

# ●抗体医薬品用アフィニティ分析カラム 「TSKgel® FcR-IIIa-NPR」の開発

バイオサイエンス事業部 第二開発部 セパレーションG

ライフサイエンス研究所 バイオプロセスG  
ライフサイエンス研究所

田中 亨  
村中 和昭  
寺尾 陽介  
井出 輝彦

## 1. はじめに

近年、ガンや自己免疫疾患の治療薬として抗体医薬品（図1）が広く利用されており、世界で11兆円もの市場を形成するとともに、年率10%以上の高い成長率で拡大している（2017年度<sup>1)</sup>。一方で、分子量15万の巨大分子である抗体医薬品は様々な修飾反応を経て多様な分子構造をとっていることが判明しており、医薬品の品質管理の観点からリスク因子と考えられるようになっている。特にFc領域に付加した糖鎖が薬効に大きく影響することが知られており<sup>2)</sup>、糖鎖構造が高度に制御された抗体医薬品が求められている。しかしながら、動物細胞培養により生産される抗体医薬品は基本的に多様な糖鎖構造の混合物となる上に、多くの製造工程パラメータが糖鎖構造に影響する<sup>3)</sup>。また、多項目の品質分析が必要とされるため、製造や品質管理に高度な技術と時間が必要とされている。

このような背景の下、当社では抗体医薬品の活性に関わるキー分子であるFcレセプター（FcR）に着目し、クロマトグラフィー用リガンドとして実用化するために安定化分子の創生や生産技術の構築を推進してき

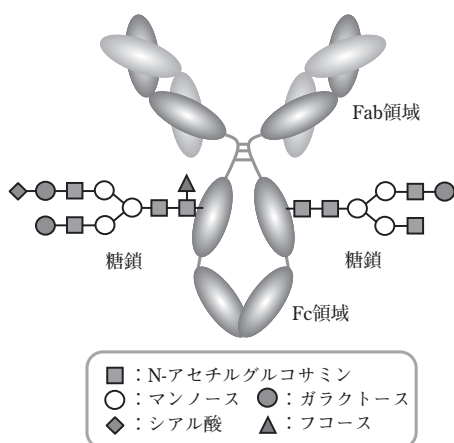


図1 抗体医薬品の構造

た<sup>4)</sup>。本稿では、これらの技術を利用して商品化した抗体医薬品向けアフィニティ分析カラム TSKgel FcR-IIIa-NPR の基本的特性と応用例について述べる。

なお、本商品は抗体医薬品の品質管理や品質向上に資するものであり、SDGsが定める国際目標の内、保健の項目（健康・長寿の達成）への貢献が期待できる。

## 2. 基本原理

抗体医薬品でガン等を治療する際には、抗体分子がターゲット細胞上の抗原に結合するだけでなく、細胞障害活性を有するエフェクター細胞を引き寄せる力が重要と考えられている。その際にキーとなる反応がエフェクター細胞上のFcRと抗体のFc部分の結合であり、特にナチュラルキラー細胞（NK細胞）上のFcγRIIIaが抗体依存性細胞障害活性（ADCC活性）の発現に重要とされている（図2<sup>5)</sup>。そして、Fc部分に結合した糖鎖の構造が本結合性に影響し、薬効にも影響を与えることが近年の数多くの報告によって明らかとなっている<sup>6), 7)</sup>。

このような作用機序を基に、新規な抗体医薬品分析手法としてFcRを利用したアフィニティクロマト法を開発した。すなわち、FcγRIIIaを担体の表面に固定したクロマトゲル（図3）を調製してカラムに充填し、抗体分子を親和性の違いによって分離することで、抗体医薬品の活性に基づいた成分分析が可能となる。

通常、抗体医薬品の糖鎖構造や活性分析には、煩雑

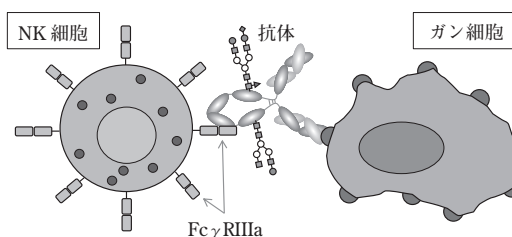
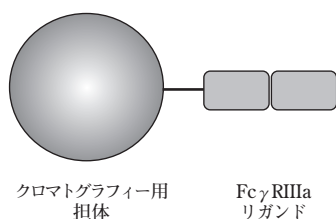


図2 抗体医薬品の作用（ADCC活性）模式図

図3 Fc $\gamma$ RIIIa 固定化ゲルの構造

な前処理、高価な分析装置や高度な技能が必要とされるが、TSKgel FcR-IIIa-NPR を用いたアフィニティクロマトグラフィー分析法は迅速性、簡便性、コストなど、多くの部分で優位性がある。

### 3. 基本的性質

#### [1] 充填剤の性質

TSKgel FcR-IIIa-NPR は、非多孔性の親水性ポリマー基材に、遺伝子組換えヒト Fc $\gamma$ RIIIa の細胞外領域をリガンドとして導入した充填剤を PEEK 製カラムに充填した HPLC 用カラムである。Fc $\gamma$ RIIIa リガンドは、天然型のアミノ酸配列に対して複数のアミノ酸置換を施して物理化学的安定性を向上させた分子を設計後、遺伝子組換え大腸菌により製造した。本カラムの仕様を表 1 に示す。HPLC 装置に関しては各社より販売されている 2 液グラジェントが可能なシステムであれば使用できるが、本分析はカラム温度が保持力に影響するため、カラムオープンによる温調下（指定温度：15℃～25℃）で測定する。

Fc $\gamma$ RIIIa リガンドはヒト抗体の Fc 領域に特異的に吸着するため、抗体医薬品として一般的なヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体の分析に使用できる。ま

た、Fc 融合タンパク質の分析も可能である。

#### [2] 標準的分離条件

多くの抗体は中性付近（pH 6.0～7.5）で Fc $\gamma$ RIIIa リガンドに吸着し、酸性条件下（pH 4.0～5.0）で溶出するため、TSKgel FcR-IIIa-NPR による抗体の分離には、通常、pH の異なる 2 液による pH グラジェント溶出法を用いる。

溶離液として種々の緩衝液が使用できるが、上記の pH 範囲で幅広い緩衝能を有するクエン酸緩衝液が好適である。一般的な CHO 細胞で作製したヒト IgG1 抗体を分析する場合、吸着用溶離液（溶離液 A）として 50 mM クエン酸緩衝液（pH 6.5）、溶出用溶離液（溶離液 B）として 50 mM クエン酸緩衝液（pH 4.5）が適している。また、それぞれの溶離液に無機塩を添加してイオン強度を向上させることで、非特異的な吸着の抑制が可能である。

図 4 に同一の抗体を FcR アフィニティクロマト、サイズ排除クロマト（SEC）および陽イオン交換クロマトによりそれぞれ分析したクロマトグラムを示す。一般的にサイズ排除クロマトは凝集体やフラグメントの分析に、イオン交換クロマトはチャージバリエーションの分析に汎用されているが、FcR アフィニティクロマトは従来手法とは全く異なる分析が可能である。

また、本カラムは抗体を選択的に吸着・分離することが可能であるため、不純物を多量に含む抗体溶液（例えば、CHO 細胞の培養上清など）を直接分析できる（図 5）。この様な分析を行う場合には非特異的な吸着を抑制するために 150 mM 程度の NaCl を溶離液に添加するとともに、不純物を素通りさせる十分な洗浄時間を設ける必要がある。図 5 に示す通り、不純物

表 1 TSKgel FcR-IIIa-NPR の仕様

品番	0023513	
充填剤	基材	非多孔性親水性ポリマー
	平均粒子径	5 $\mu$ m
	リガンド	改変型ヒト Fc $\gamma$ RIIIa（大腸菌生産）
カラム	サイズ	4.6 mm I.D. $\times$ 7.5 cm
	材質	PEEK
	出荷溶媒	0.025% ProClin 300+0.65 mM クエン酸+9.35 mM クエン酸三ナトリウム（pH6.5）
使用条件	pH 範囲	pH4.0～pH8.0（短期）、pH5.0～pH7.0（長期）
	温度	15℃～25℃
	適正流速	1.0 mL/min
	最大圧力損失	9.0 MPa
保管条件	出荷溶媒に置換し、冷蔵（2℃～8℃）	

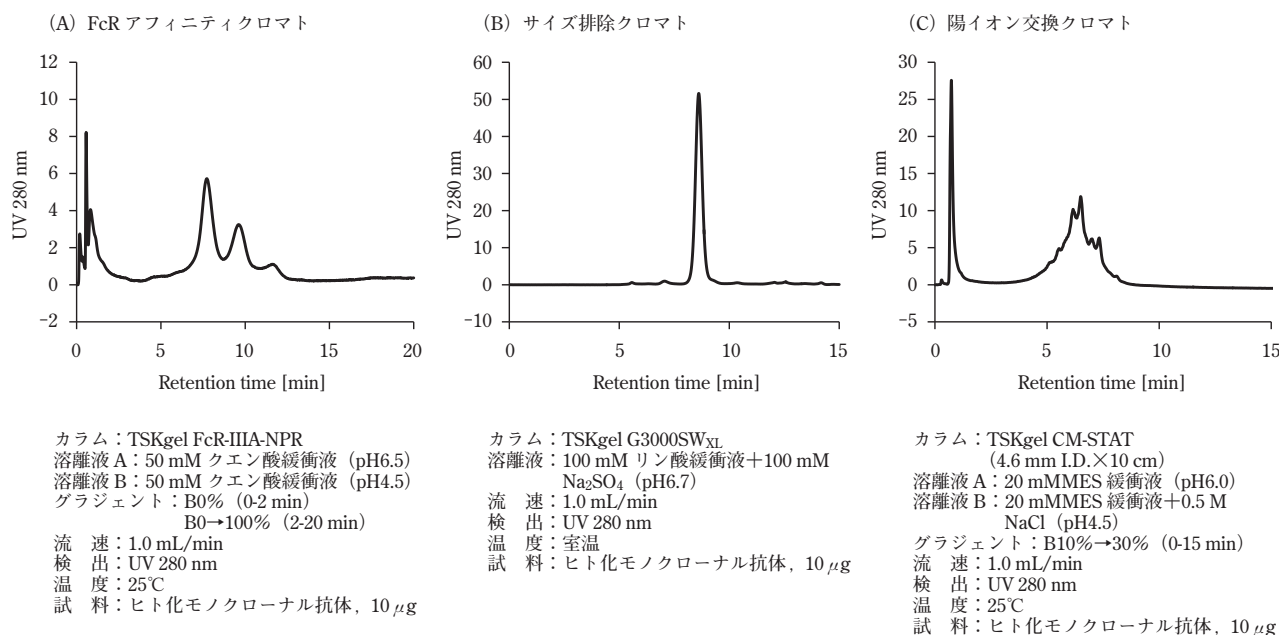
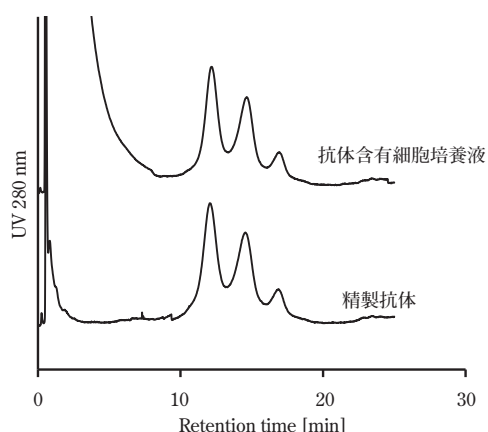


図4 FcR アフィニティクロマトと一般的なクロマト分析法の比較



カラム：TSKgel FcR-III A-NPR  
 溶離液 A：50 mM クエン酸緩衝液+0.15 M NaCl (pH6.5)  
 溶離液 B：50 mM クエン酸緩衝液+0.15 M NaCl (pH4.5)  
 グラジエント：B0% (0-7 min), B0→100% (7-25 min)  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV 280 nm  
 温度：20℃  
 試料：抗体含有細胞培養液, 精製抗体

図5 細胞培養液中の抗体分析

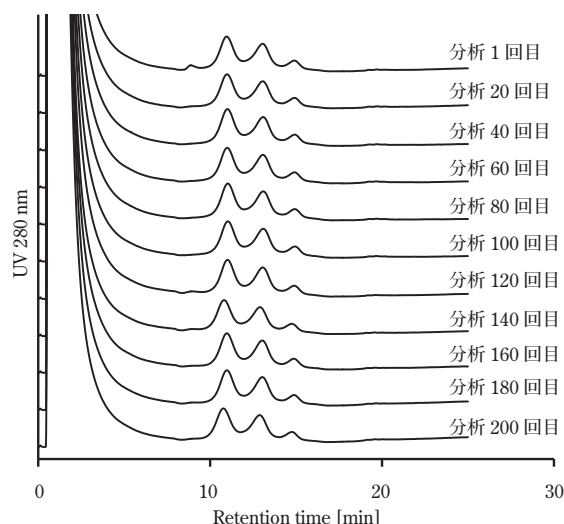
を含んでいても分離度を低下させることなく抗体の分析が可能であった。

### [3] 耐久性と保存安定性

TSKgel FcR-III A-NPR の耐久性を評価するため、モノクローナル抗体を含む CHO 細胞培養上清を試料として 200 回の連続分析試験を実施した (図 6)。分析 20 回毎にクロマトグラムを抽出し解析を行った結果、抗体保持時間や分離度に顕著な変化は観察されな

かった。これらの試験結果より、200 回以上の使用耐久性を確認できた。

また、長期保存安定性試験に関しては、所定の保存緩衝液でカラム内を置換後、保管温度 10℃ 条件下で実施した。評価項目として FcγRIIIa リガンドの結合活性を示す抗体保持力検査を行い、経時変化を追跡し



カラム：TSKgel FcR-III A-NPR  
 溶離液 A：50 mM クエン酸緩衝液+0.15 M NaCl (pH6.5)  
 溶離液 B：50 mM クエン酸緩衝液+0.15 M NaCl (pH4.0)  
 グラジエント：B0% (0-7 min), B0→100% (7-25 min)  
 B100% (25-30 min), B0% (30-35 min)  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV 280 nm  
 温度：20℃  
 試料：抗体含有細胞培養液

図6 TSKgel FcR-III A-NPR の使用耐久性

た(図7)。その結果、12ヵ月以上経過しても抗体結合活性が保持されていることを確認した。

#### [4] 製造再現性

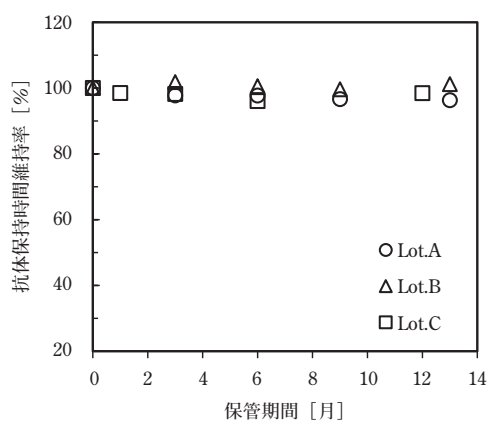
製造プロセスの再現性を評価するため、量産スケールにて3ロットのFc $\gamma$ RIIIa固定化ゲル試作を行い、それぞれカラムに充填してTSKgel FcR-IIIa-NPRを作製した。つづいて、機能を比較するためにヒトIgG1を分析し、得られたクロマトグラムを解析した(図8)。その結果、各ロットともに同様のピーク分離度と保持時間を示し、優れた製造再現性を確認した。

### 4. 応用例

#### [1] 抗体の分析例

TSKgel FcR-IIIa-NPRを用いて様々な抗体を分析した(図9)。CHO細胞にて調製した標準的なモノクローナル抗体では多くの場合3つのメインピークを与えるが、サンプルによってピーク面積比が大きく異なることがわかる。また、フコース付加型と脱フコース型のハーセプチン・バイオシミラーの分析例を見ると、脱フコース型の方が長保持時間となる傾向が観察された。一般的に、脱フコース型糖鎖を有する抗体は強いADCC活性を有していることが報告されており<sup>8), 9)</sup>、本知見と一致する分析結果が得られた。

続いて、市販されている抗体医薬品を2ロット入手してFcRアフィニティ分析を行ったところ、分離パ



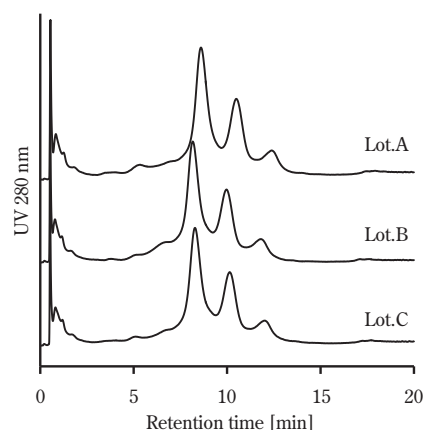
〈抗体保持力検査法〉  
カラム：TSKgel FcR-IIIa-NPR  
溶離液：50 mM クエン酸緩衝液 (pH5.1)  
流速：0.3 mL/min  
検出：UV 280 nm  
温度：25℃  
試料：ヒトガンマグロブリン, 20  $\mu$ g  
※第3ピークの保持時間を比較

図7 長期保存安定性

ターンの僅かな違いを検出した(図10)。この結果は市販の抗体医薬品にも糖鎖構造や活性にバラつきがあることを示唆しており、本カラムは抗体医薬品の品質管理に使用できるものと考えられる。

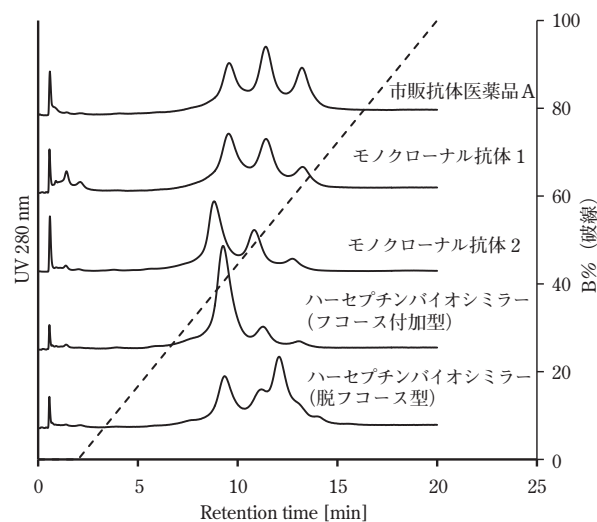
#### [2] 抗体糖鎖構造と保持力の相関

CHO細胞で調製したモノクローナル抗体分析時に



カラム：TSKgel FcR-IIIa-NPR  
溶離液 A：50 mM クエン酸緩衝液 (pH6.5)  
溶離液 B：50 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5)  
グラジエント：B0% (0-2 min), B0 $\rightarrow$ 100% (2-20 min)  
流速：1.0 mL/min  
検出：UV 280 nm  
温度：25℃  
試料：ヒト IgG1 (シグマ-アルドリッチ社製), 10  $\mu$ g

図8 量産試作品3ロットのクロマトグラム比較



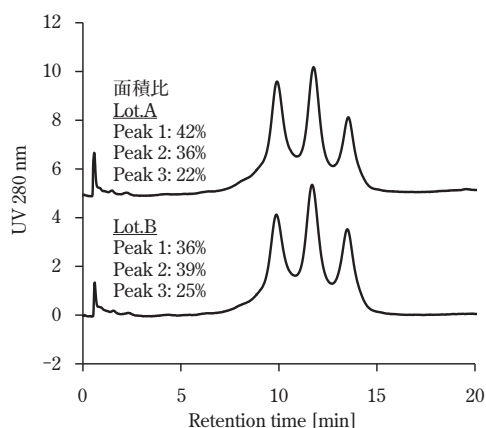
カラム：TSKgel FcR-IIIa-NPR  
溶離液 A：50 mM クエン酸緩衝液 (pH6.5)  
溶離液 B：50 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5)  
グラジエント：B0% (0-2 min), B0 $\rightarrow$ 100% (2-20 min)  
流速：1.0 mL/min  
検出：UV 280 nm  
温度：25℃  
試料：ヒト IgG1 (シグマ-アルドリッチ社製), 10  $\mu$ g

図9 抗体の分析例

表2 抗体医薬品の糖鎖構造と保持力の相関

糖鎖構造	略号	保持力	糖鎖構造	略号	保持力
	G0F	低い		Man5	低い
	G1F	高い		SG2F	高い
	G1F	低い		S2G2F	高い
	G2F	高い			

■：N-アセチルグルコサミン ○：マンノース  
●：ガラクトース ▲：フコース ◆：シアル酸



カラム：TSKgel FcR-IIIa-NPR  
 溶離液 A：50 mM クエン酸緩衝液 (pH6.5)  
 溶離液 B：50 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5)  
 グラジエント：B0% (0-2 min), B0→100% (2-20 min)  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV 280 nm  
 温度：25℃  
 試料：抗体医薬品 A, 10 μg

図10 市販抗体医薬品2ロットの比較

現れる3つのピークについて成分解析を行うため、大型のFcγRIIIaカラムを試作して抗体成分の分離を行い、それぞれ80%以上の純度で単離した。得られた抗体の糖鎖をN-グリカナーゼで切り出した後、ピリジルアミノ化により蛍光標識し、逆相HPLCにより糖鎖構造を分析した。得られた結果を解析したところ、G0F型糖鎖などを含む抗体は低保持力画分に多く溶出していた一方で、G2F型糖鎖などを含む抗体は高保持力画分に多く含まれていることが判明した。解析結果を表2に示す。この結果より、TSKgel FcR-IIIa-NPRが抗体の糖鎖の違いを認識し、その構造に基づ

いて分離していることを確認した。特に糖鎖末端に付加したガラクトースの有無が親和性に大きく影響していることが明らかとなった。また、TSKgel FcR-IIIa-NPRへの保持力とADCC活性の相関に関しては、高保持力画分ほど高活性であることを確認している<sup>10), 11)</sup>。

### 5. おわりに

本稿では、抗体医薬品向け新規アフィニティ分析カラムであるTSKgel FcR-IIIa-NPRの基本性能と応用例について報告した。従来、抗体医薬品の糖鎖構造解析や活性解析には高価な装置や煩雑な作業が必要であったが、本カラムを用いた新規分析法は、非常に簡便かつ短時間で再現性の良い結果を得ることができる。また、本カラムは抗体医薬品の品質管理用途だけでなく、生産用細胞株のスクリーニングや細胞培養液組成の最適化、培養工程の工程解析などにも利用可能と考えられ、抗体医薬品生産の高度化の一助となることを期待したい。

なお、本研究開発の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、及び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」の課題番号（JP17ae0101003）の支援によって行われた。

## 引用文献

- 1) 日経バイオテク、2018.8.27、37-47 (2018) ※報告データより著者集計
- 2) CMC Biotech Working Group, A Mab: A case study in bioprocess development, Version 2.1 (2009)
- 3) P. Hossler, S. F. Khattak, Z. J. Li, *Glycobiology*, 19 (9), 936-949 (2009)
- 4) 寺尾陽介、今泉暢、山中直紀、半澤敏、東ソー研究・技術報告、58、35-38 (2014)
- 5) R. A. Clynes, T. L. Towers, L. G. Presta, J. V. Ravetch, *Nat. Med.*, 6, 443-446 (2000)
- 6) G. Cartron, L. Dacheux, G. Salles, P. Solal-Celigny, P. Bardos, P. Colombat, H. Watier, *Blood*, 99 (3), 754-758 (2002)
- 7) R. Gennari, S. Menard, F. Fagnoni, L. Ponchio, M. Scelsi, E. Tagliabue, F. Castiglioni, L. Villani, C. Magalotti, N. Gibelli, B. Oliviero, B. Ballardini, G. D. Prada, A. Zambelli, A. Costa, *Clin. Can. Res.*, 10, 5650-5655 (2004)
- 8) R. L. Shields, J. Lai, R. Keck, L. Y. O'Connell, K. Hong, Y. G. Meng, S. H. A. Weikert, L. G. Presta, *J. Biol. Chem.*, 277, 26733-26740 (2002)
- 9) T. Shinkawa, K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, K. Uchida, H. Anazawa, M. Satoh, M. Yamasaki, N. Hanai, K. Shitara, *J. Biol. Chem.*, 278, 3466-3473 (2003)
- 10) 寺尾陽介、山中直紀、朝岡義晴、遠藤諭、田中亨、大江正剛、井出輝彦、東ソー研究・技術報告、61、33-41 (2017)
- 11) M. Kiyoshi, J. M. M. Caaveiro, M. Tada, H. Tamura, T. Tanaka, Y. Terao, K. Morante, A. Harazono, N. Hashii, H. Shibata, D. Kuroda, S. Nagatoishi, S. Oe, T. Ide, K. Tsumoto, A. Ishii-Watabe, *Sci. Rep.*, 8:3955 (2018)