

TSKgel カラムを用いた抗体医薬品における糖鎖及び凝集体の分析

Analysis of glycans and aggregates in antibody drugs using TSKgel columns

抗体医薬品は、Fc 領域の糖鎖構造の違いにより薬効が大きく異なることが知られています。そのため、高品質の抗体医薬品を生産するには、糖鎖構造を制御する必要があります。加えて、免疫原性が懸念される凝集体の形成を最低限に抑えることも、抗体医薬品の高品質を維持するための重要なポイントとなります。そこで今回、3 種の TSKgel カラムを用いて培養日数の異なる細胞培養液上清中の抗体の糖鎖分析並びに凝集体分析を行い、培養日数が糖鎖構造、凝集体形成に与える影響を調べました。

抗体の精製には、多孔性の親水性ポリマー基材に遺伝子組換え Protein A を導入した充填剤を充填した高速・高精度 AFC カラム TSKgel Protein A-5PW を用いました。抗体の糖鎖分析には、TSKgel FcR-III A-NPR®を用いました。このカラムは、Fc 受容体の一つである FcγR11a をリガンドとして導入したもので、抗体の N-結合型糖鎖に起因する Fc 領域の構造変化を識別して ADCC 活性の異なる抗体を分離することが可能です。抗体の凝集体分析には、粒子径が 2 μm の高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW3000-LS を用いまし

た。装置は株式会社島津製作所製の Nexera™ XS inert 及びリキッドハンドラー(LH-40)を用い、細胞培養上清をサンプルカップにセットした後、抗体精製から複数モードでの分析までの一連の操作を全自動で連続して行いました。

図 1 に培養日数 day 4、day 7、day 12 の抗体の精製クロマトグラムを示します。培養日数が長くなるほど抗体の産生量が増加する様子が観察されました。

TSKgel FcR-III A-NPR を用いた抗体の糖鎖分析では、一般に 3 本のピークが観察され、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC 活性)が高い成分は溶出の最も遅い Peak 3 として溶出します。今回の測定では、培養日数が長くなるにつれ Peak 3 の比率が減少していることがわかりました(図 2、図 4 左)。

TSKgel UP-SW3000-LS を用いた凝集体分析においては、培養日数が長くなるに従い、凝集体の割合が増加しました(図 3、図 4 右)。

今回用いた培養条件では、培養日数が長くなるにつれ抗体生産量は増加したものの、高活性の抗体の割合は減少しており、凝集体の割合も上昇したことがわかりました。

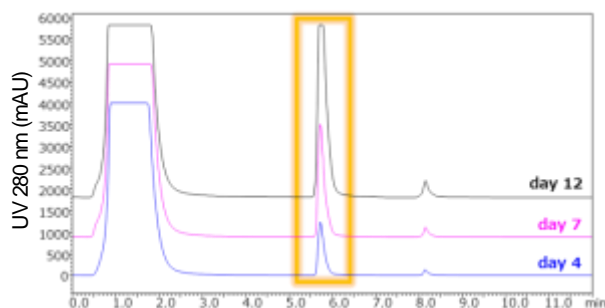


図 1 TSKgel Protein A-5PW を用いた抗体の精製

精製条件

Column	: TSKgel ProteinA-5PW (4.6 mm I.D x 3.5 cm)
Instruments	: Nexera XS inert + LH-40 (本システムの設置可能環境は 10 °C以上)
Temperature	: 20 °C
Injection vol.	: 500 μL
Mobile phase	: 20 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 7.4) : 20 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 2.5)
Gradient	: 0-3 min (B; 0%), 3-5 min (B; 100%)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Detection	: UV (280 nm) (SPD-M40, UHPLC inert cell)

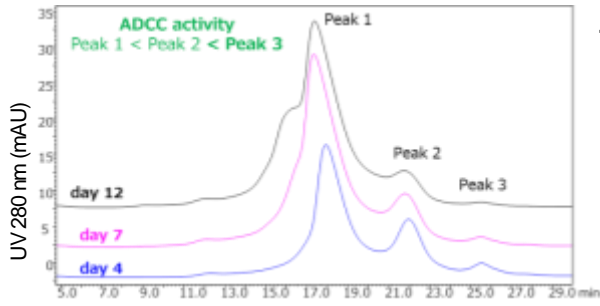


図2 TSKgel FcR-III A を用いた抗体の糖鎖分析

糖鎖分析条件

Column	: TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D x 7.5 cm)
Instruments	: Nexera XS inert + LH-40 (本システムの設置可能環境は 10 °C以上)
Temperature	: 20 °C
Injection vol.	: 40 μ L
Mobile phase	: 50 mmol/L sodium citrate buffer (pH 6.5) : 50 mmol/L sodium citrate buffer (pH 4.5)
Gradient	: 0-2 min B; 0 %, 2-32 min B; 0 %-100 %, 32-35 min B; 100 %
Flow rate	: 0.5 mL/min
Detection	: UV (280 nm) (SPD-M40, UHPLC inert cell)

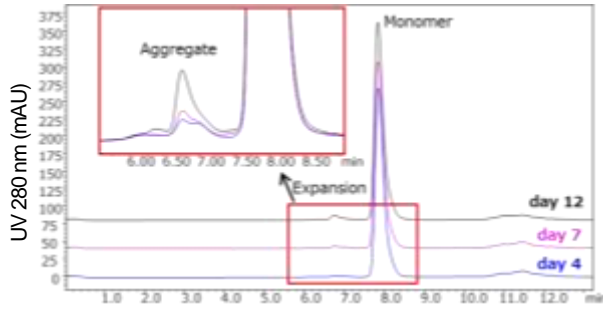


図3 TSKgel UP-SW3000-LS を用いた抗体の凝集体の分析

凝集体分析条件

Column	: TSKgel UP-SW3000-LS (4.6 mm I.D x 30 cm)
Instruments	: Nexera XS inert + LH-40 (本システムの設置可能環境は 10 °C以上)
Temperature	: 20 °C
Injection vol.	: 20 μ L
Mobile phase	: 20 mmol/L sodium phosphate buffer (pH 7.4) + 400 mmol/L sodium perchlorate
Flow rate	: 0.35 mL/min
Detection	: UV (280 nm) (SPD-M40, UHPLC inert cell)

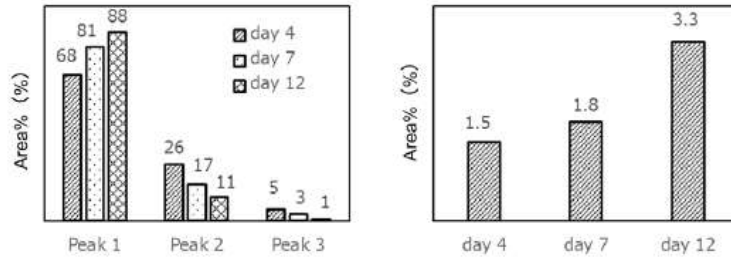


図4 糖鎖分析における各ピーク面積 %変化(左)及び凝集体分析における凝集体の面積 %変化(右)

品番	品名	リガンド/官能基	粒子径	カラムサイズ
0023483	TSKgel Protein A-5PW	組換え Protein A	20 μ m	4.6 mm I. D x 3.5 cm
0023513	TSKgel FcR-III A-NPR	組換え Fc γ RIIIa	5 μ m	4.6 mm I. D x 7.5 cm
0023546	TSKgel UP-SW3000-LS	ジオール	2 μ m	4.6 mm I. D x 30 cm

<謝辞>

本アプリケーションは東京大学 大学院工学系研究科 津本 浩平 教授、長門石 曉 准教授に多大なるご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

※ 本アプリケーションは、株式会社島津製作所との協業による成果です。

※ “TSKgel”、“NPR” は日本、米国、欧州共同体、中国等における東ソー株式会社の登録商標です。

※ “Nexera” は株式会社島津製作所またはその関係会社の日本および他の国における商標です。

※ 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) 6636-3733	〒104-0028 東京都中央区八重洲2-2-1
大阪支店 川村工場 ☎(06) 6209-1948	〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 川村工場 ☎(052) 211-5730	〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店 ☎(092) 710-6694	〒812-0011 福岡市博多区博多駅前3-8-10
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

お問い合わせe-mail tskgel@tosoh.co.jp

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>