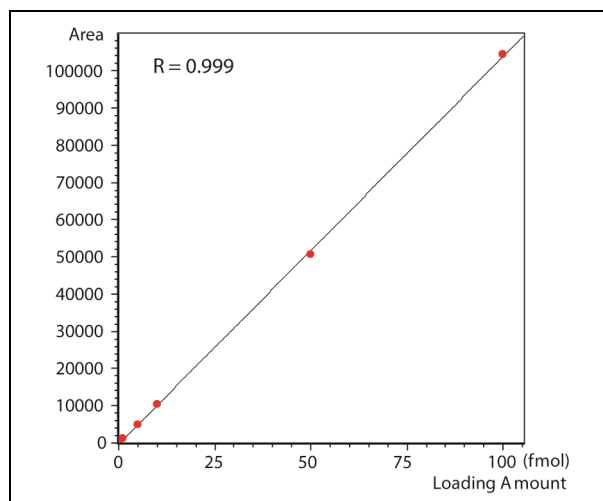


图 2 标准曲线 (注入 1~100 fmol)
Calibration Curve (1-100 fmol Injected)

* 流动相的制备方法

将甲酸铵 (M.W.: 63.026) 1.26 g (20 mmol) 溶于 1 L 纯化水或甲醇后，添加 95 μL 甲酸制备。

■ 抗体药物（制剂）的糖链分析

Analysis of Glycans in Antibody Drugs

按照图 3 的预处理步骤，从 2 种抗体药物（制剂）中萃取糖链，并对糖链进行荧光标记（PA 化）。生成的糖链氨基吡啶衍生物（PA-糖链）为稳定的荧光诱导体，检测灵敏度高。

图 4 为抗体药物（制剂）的色谱图，表 1 为其分析条件。对在 50 分钟处的峰（标有※号）进行比较可知，抗体药物 A 的糖链含量高于抗体药物 B，同时还可以确认到存在很多不同响应的峰。

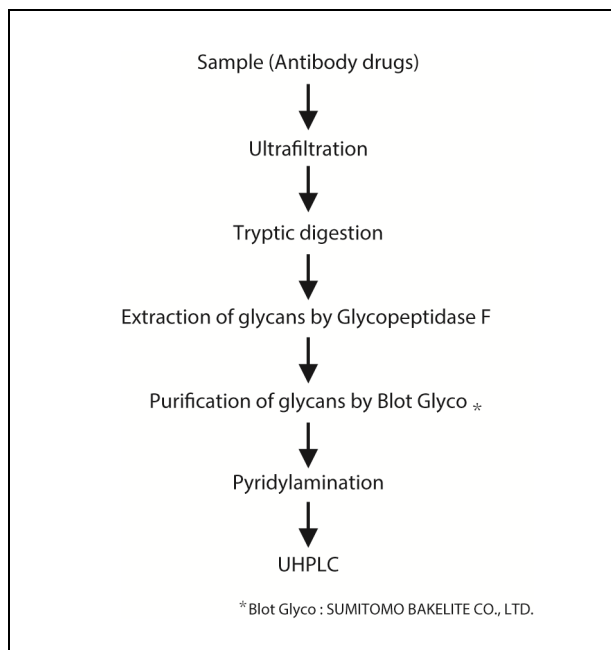


图 3 样品预处理
Sample Preparation

抗体药物中的糖链分析得到了静冈县立大学 药学部 生物功能分子分析学领域 轰木坚一郎老师的协助。

有关 Aeris™ 色谱柱的具体情况请按以下联系方式咨询。

株式会社 Shimadzu GLC

TEL +81-3-5835-0126, gsupport@glc.shimadzu.co.jp

表 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 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 |
| 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) |
| Flowrate | : 0.4 mL/min |
| Column Temp. | : 40°C |
| Detection | : RF-20Axs (Ex = 320 nm, Em = 400 nm) |
| Injection Vol. | : 3 μL |

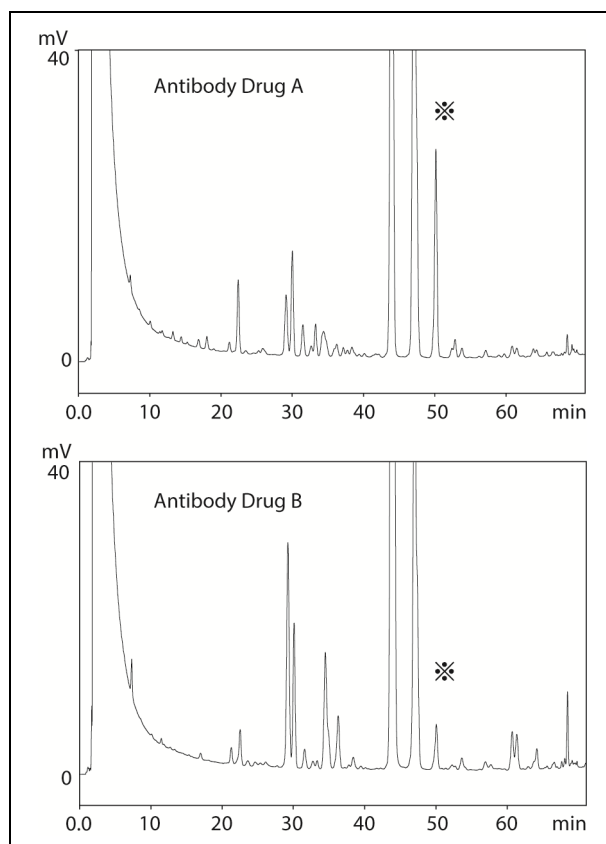


图 4 抗体药物中 PA 化糖链的色谱图
Chromatograms of PA-Glycans from Antibody Drugs