

# 糖化された抗体の分析はこれで決まり！

TSKgel Boronate-5PW で糖化(Glycation)抗体を分析



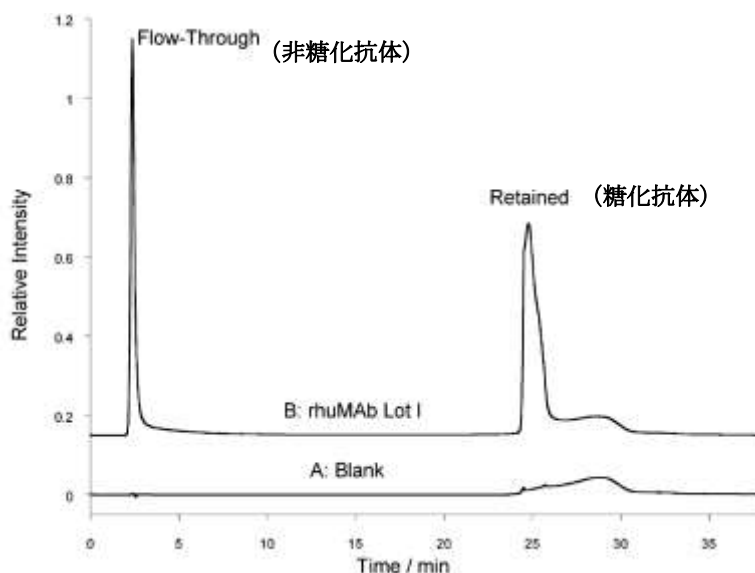
細胞培養で生産された抗体では、培養液中の単糖(グルコースなど)が、抗体のセリン残基やスレオニン残基に結合するグリコシル化(Glycosylation)やリジン残基などにシッフ塩基反応により結合する糖化(Glycation)が起こることが知られています。これらの単糖の付加は、抗体のFc部分のオリゴ糖鎖(グリカン構造)とは異なる性質のもので、抗体の薬効、生理活性等には直接関係はありません。しかしながら、糖付加などの翻訳後修飾を受けることで抗体の構造に不均一性を生じるため、抗体医薬品においては目的物質由来の不純物として分離し、その特性を詳細に解析する必要があります<sup>1,2)</sup>。

たんぱく質の糖化を分析する方法として、ジオールを持つ糖とホウ酸との結合を利用したアフィニティークロマトグラフィーがあります。ホウ酸化合物をリガンドとするアフィニティークラム TSKgel Boronate-5PW を用いた糖化抗体の分析が、バイオシミラー抗体も含め最近報告されています<sup>3)</sup>(裏面の文献リストもご参照ください)。

## 参考文献

- 1) M. Tanaka, 「医薬品候補ヒトモノクローナル抗体における翻訳後修飾解析: O-グルコシレーション」、薬剤学、75 (4) (2015) 203-214
- 2) 厚生労働省講習会「バイオ医薬品とバイオシミラーの基礎知識」2018, <https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000371617.pdf>
- 3) J. Mo et al., "Quantitative Analysis of Glycation and its Impact on Antigen Binding", MABS, 10(3), (2018) 406-415

## ●糖化されたモノクローナル抗体の TSKgel Boronate-5PW によるアフィニティークロマトグラフィー\*



カラム ; TSKgel Boronate-5PW (7.5 mm I.D. x 7.5 cm)

溶離液; 溶離液 A: 50 mmol/L EPPS, 10 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 0.05 % NaN<sub>3</sub> (pH 8.7)

溶離液 B: 溶離液 A + 500 mmol/L ソルビトール、 グラジエント: 溶離液 B: 0 % (0 - 20 分)、0→100 % (20 - 25 分)

流速 ; 1.0 mL/min

温度 ; 40 °C

検出 ; UV (280 nm)

試料 ; ヒトモノクローナル抗体

\* B. Zhang et al., Anal. Chem. 80 (2008) 2379-2390 (ACS Publications よりデータの使用許諾済)

糖化抗体は、TSKgel Boronate-5PW に吸着されますが、非糖化抗体はカラムに吸着されずに (Flow-Through) に溶出されます。このモノクローナル抗体では、58 %の抗体が糖化されていると報告されました。

## ● TSKgel Boronate-5PW を用いた糖化抗体の分析例

Authors	Title	Journal
J. Mo et al.	Quantitative analysis of glycation and its impact on antigen binding	mAbs (2018), VOL. 10, NO. 3, 406–415
H. Niu et al.	Uridine modulates monoclonal antibody charge heterogeneity in Chinese hamster ovary cell fed-batch cultures	Bioresources and Bioprocessing (2018) 5:42
K. Pisupati	Stability and structural analysis of hGH and infliximab for controlled release depots and biosimilars	Thesis (2016)
J. Visser et al.	Physicochemical and Functional Comparability Between the Proposed Biosimilar Rituximab GP2013 and Originator Rituximab	BioDrugs (2013) 27:495–507
H. Liu	Study of Glycation and Advanced Glycation on a Humanized Monoclonal Antibody	Thesis (2013)
L. A. Khawli et al.	Charge variants in IgG1 Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats	mAbs (2010) 2:6, 613-624; November/December
B. Zhang et al.	Two-dimensional liquid chromatographic methods to examine phenylboronate interactions with recombinant antibodies	J. of Chromatogr. A, 1216 (2009) 1216, 5676–5686
B. Zhang et al.	Unveiling a Glycation Hot Spot in a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody	Anal. Chem. (2008), 80, 2379-2390
C. Quan et al.	A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: Where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior	Analytical Biochemistry 373 (2008) 179–191

## ● TSKgel Boronate-5PW を用いたアフィニティークロマトグラフィーの注意点

- 溶離液； 塩基性のバッファーを 사용합니다。pH 8 前後のバッファーでは HEPES バッファーが適しています  
 ただシトリスなど塩基性バッファーや、アンモニウム系の塩を単一溶離液として使用しないでください  
 初期平衡化時間は十分に長く(10 CV 以上)とってください  
 糖化抗体の吸着が弱い場合には、溶離液に 20-50 mmol/L MgCl<sub>2</sub> を添加してください  
 温度； 分離には温度依存性がありますので、カラムオープンを用い一定温度で分析してください

## ● その他; 抗体の Fc 部分の糖鎖構造に依存した分離

抗体の糖鎖構造に依存した分離が可能な新規なカラムとして、**TSKgel FcR-IIIa-NPR®**があります  
 このカラムは抗体の糖鎖構造を認識しており、ADCC 活性および CDC 活性に相関のある抗体の分離が可能です

## ● TSKgel FcR-IIIa-NPR および TSKgel Boronate-5PW 製品のカラム一覧表

品番	品名	粒子径 (μm)	カラムサイズ	備考
0023513	TSKgel FcR-IIIa-NPR	5	4.6 mm I.D. x 7.5 cm	抗体のFc糖鎖構造による分離
0018014	ラインフィルタキット (PEEK®)	-	-	TSKgel FcR-IIIa-NPR用 (ガードカラムの代用)
0018021	ラインフィルタエレメント (PEEK)	-	-	ラインフィルタキット (PEEK) 補充用メンブラン
0013066	TSKgel Boronate-5PW	10	7.5 mm I.D. x 7.5 cm	糖化抗体の分離
0014449	TSKgel Boronate-5PW Glass	10	5.0 mm I.D. x 5 cm	糖化抗体の分離
0013125	TSKguardgel Boronate-5PW	-	6.0 mm I.D. x 1 cm	ガードホルダ、予備フィルタ10枚、ジョイント
0014451	TSKguardgel Boronate-5PW Glass	-	8.0 mm I.D. x 1 cm	ガードホルダ、予備フィルタ10枚、ジョイント



※ "TSKgel"、"NPR"は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2  
 大阪支店 バイオサイエンスG ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9  
 名古屋支店 バイオサイエンスG ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7  
 福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2  
 仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1  
 カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川12743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>  
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>  
 お問い合わせE-mail [hlc@tosoh.co.jp](mailto:hlc@tosoh.co.jp)

