



細胞株スクリーニング用カラムはこれで決まり！

細胞培養液中の抗体を糖鎖の違いでパターン分析； TSKgel FcR-IIIa-NPR®

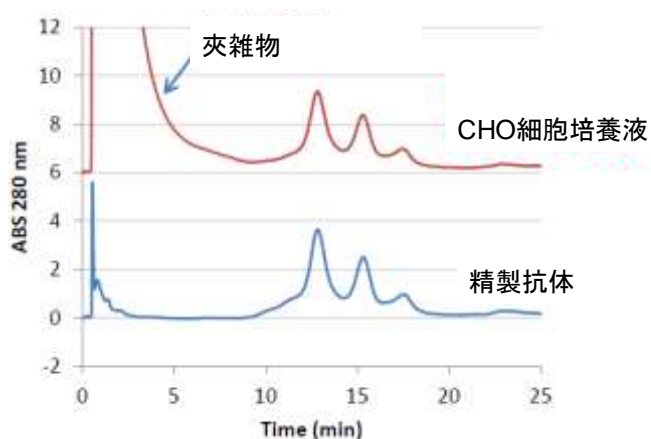
モノクローナル抗体医薬品の探索研究では、抗体の力価や抗体依存性細胞傷害 (ADCC) に関して細胞株 (セルライン) のスクリーニングも重要です。ADCC 活性に関連した評価方法には、バイオアッセイのほか、表面プラズモン共鳴 (SPR) によるヒト IgG レセプター (FcγRIIIa など) との親和性測定、LC/MS による抗体糖鎖構造の解析などがありますが、いずれも非常に時間と労力がかかります。

これらの煩雑な評価分析法に代わり簡易かつ迅速な分析を可能にするのが HPLC 用カラム TSKgel FcR-IIIa-NPR (FcR カラム) です。FcR カラムは、細胞培養液を前処理することなく測定することが可能です。モノクローナル抗体の多くは、主に 3 つの溶出ピークを示し、糖鎖の末端ガラクトースの数が多いほどカラムへの保持が強く、ADCC 活性が高いことが報告されています¹⁾⁻⁵⁾。

参考文献

- 1) M. Kiyoshi et al., Assessing the Heterogeneity of the Fc-Glycan of a Therapeutic Antibody Using an Engineered FcγReceptor IIIa-immobilized Column, Scientific Reports, 2018, 8:3995
- 2) R. Wada et al., Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms, MAbs. 2019 Feb/Mar; 11(2):350-372.
- 3) Tosoh Bioscience, Characterization of TSKgel FcR-IIIa-NPR HPLC Column by Top Down Mass Spectrometry, LCGC North America, 37(2) (2019) p142-144
- 4) Xie L, Zhang E et al., Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin® with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. BioDrugs. 2020 Feb 18. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40259-020-00407-0>
- 5) H. Kosuge et al., Highly sensitive HPLC analysis and biophysical characterization of N-glycans of IgG-Fc domain in comparison between CHO and 293 cells using FcγRIIIa ligand, Biotechnologies Progress. 2020; e3016, <https://doi.org/10.1002/btpr.3016>

●FcR カラムによる CHO 細胞培養液中のモノクローナル抗体の分離



<測定条件>

カラム； TSKgel FcR-IIIa-NPR (4.6 mm I.D. x 7.5 cm)
 溶離液； バッファー A: 50 mmol/L クエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5) +150 mmol/L NaCl
 バッファー B: 50 mmol/L クエン酸ナトリウムバッファー (pH 4.5) +150 mmol/L NaCl
 リニアグラジエント； バッファーB: 0% (0-7 min)
 バッファーB: 0-100% (7-25 min)
 バッファーB: 100% (25-30 min)

流速； 1.0 mL/min
 検出； UV (280 nm)
 温度； 25 °C

試料； モノクローナル抗体 (細胞培養液および精製品)

※溶離液には 150 mmol/L NaCl を添加することで細胞培養液中の抗体と夾雑物の分離が向上します

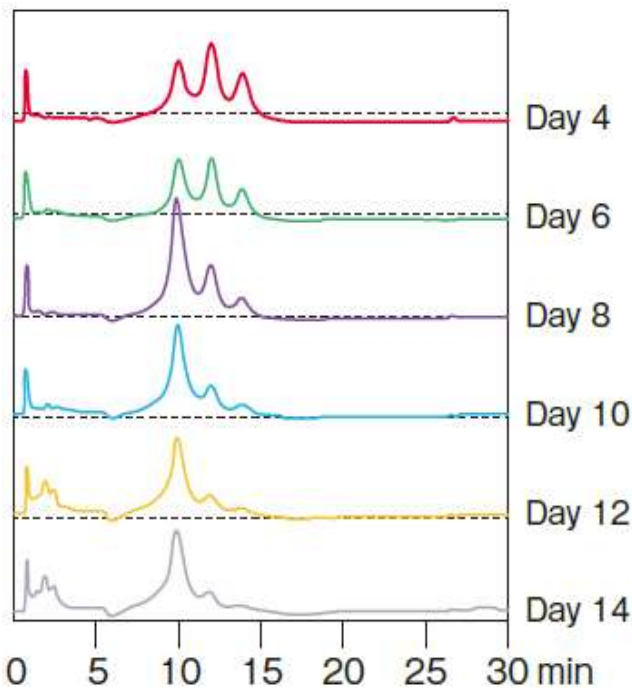
●主な分析用途 (クロマトパターンによる抗体の糖鎖構造変化の確認)

- ・細胞株 (セルライン) の違い (CHO 細胞、HEK 細胞など) における抗体の糖鎖構造変化の確認
- ・多数の細胞株スクリーニングにおける抗体の糖鎖構造変化の確認
- ・細胞培養培地の添加試薬の最適化検討における抗体の糖鎖構造変化の確認
- ・細胞培養時の培養日数と抗体糖鎖構造の経時変化の確認
- ・細胞培養容量のスケールアップ (培養法などの変更) 時における抗体の糖鎖構造変化の有無の確認

● バイオシミラー抗体の細胞培養日数が糖鎖構造の変化に与える影響

培養中の細胞培養液から適宜サンプリングを行い、プロテイン A 充填剤で抗体を粗精製した後、FcR カラムで測定しました。結果を以下の図に示します。培養日数が長くなるにつれて、抗体の 3 つのピークの中で溶出の早いピークの比率が高くなる現象が確認できました。これは、細胞培養日数が長くなることで、細胞外に存在する糖鎖修飾酵素により、抗体の糖鎖の末端ガラクトースが切断され、保持が弱くなったと考えられます。抗体の糖鎖の末端ガラクトース数と ADCC 活性の間には相関性があることから、培養日数が長くなるにつれ、ADCC 活性の低い抗体成分の割合が高くなっていることが示唆されます。

このように FcR カラムを用いることで、細胞培養時の産生抗体の糖鎖の性状変化を簡便に測定、モニタリングすることが可能です。



<測定条件>

カラム ; TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. x 7.5 cm)
 溶離液 ; バッファー A: 50 mmol/L クエン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5)
 バッファー B: 50 mmol/L クエン酸ナトリウムバッファー (pH 4.5)
 リニアグラジエント (20 min、 バッファー B: 2-20 min)
 流速 ; 1.0 mL/min
 検出 ; UV (280 nm)
 温度 ; 25 °C
 試料 ; モノクローナル抗体、 5 µg
 培養開始後、一定期間経過後の CHO 細胞培養液を採取、
 フィルタろ過、プロテイン A 充填剤で簡易精製し測定

細胞培養液試料は、次世代バイオ医薬品製造技術組合のご厚意によります

● TSKgel FcR-III A-NPR 製品一覧表

品番	品名	粒子径 (µm)	カラムサイズ	備考
0023513	TSKgel FcR-III A-NPR	5	4.6 mm I.D. x 7.5 cm	抗体のFc糖鎖構造の分析
0018014	ラインフィルタキット (PEEK)	-	-	TSKgel FcR-III A-NPR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



※本研究の一部は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の支援によって行われました。課題番号 : 2017 年度 : JP17ae0101003

※ "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2743-1

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