

# Application News

Nexera™ XS inert, LH-40

## 抗体医薬品における糖鎖および凝集体評価の自動化

鈴木 里沙

### ユーザーベネフィット

- ◆ 抗体医薬品の前処理から分析までシームレスに連続分析可能です。
- ◆ 培養条件の最適化、細胞株の選定など、多検体のスクリーニングに最適です。
- ◆ 抗体医薬品など製造後の凝集体評価/チャージバリエーション評価などといった品質管理のルーチン作業も自動化可能です。

### はじめに

抗体医薬品は、高品質かつ高収率で製造することが求められています。これらを実現させるために、高発現可能な細胞株の選定や、凝集体形成・分解を最低限に抑える培養条件の最適化が行われています。また、糖鎖付加の違いにより抗体活性が異なることから、糖鎖付加モニタリングも最適化工程には重要な要素です。しかしながら、これらのスクリーニング評価は分析条件数やサンプルの種類が多く、注入回数が膨大になるため、手間の削減と自動化が求められています。また、凝集体評価法の1つとして、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) が挙げられますが、分析対象タンパク質が細胞培養上清中にある場合は、SEC分析の前に目的タンパク質を精製する前処理が必要です。このように品質評価のための分析には精製工程を要することからも自動化のニーズが高まっています。

そこで、オートサンプラーとフラクションコレクター機能を同一装置内に一体化したリキッドハンドラーを用い、前処理後に抗体の糖鎖付加および凝集体の両方の評価を行う自動分析系を構築しました (図1)。

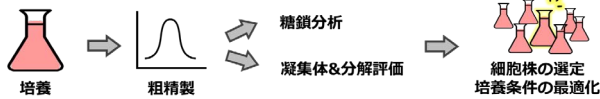


図1 実験の概要図

### 装置とサンプル情報

耐腐食性素材で構成されたポンプとイナートフローセルを用いたNexera XS inertを使用しました。また、サンプルの注入と分画には、オートサンプラーおよびフラクションコレクターが一体化したユニットのリキッドハンドラー (LH-40) を用いました (図2)。このユニットを用いることで、先の精製で分取したフラクションを、フラクションコレクターからオートサンプラーに移す作業が不要で、そのまま次の分析サンプルとして再注入することが可能です。



図2 Nexera™ XS inert & LH-40

サンプルは細胞培養日数の異なる抗体の培養上清 (day 4, day 7, day 12) をそのまま用い、粗精製から糖鎖解析および凝集体・分解評価を行いました。

図3は流路図を示しており、前処理としてTSKgel® ProteinA-5PWカラム (東ソー株式会社) で培養上清中のIgGを精製し、その溶出ピークをTSKgel FcR-IIIa-NPRカラム (東ソー株式会社) を用いて糖鎖付加状態を分析しました。TSKgel FcR-IIIa-NPRカラムは、遺伝子組換えヒトFcγレセプターIIIaをリガンドとして用い、抗体Fc領域のN-結合型糖鎖構造の違いを認識し、抗体のADCC活性に基づいて抗体を分離することが可能なカラムです。さらに、TSKgel UP-SW3000-LSカラム (東ソー株式会社) を用い、凝集体および分解物解析を行いました。

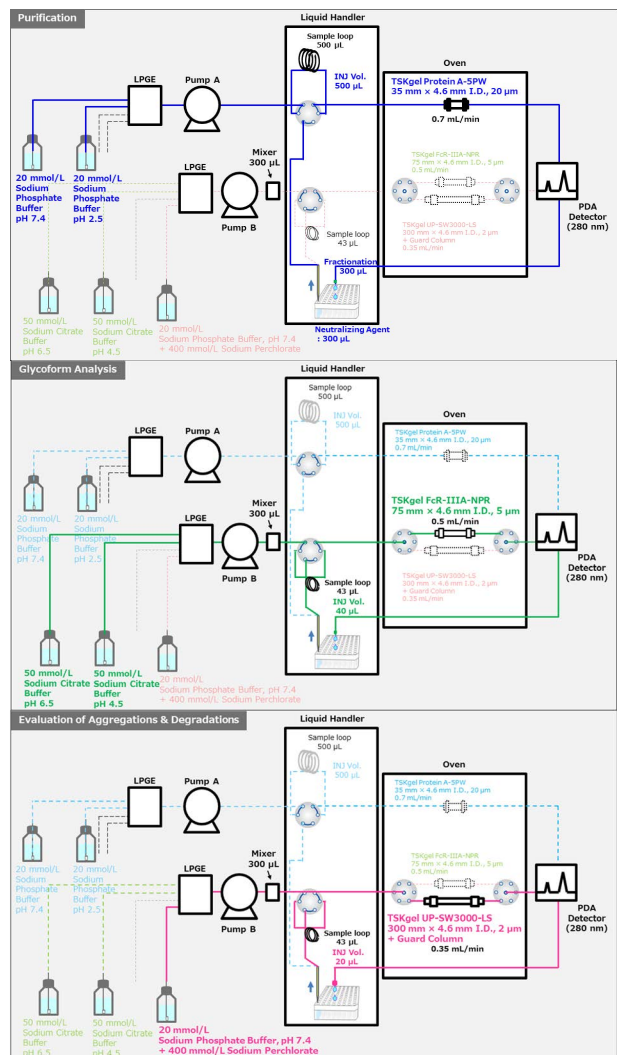


図3 前処理 (上)、糖鎖解析 (中)、凝集体・分解評価 (下) 時の各流路図

## ■前処理（抗体のProtein A 精製）

day 4, day 7, day 12の抗体の培養上清をそれぞれ500 μLずつ用い、表1の条件でTSKgel ProteinA-5PWカラムで粗精製しました（図4）。低pHで溶出しているため、分量と等量の中和剤を分画容器に入れておくことで、分取サンプルを中和しました。等量注入しているため、5.7 min付近に溶出されたIgGのピーク面積値の比較により、培養日数が多くなるほどIgGの産生量が増加していることが示されました。

表1 精製条件

System	: Nexera XS inert + LH-40
Column	: TSKgel ProteinA-5PW (35 mm×4.6 mm I.D., 20 μm)
Temperature	: 20 °C
Injection volume	: 500 μL
Mobile phase A	: 20 mmol/L (sodium) phosphate buffer (pH 7.4)
Mobile phase B	: 20 mmol/L (sodium) phosphate buffer (pH 2.5)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Time program (% B)	: 0% (0-3 min)→100% (3.01-5 min)→ →0% (5.01-12 min)
Detector	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

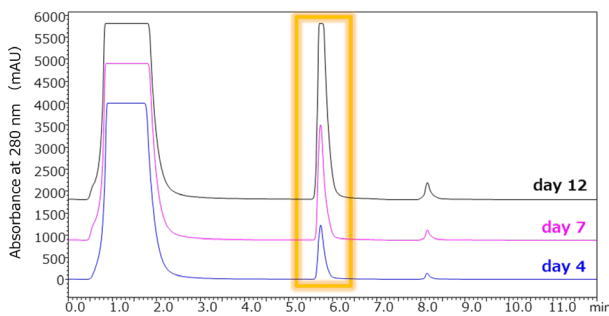


図4 各培養上清をTSKgel ProteinAカラムで精製したクロマトグラム

## ■糖鎖解析と凝集体・分解評価

Protein A精製して得られたピークトップが分画されたウェル（図4の黄色い枠内ピーク）から40 μLをTSKgel FcR-III A-NPRカラムに注入し、糖鎖解析を表2の条件で行いました（図5）。今回培養した抗体は、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）が高いほど抗体医薬品としての効果が高いと言われており、ADCC活性が高いことを示す糖鎖付加状態はPeak 3として溶出されることが知られています。Peak 3は培養日数の増加につれ比率が下がることが分かりました（図7左）。また、Peak 1のピーク形状が崩れる傾向が見られたことから、ガラクトース等が減少した低いADCC活性糖鎖が増加したと考えられます。

また、Protein A精製して得られたピークトップが分画されたウェル（図4の黄色い枠内ピーク）から20 μLをTSKgel UP-SW3000-LSカラムにて表3の条件で凝集体・分解評価を行いました（図6）。培養日数の増加に伴い、凝集体の割合が多くなること分かりました（図7右）。以上から、この培養条件ではday 4での回収が最適であることが示唆されました。

表2 分析条件

System	: Nexera XS inert + LH-40
Column	: TSKgel FcR-III A-NPR (75 mm×4.6 mm I.D., 5.0 μm)
Temperature	: 20 °C
Injection volume	: 40 μL
Mobile phase A	: 50 mM (sodium) citrate buffer (pH 6.5)
Mobile phase B	: 50 mM (sodium) citrate buffer (pH 4.5)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Time program (% B)	: 0% (~2 min)→0-100% (2-32 min)→ →100% (~35 min)
Detector	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

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その他の国における商標です。TSKgelは、東ソー株式会社の登録商標です。

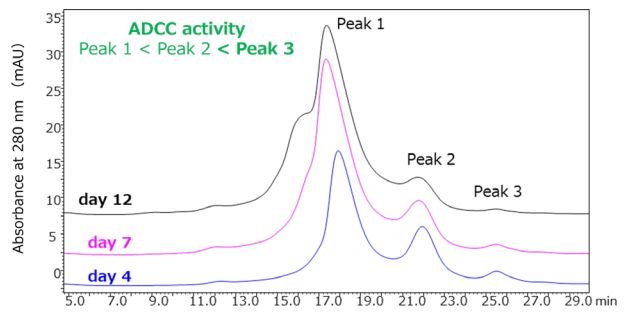


図5 TSKgel FcR-III Aカラムでの糖鎖解析クロマトグラム

表3 分析条件

System	: Nexera XS inert + LH-40
Column	: TSKgel UP-SW3000-LS (300 mm×4.6 mm I.D., 2.0 μm)
Temperature	: 20 °C
Injection volume	: 20 μL
Mobile phase (ISO)	: 20 mmol/L (sodium) phosphate buffer (pH 7.4) containing 400 mmol/L sodium perchlorate
Flow rate	: 0.35 mL/min
Detector	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

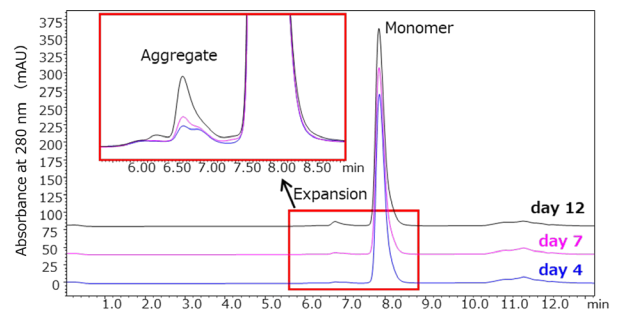


図6 SECカラムでの凝集体・分解評価クロマトグラム

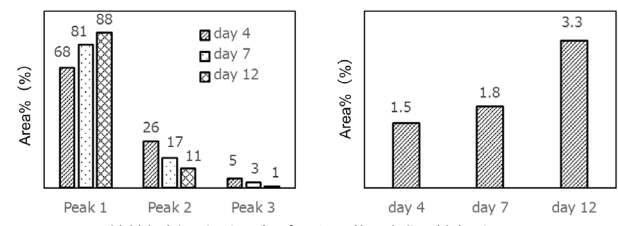


図7 糖鎖解析における各ピーク面積%変化（左）と凝集体・分解評価における凝集体増加の面積%推移（右）

## ■まとめ

Protein A精製の結果から、培養日数増加につれ抗体産生量は多くなりますが、糖鎖解析および凝集体・分解評価により、高活性の抗体の割合が減少し、凝集体の割合の増加がみられることから、day 4での回収が最適であることが示唆されました。

本検討を通じて、前処理のProtein A精製から、抗体の糖鎖付加評価および凝集体評価の一連の分析を、1培養条件あたり約2時間で自動分析可能な系を確立しました。

### <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 暁 准教授に多大なるご協力賜りました。心より感謝申し上げます。

- \* 本件は、東ソー株式会社との協業による成果です。
- \* 本システムの設置可能環境は10°C以上です（本データは室温下で取得しました）。
- \* 本システムはカラムにより構成が異なります。詳細は弊社営業までお問い合わせください。