

抗体医薬、ペプチド分析に適した生体試料 分析用液体クロマトグラフィーカラムの紹介

東ソー株式会社
バイオサイエンス事業部

1. バイオ医薬品市場動向
2. 抗体糖鎖認識FcR固定化分析カラム
3. SWシリーズ新カラムUP-SW
4. まとめ

TSKgel®シリーズ

- ・ HPLC用カラムを中心とする製品群
- ・ 800品種

TOYOPEARL®シリーズ

- ・ 分取クロマトグラフィー用充填剤
- ・ 160品種



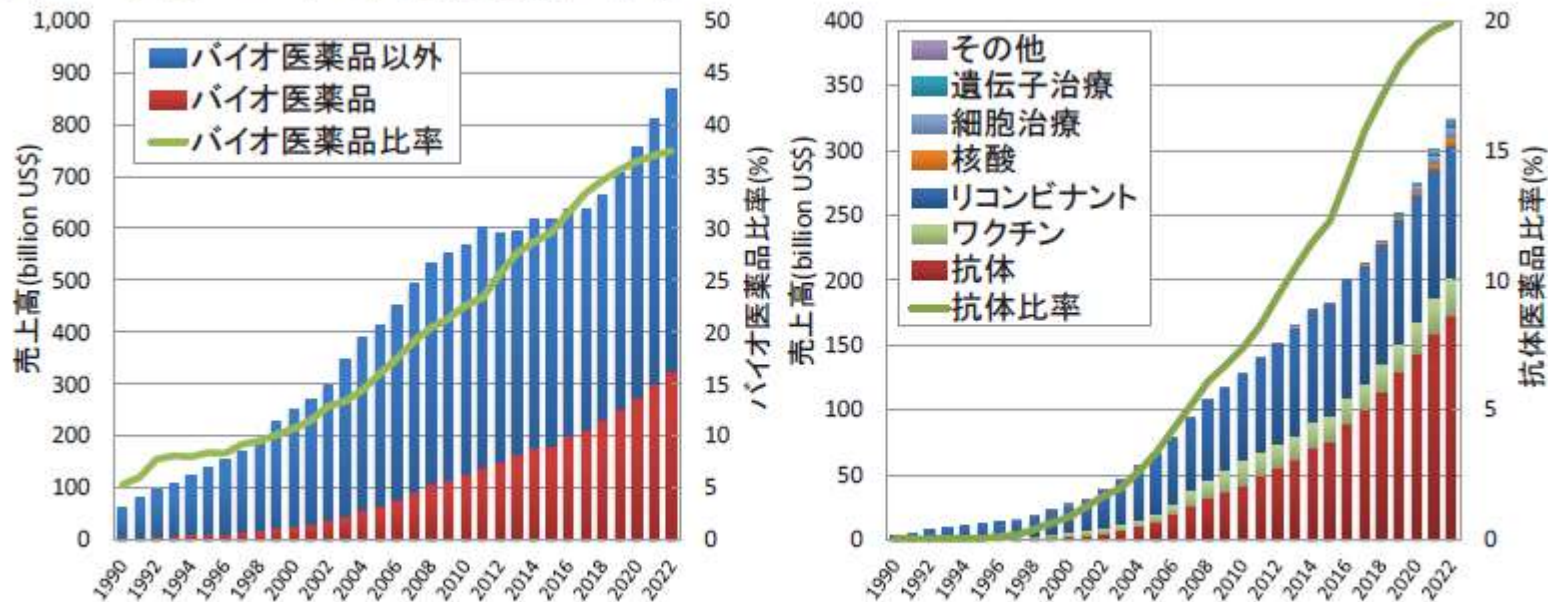
GPCシステム (HLC-8420GPC)



ICシステム (IC-2010)

バイオ医薬品市場

図 1 世界のバイオ医薬品市場の推移

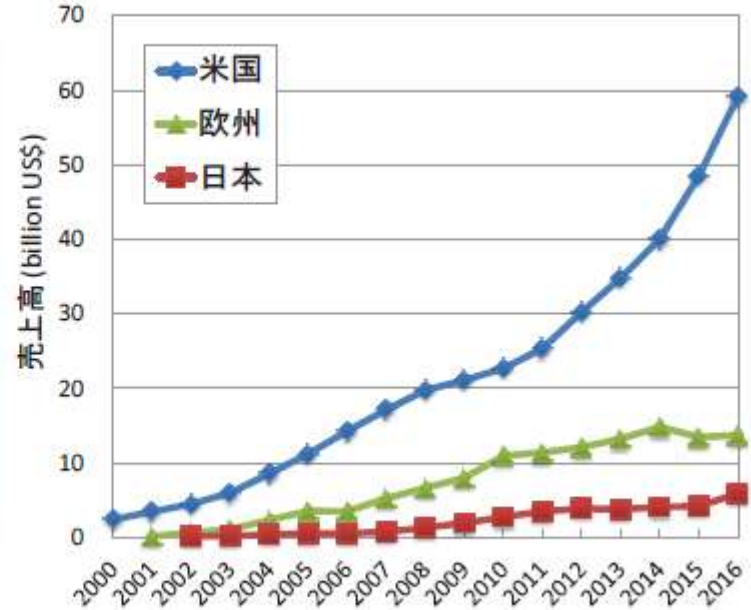
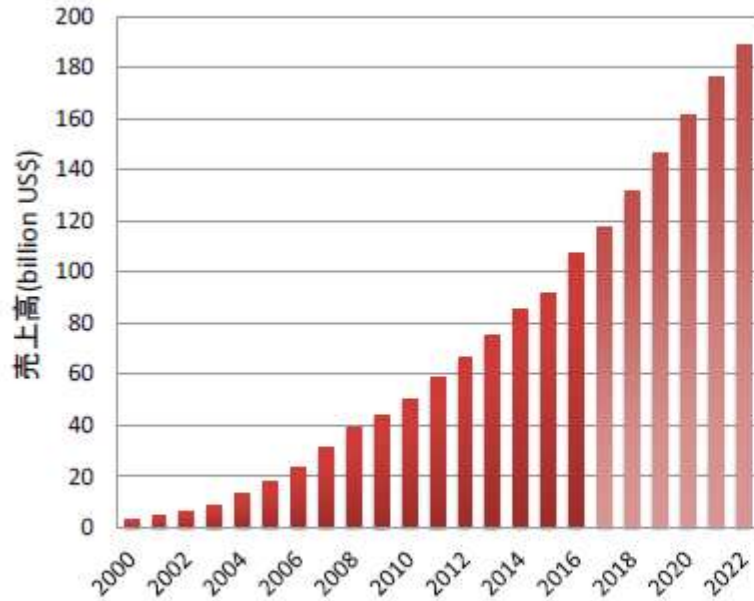


出所：EvaluatePharma をもとに作成

経済産業省：バイオ医薬品産業の課題と更なる発展に向けた提言より抜粋

バイオ医薬品市場

図 2 世界の抗体医薬品市場の推移



出所：EvaluatePharma をもとに作成

経済産業省：バイオ医薬品産業の課題と更なる発展に向けた提言より抜粋

モノクローナル抗体の「不均一性」

高次構造

凝集体形成

分解・断片化

ジスルフィド結合の誤り

UP-SW series

STAT, NPR, PW

N末端 Glu, Gln の環化
(Glu, Gln → pGlu)

Asn の脱アミド (Asn → Asp)
Asp の異性化 (Asp → isoAsp)

FcR-III A-NPR

N-結合型糖鎖の構造の違い

人為的な修飾 — 結合数, 結合部位
・抗体-薬物複合体 (ADC)
・PEG 修飾

Met の酸化

H鎖 C末端
Lys の欠失

STAT, NPR, PW

Butyl-NPR

抗体医薬品の「不均一性」が有効性・安全性に及ぼす影響

•凝集体形成

– IgG 凝集体 → アナフィラキシー発症リスク

•糖鎖構造

– 非ヒト型糖鎖 → アナフィラキシー発症リスク

– フコース → 有効性 (ADCC 活性) に影響

– 末端ガラクトース → 有効性 (CDC 活性) に影響

•抗体-薬物複合体 (ADC)

– 薬物の結合数 (DAR) → 有効性・毒性に影響

**抗体医薬品の開発・製造・品質管理において
「不均一性」の分析は不可欠**

1. バイオ医薬品市場動向
- 2. 抗体糖鎖認識FcR固定化分析カラム**
3. SWシリーズ新カラムUP-SW
4. まとめ

抗体医薬品

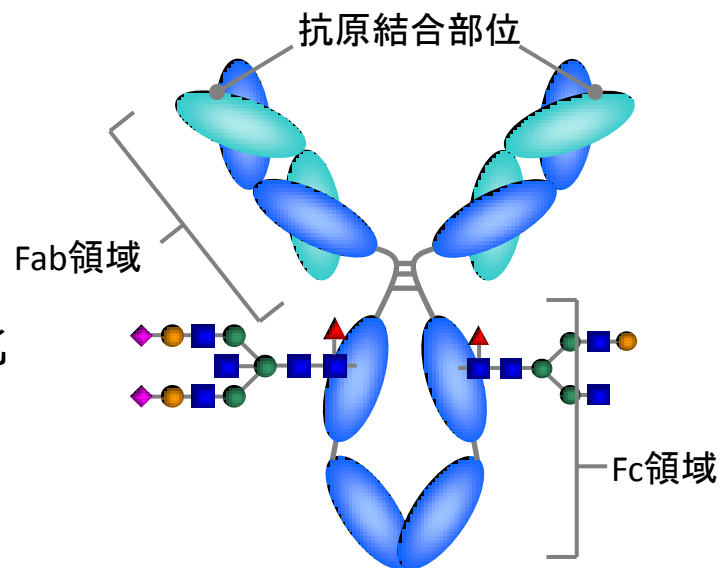
- ・ガンやリウマチなどの治療薬
- ・バイオ医薬品の1種

構造の特徴

- ・分子量15万の巨大分子
- ・2本の重鎖と2本の軽鎖が折りたたまれ、複合化
- ・2カ所のFab領域と1カ所のFc領域
- ・Fc領域に2本の糖鎖が結合
→ 薬効や安定性に重要

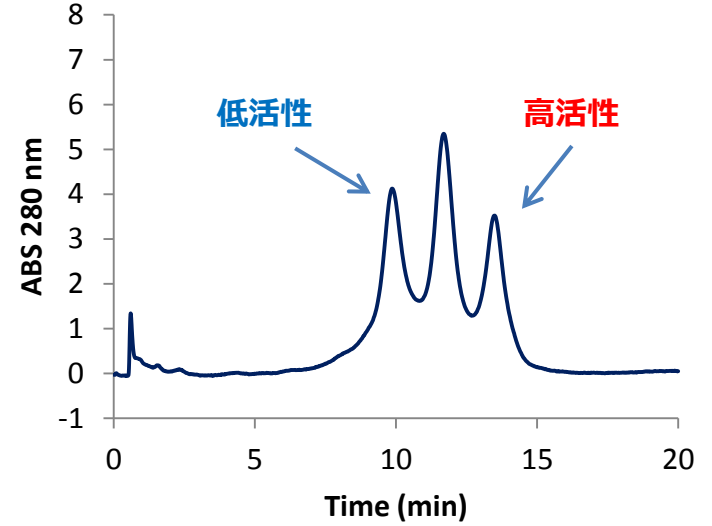
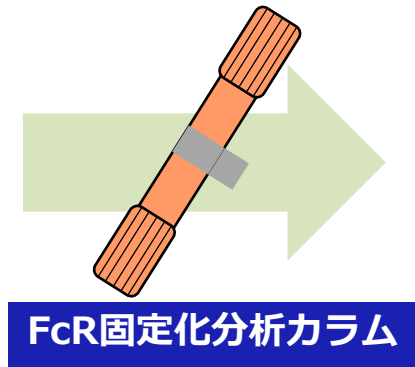
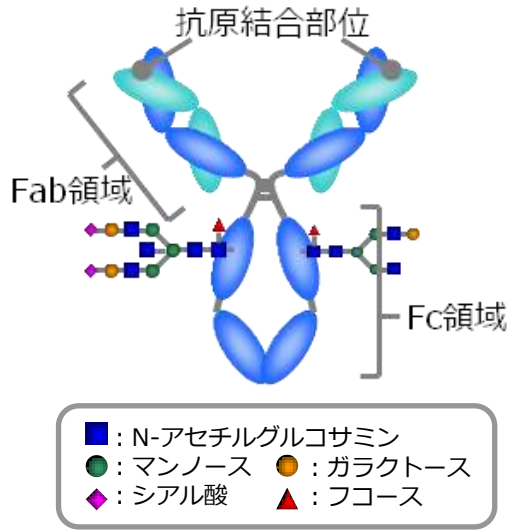
製造法

- ・アップストリーム：CHO細胞による培養生産
- ・ダウンストリーム：クロマト精製やろ過による製剤化



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

TSKgel FcR-IIIA-NPR (開発品) 機能概要



抗体医薬品

- Fc領域の糖鎖構造により
 活性が異なる
 ⇒ 品質バラつきの原因となり得る

分析例 (クロマトグラム)

糖鎖構造を認識し、
 活性に基づいて分離

抗体医薬品の作用機序

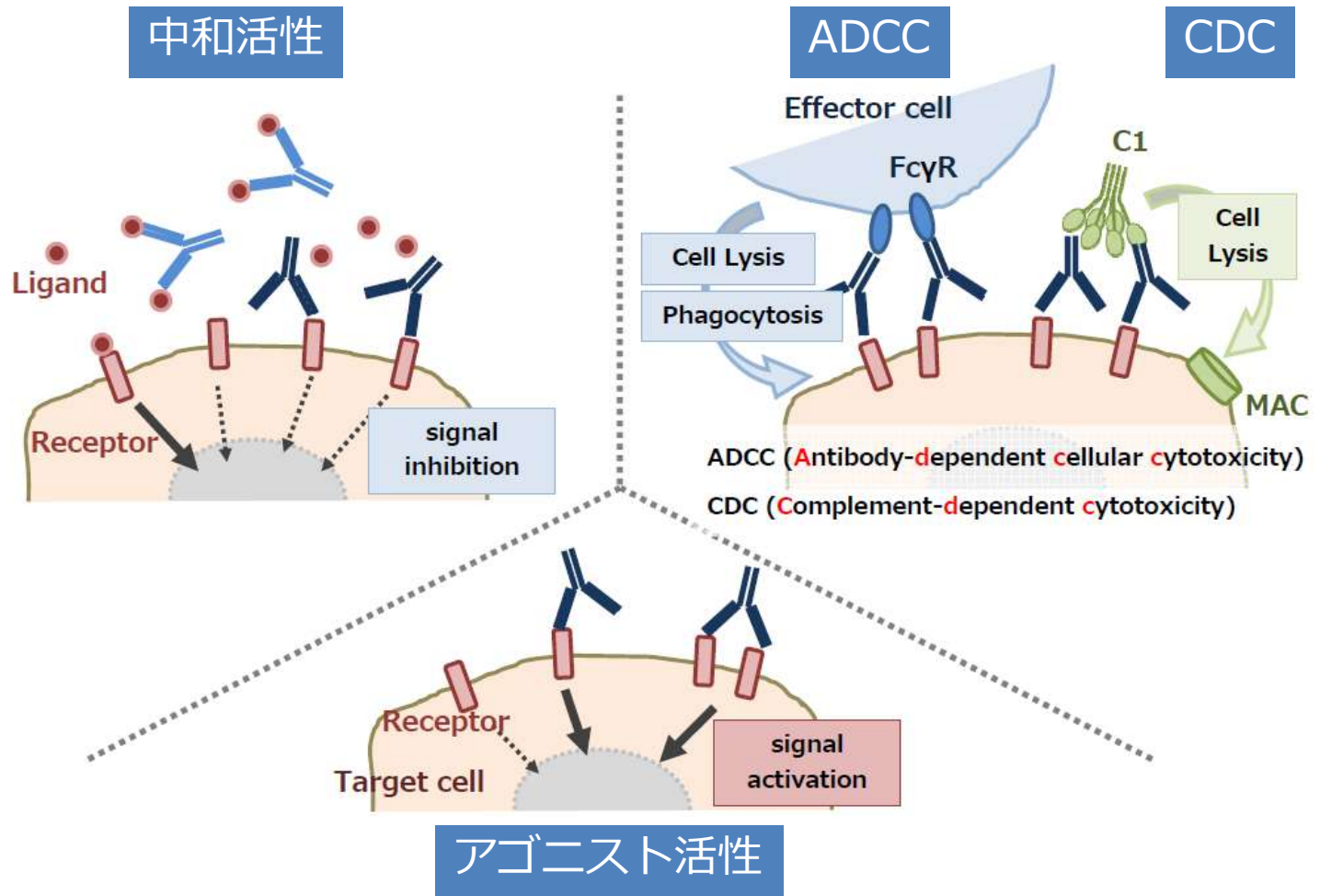
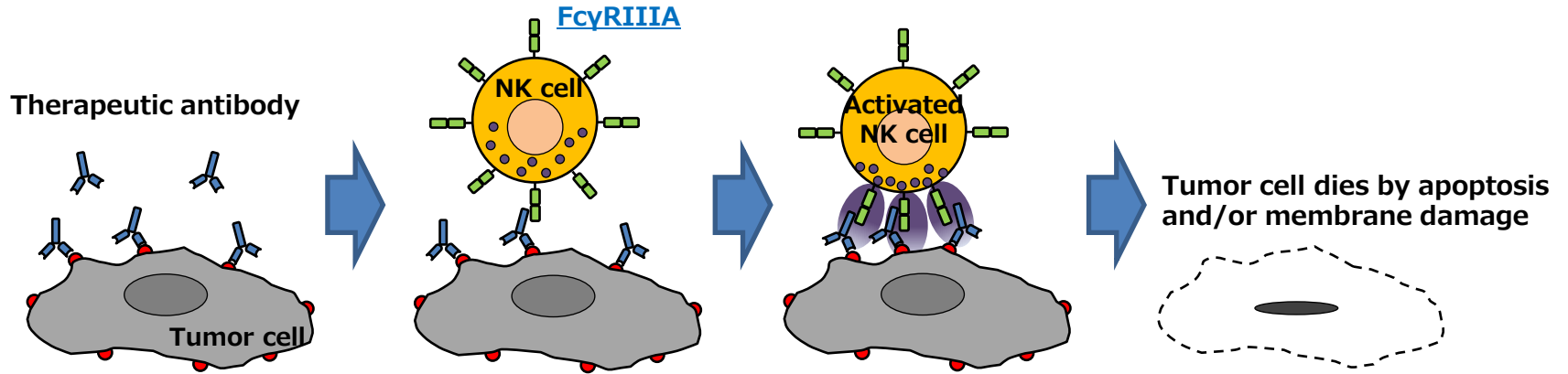


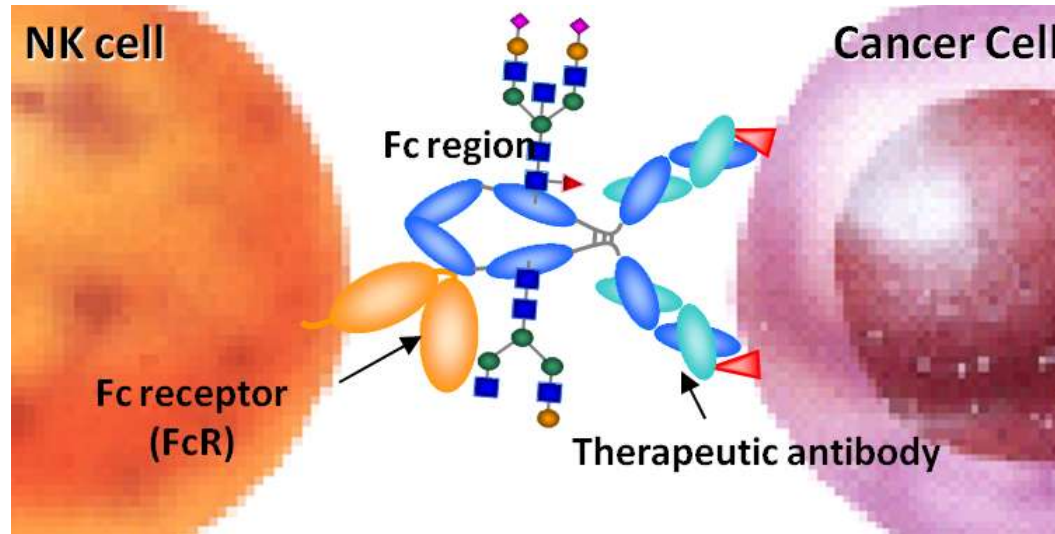
Figure from Web page of National Institute of Health Sciences, Japan

抗体医薬品の作用機序 - ADCC -



1. 抗体医薬品がガン細胞表面の抗原を認識し、結合する
2. NK細胞表面のFc γ RIIIAを介してNK細胞がガン細胞に結合する
3. Fc γ RIIIAのクロスリンクがトリガーとなり、NK細胞を活性化
4. ガン細胞がアポトーシス誘発や膜ダメージにより破壊される

ADCC活性におけるFcγRIIIAの役割

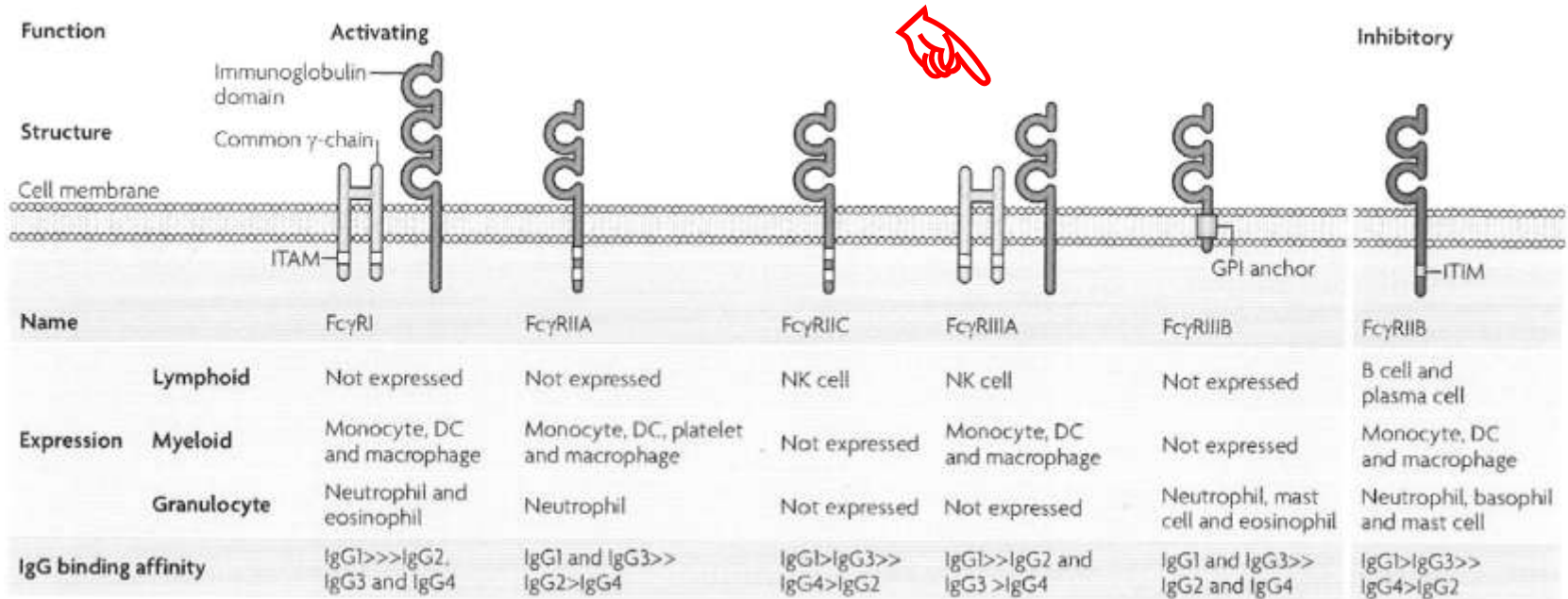


抗体医薬品の作用メカニズム（ADCC）模式図

キーとなるレセプター：FcγRⅢA

- NK細胞などの表面に発現
- 抗体医薬品の主要な活性（ADCC活性）のキー分子
- 抗体と1対1で結合
- 抗体のFc部分の糖鎖を認識

Fcレセプターの種類と機能



Kenneth G. C. Smith and Menna R. Clatworthy, *Nature Reviews Immunology* 10, 328-343 (May 2010)

- 免疫反応に関わるキー分子
- 抗体医薬品のFc領域と結合
- 主要な機能が明らかになりつつあるが、未解明な機能も多い

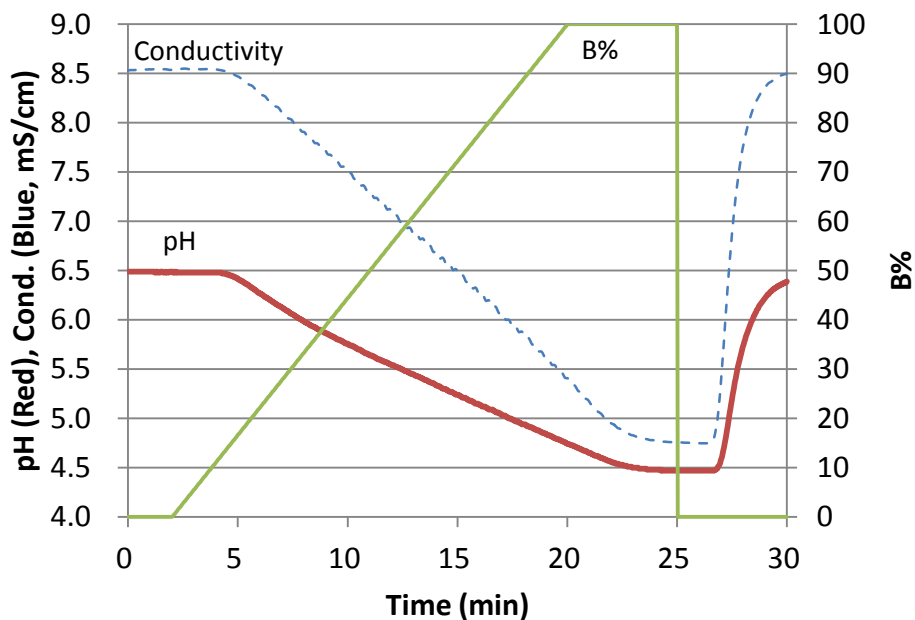
標準分析法

1. 装置

- 汎用HPLCシステム：グラジエントポンプ、UV検出器、カラムオーブン
※ 標準使用圧力：5 - 10 MPa

2. 分析条件

- pHグラジエント溶出法 (pH6.5 → 4.5, リニア)
- 中性 (pH6~8) で結合し、酸性で溶出



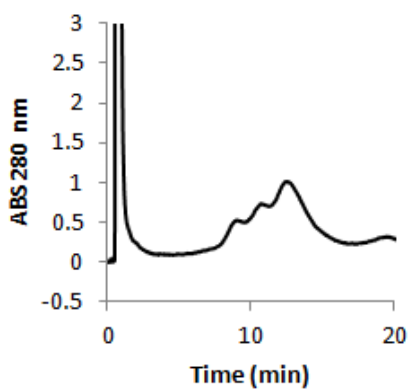
Condition

System, Tosoh LC-8020
 Buffer A, 50 mmol/L Citrate pH6.5
 Buffer B, 50 mmol/L Citrate pH4.5
 Gradient, B 0-100% (2-20 min, linear)
 Flow rate, 1.0 mL/min
 Temperature, 15 deg C (Column oven)
 Detection, ABS 280 nm

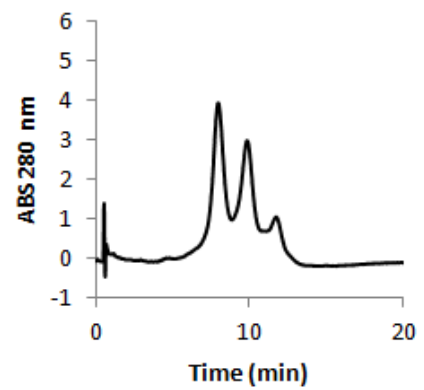


抗体の分析例

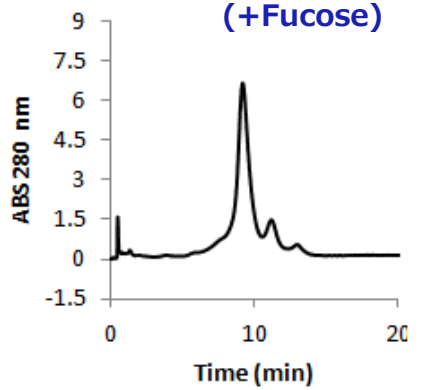
(A) Human gamma globulin



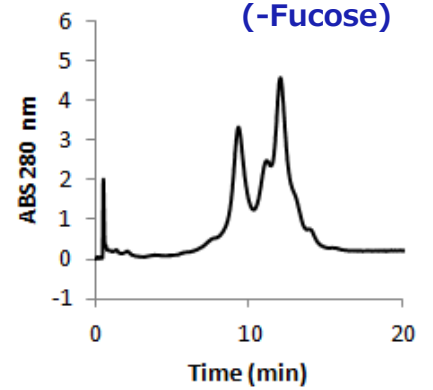
(B) Human IgG1



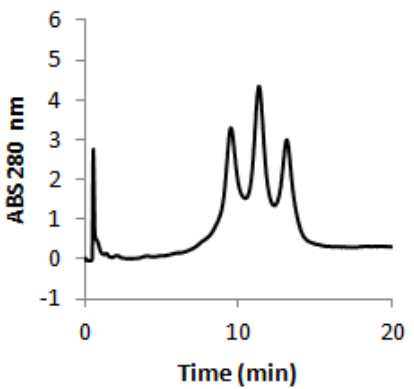
(C) Herceptin biosimilar (+Fucose)



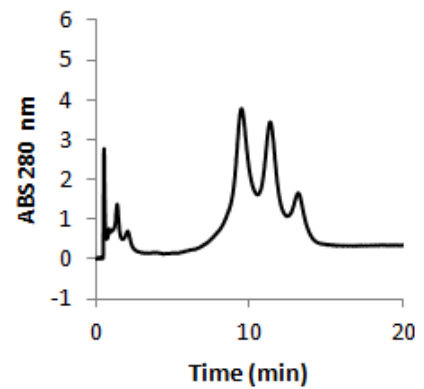
(D) Herceptin biosimilar (-Fucose)



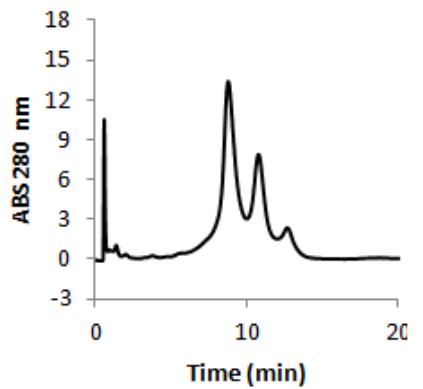
(E) Therapeutic antibody A



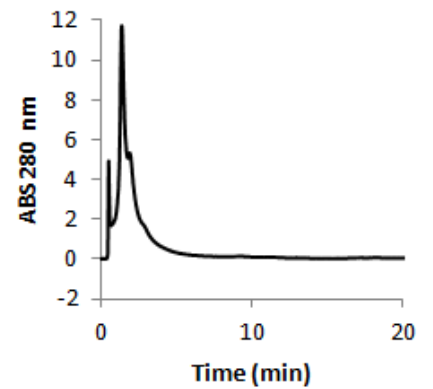
(F) mAb 1



(G) mAb 2



(H) mAb 3

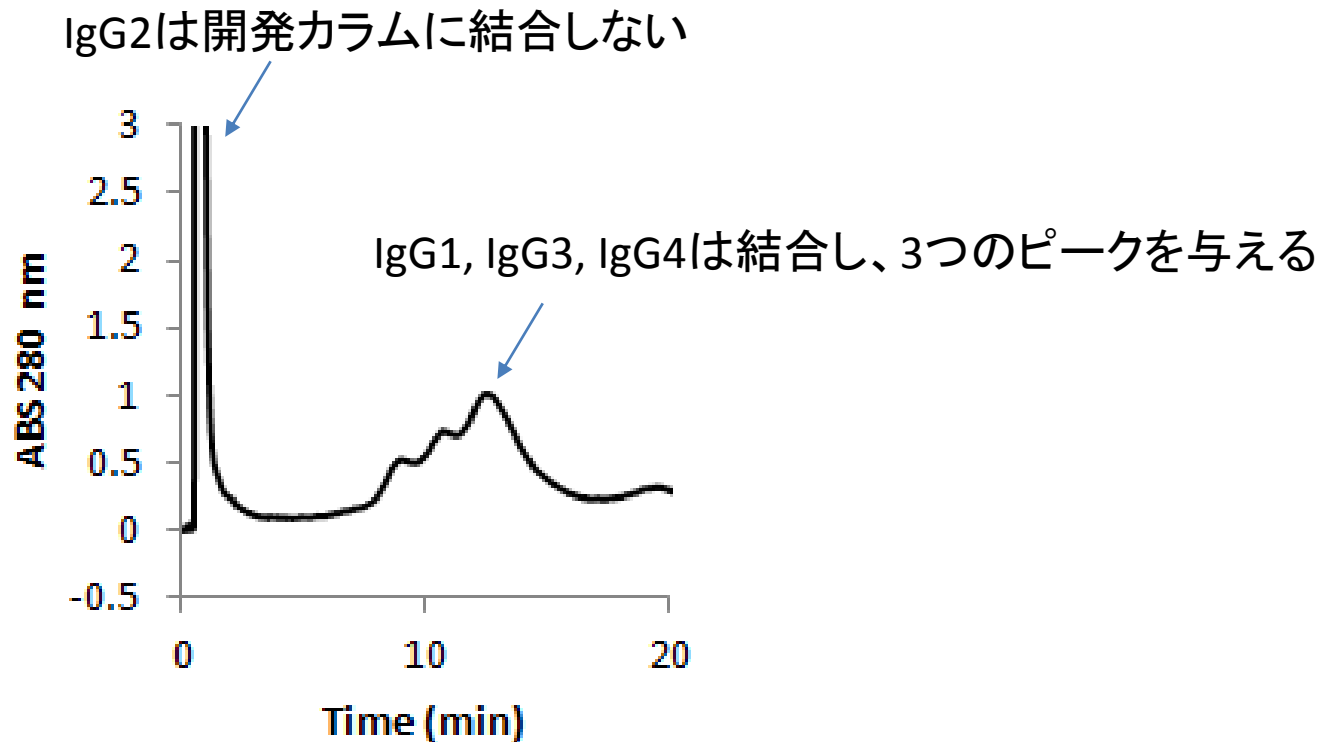


Condition

Buffer A, 50 mmol/L Citrate pH6.5
Buffer B, 50 mmol/L Citrate pH4.5
Gradient, B 0-100% (2-20 min, linear)

Flow rate, 1.0 mL/min
Detection, ABS 280 nm
Column oven, 25 deg C

ヒトガンマグロブリンの分離例

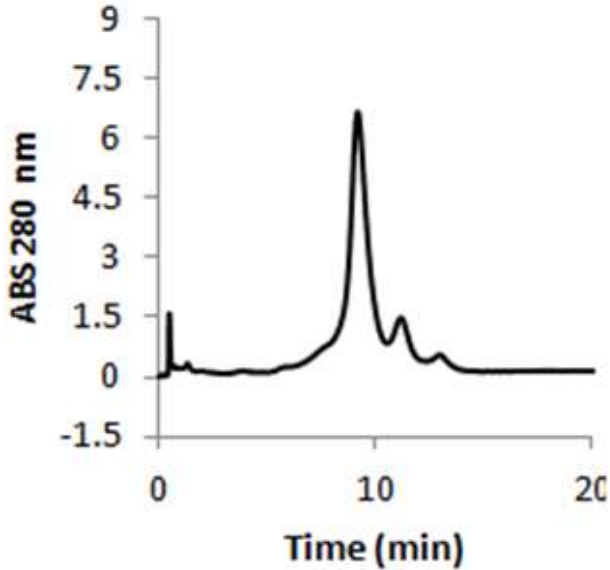


Chromatogram of human gamma globulin separation

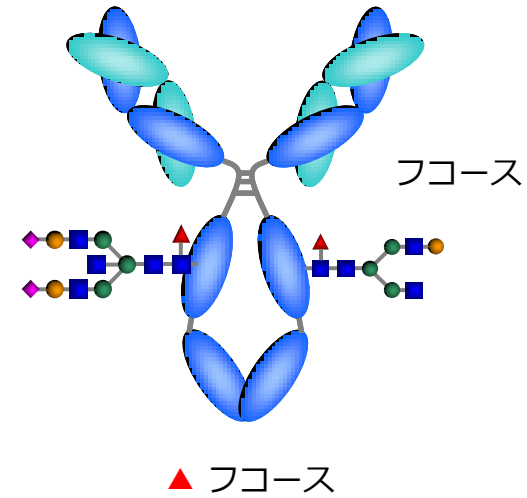
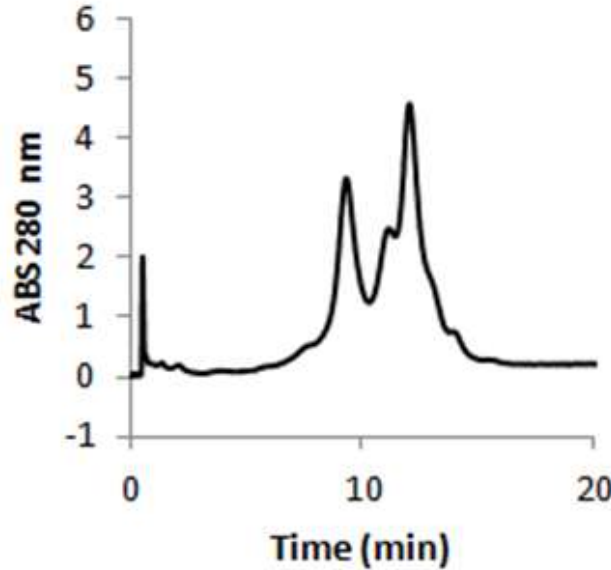
- IgG2はFcγRIIIAに対する親和性を有しないので、素通りする
- 入手した全てのガンマグロブリン製剤は上記と同様の分離パターンを示した

ハーセプチンバイオシミラーの分離例

Herceptin biosimiler
(+Fucose)



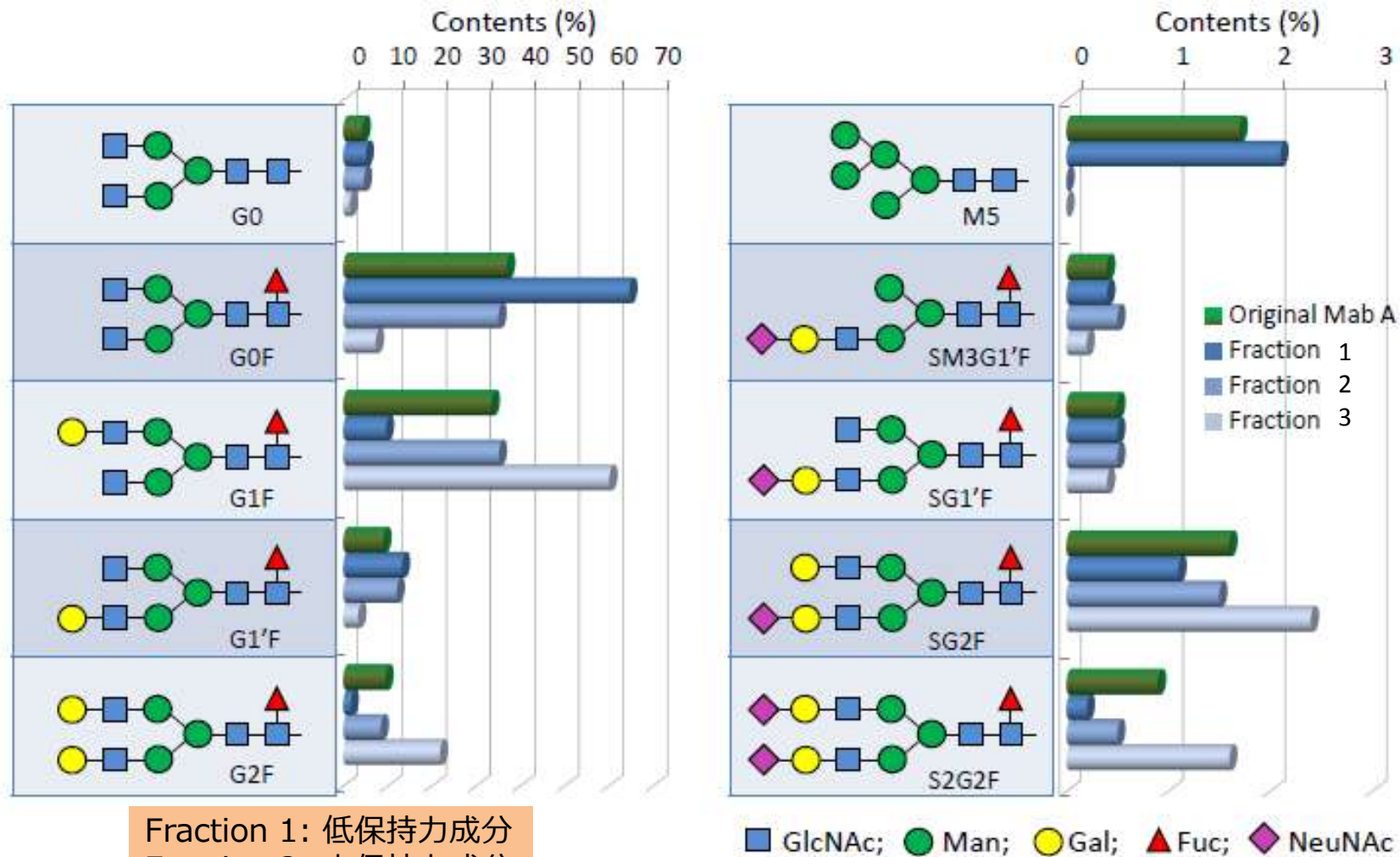
Herceptin biosimiler
(-Fucose)



Chromatograms of Herceptin biosimilers

- 脱フコース型糖鎖は、フコース型糖鎖と比較して強い保持力を示した
- フコース転移酵素をKOした細胞を用いて脱フコース型抗体を製造しても、活性のバラつきがあることが示唆された

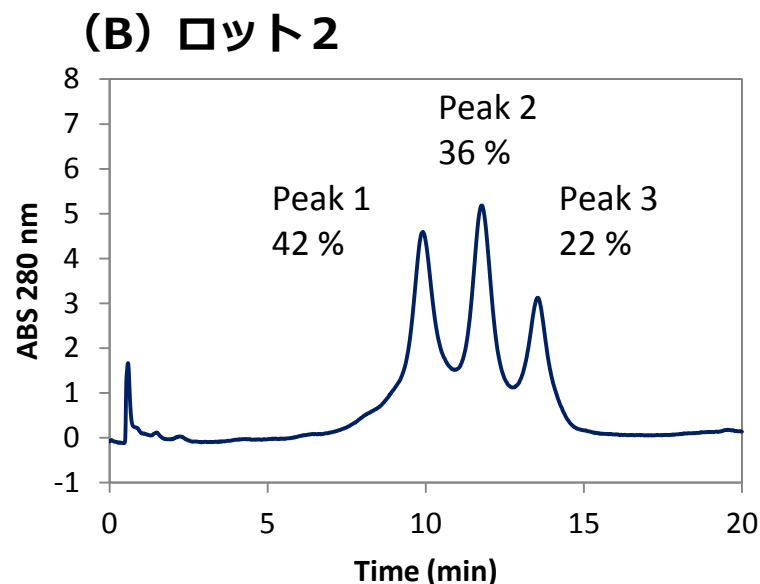
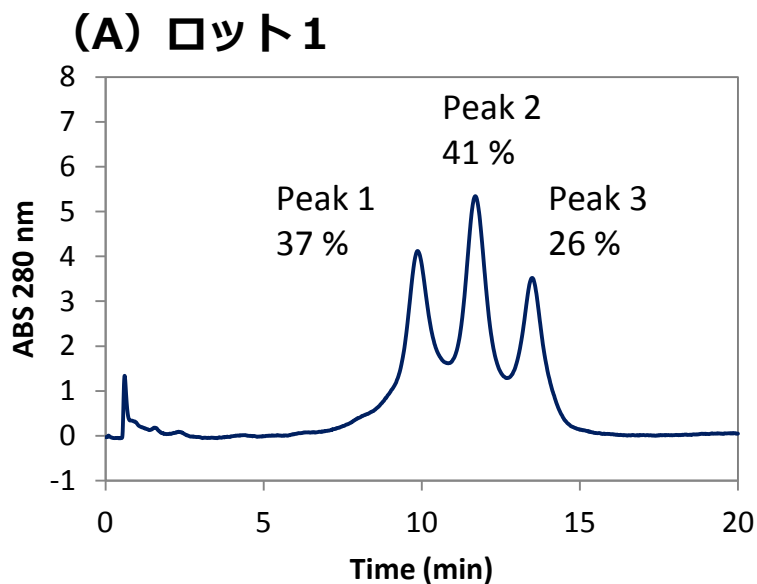
開発カラムによって分離された3ピークの糖鎖構造



Fraction 1: 低保持力成分
 Fraction 2: 中保持力成分
 Fraction 3: 高保持力成分

抗体医薬品の品質管理

ロット間差の比較が容易かつ迅速に行える



市販抗体医薬品Aのロット間差比較例

Condition

Buffer A, 50 mmol/L Citrate pH6.5

Buffer B, 50 mmol/L Citrate pH4.5

Gradient, B 0-100% (2-20 min, linear)

Flow rate, 1.0 mL/min

Detection, ABS 280 nm

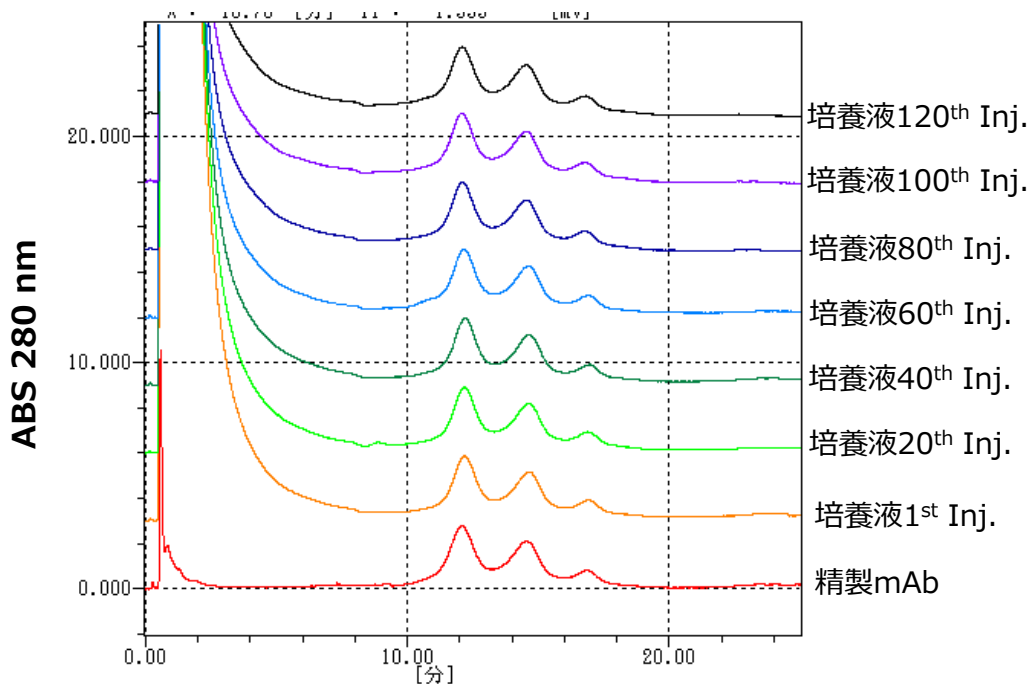
Column oven, 25 deg C



工程解析技術 (PAT)

培養工程では、日数経過に伴って産生される抗体の糖鎖構造が変わる

- 本カラムは培地成分やHCPが含まれていても、抗体量や活性の変化を分析可能
- 弊社モデル条件において120回以上の分析が可能であった (下図)



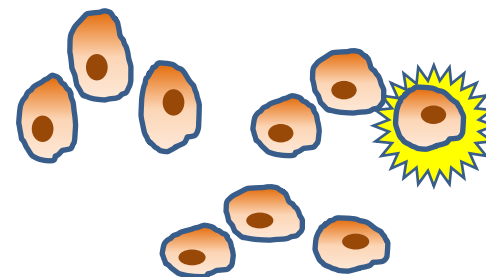
Buffer A, 50 mM Citrate, 150 mM NaCl pH6.5
 Buffer B, 50 mM Citrate, 150 mM NaCl pH4.5
 Flow rate, 1.0 mL/min
 Gradient, B0%(0-7 min) B0-100%(7-25 min)
 B100%(25-30 min) B0% (30-35 min)
 Temperature, 20 deg C
 Detection, ABS 280 nm

**※ NaClを添加することにより
非特異的な吸着を抑制可能**

培養液中の抗体の分析例

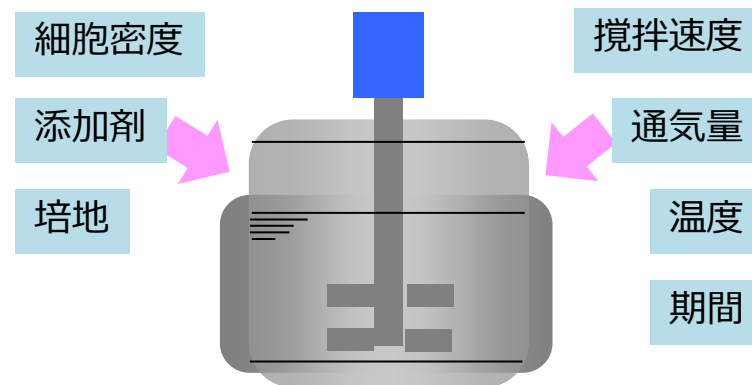
3. 抗体産生細胞の開発

従来の評価項目である増殖速度、抗体生産量、安定性に加え、「糖鎖構造」を評価可能
※必要な抗体量はわずか5 μg



4. 生産条件のスクリーニング

- 培養における工程パラメータの最適化
- 培地成分のスクリーニング



1. 抗体医薬品の糖鎖を認識し、活性に基づいて分離

- 本機能を有する分析用アフィニティカラムは世界初

2. 迅速分析

- サンプルの前処理不要
- ヒトFcを有する抗体やFc融合タンパク質に利用可能
- 測定時間：約30分／分析

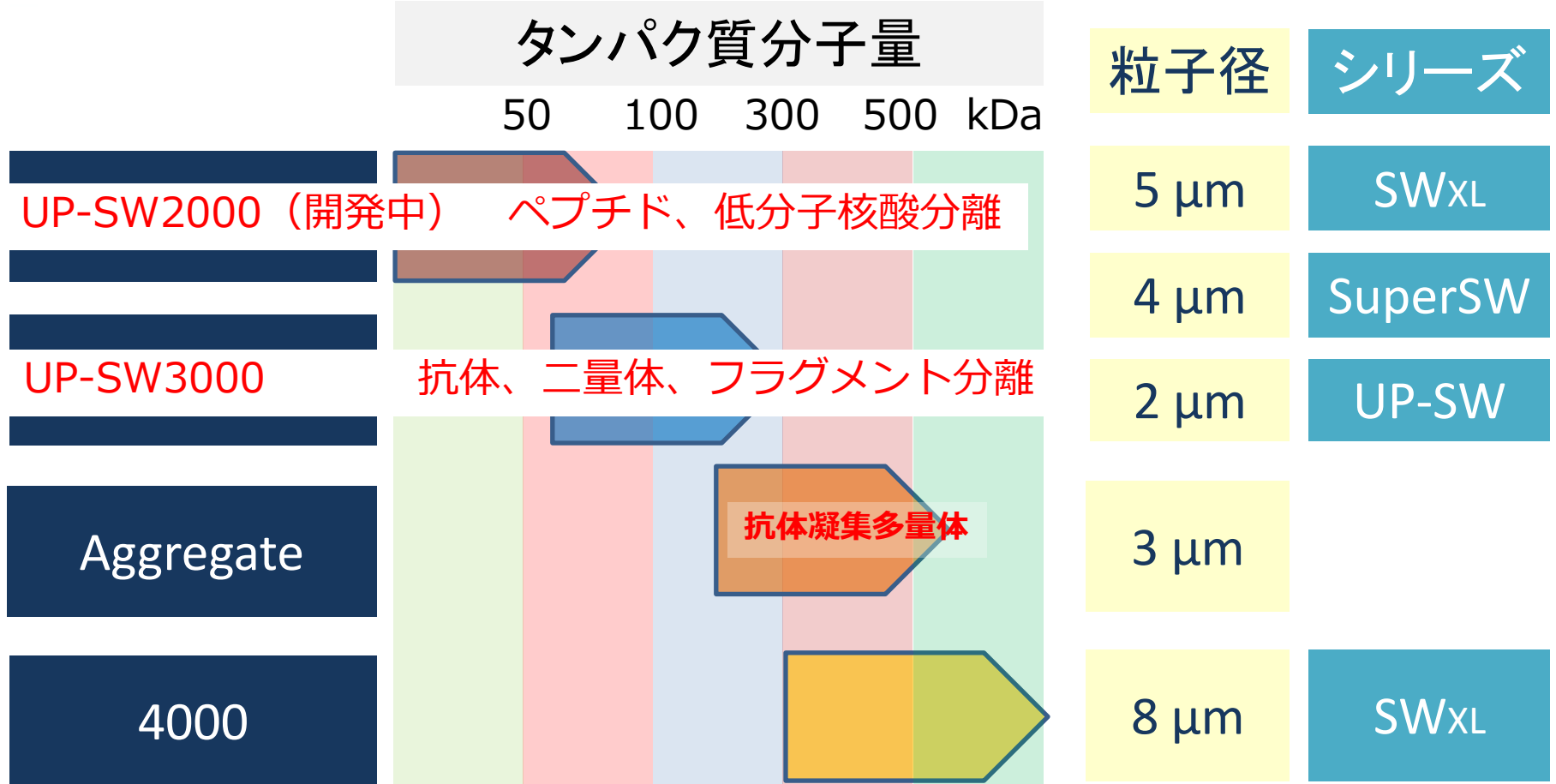
3. 優れた耐久性

- 100回以上の耐久性
- 良好な分析再現性

1. バイオ医薬品市場動向
2. 抗体糖鎖認識FcR固定化分析カラム
3. **SWシリーズ新カラムUP-SW**
4. まとめ

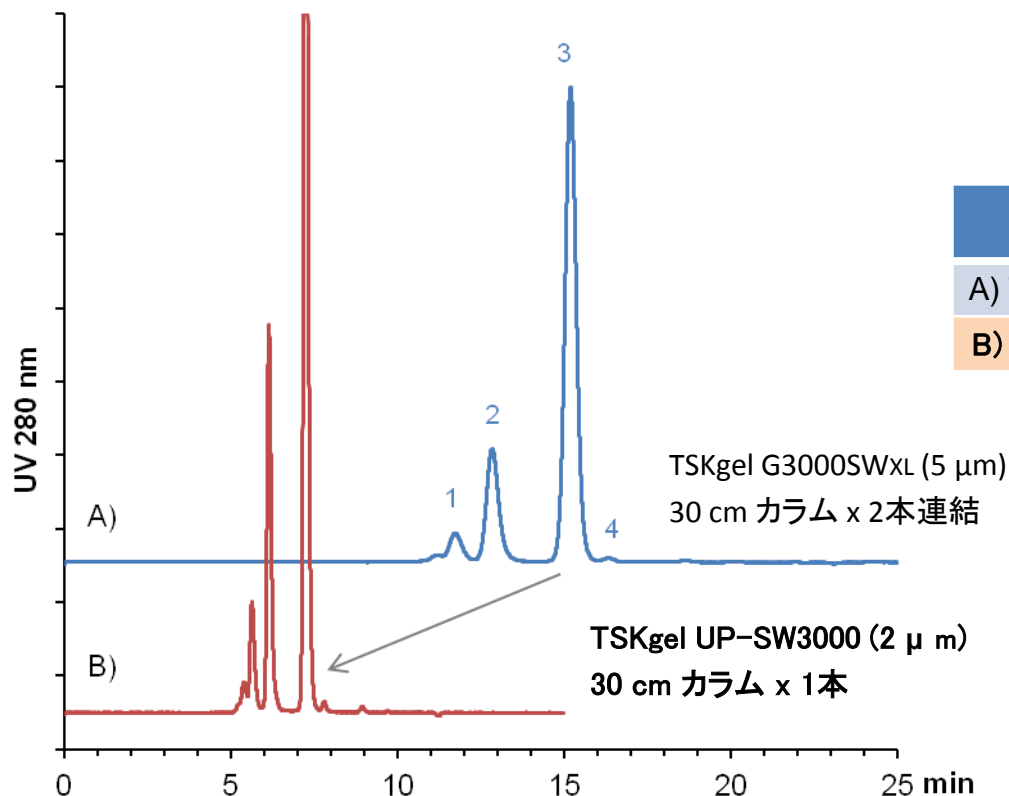


TSKgel SW series



5 μ m TSKgel G3000SW_{XL}と 2 μ m UP-SW3000の比較

従来のSWカラムよりも
高分離かつ迅速な分析を達成

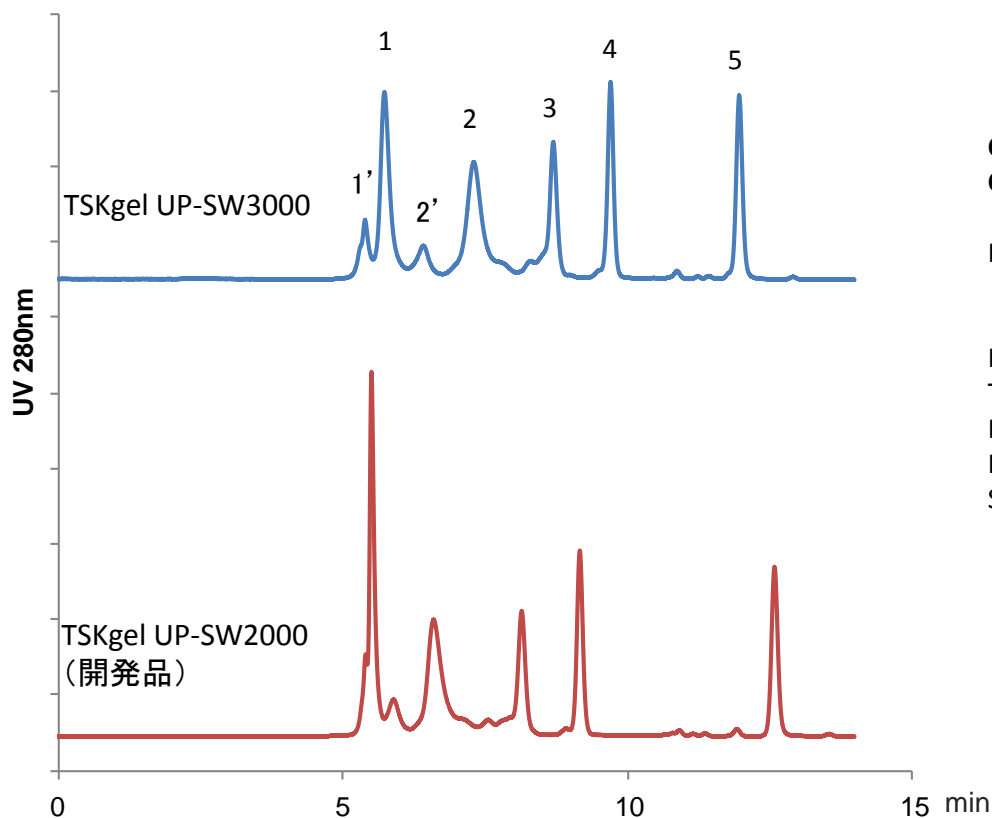


Column	Rs (1/2)	Rs (2/3)	Rs (3/4)
A) TSKgel G3000SW _{XL} x 2	1.60	3.63	1.77
B) TSKgel UP-SW3000	2.16	5.02	2.56

Condition

Column:	A) TSKgel G3000SW _{XL} 5 μ m, 7.8 mm I.D. x 30 cm x 2 B) TSKgel UP-SW3000 2 μ m, 4.6 mm I.D. x 30 cm
Mobile phase:	100 mmol/L phosphate buffer (pH6.7) + 100 mmol/L sodium sulfate + 0.05% sodium azide
Flow rate:	A) 1.0 mL/min, B) 0.35 mL/min
Temperature:	25 deg C
Detection:	UV 280 nm
Injection vol.:	10 μ L
Sample:	mAb

UP-SW3000とUP-SW2000(開発品)の分画範囲



Condition

Column: TSKgel UP-SW3000 4.6 mm I.D. x 30 cm
 TSKgel UP-SW2000 4.6 mm I.D. x 30 cm (開発品)

Mobile phase: 100 mmol/L phosphate buffer (pH6.7)
 + 100 mmol/L sodium sulfate
 + 0.05% sodium azide

Flow rate: 0.35 mL/min

Temperature: 25 deg C

Detection: UV 280 nm

Injection vol.: 10 μ L

Sample:

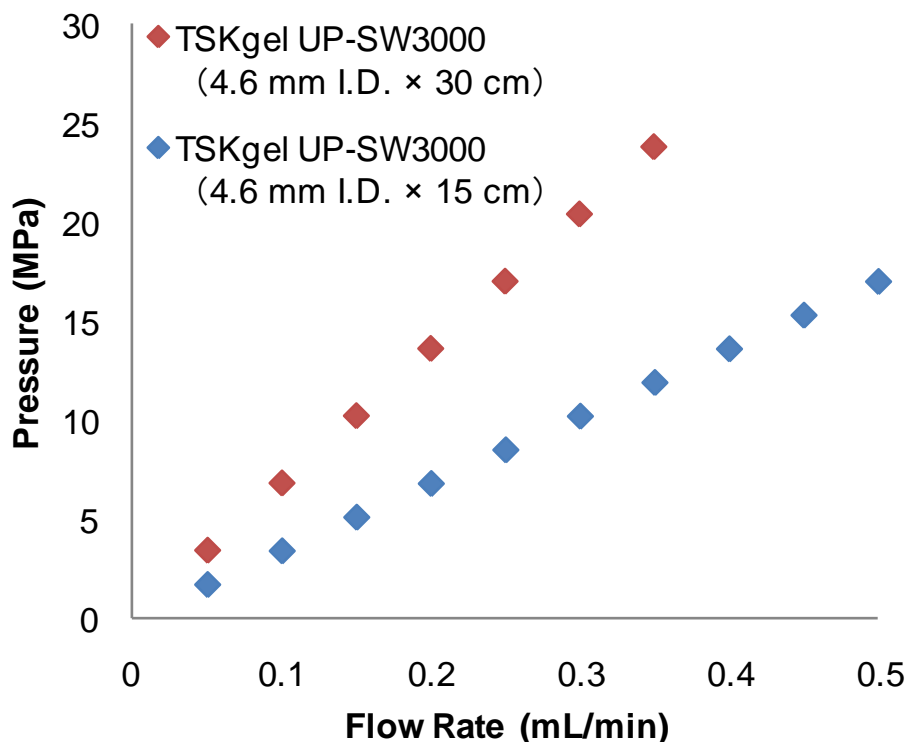
1. Thyroglobulin	640,000 Da
(1' Thyroglobulin dimer)	
2. γ -Globulin	155,000 Da
(2' γ -Globulin dimer)	
3. Ovalbumin	47,000 Da
4. Ribonuclease A	13,700 Da
5. ABA	137 Da

Column	Rs (1'/1)	Rs (1/2')	Rs (2'/2)	Rs (2/3)	Rs (3/4)	Rs (4/5)
TSKgel UP-SW3000	1.25	2.25	2.28	4.18	4.86	11.60
TSKgel UP-SW2000(開発品)	—	1.49	1.79	4.84	4.96	17.16

カラム操作圧 (UP-SW3000)

- 高分離分析用カラム : 4.6 mm I.D. x 30 cm
- 迅速分析用カラム : 4.6 mm I.D. x 15 cm
- どちらもカラム操作圧は30 MPa以下

➡ 耐圧が低いHPLCシステムでも使用可能



Condition

Mobile phase: 100 mmol/L phosphate buffer (pH6.7)
 + 100 mmol/L sodium sulfate
 + 0.05% sodium azide
 Flow rate: 0.05 – 0.50 mL/min
 Temperature: 25 deg C

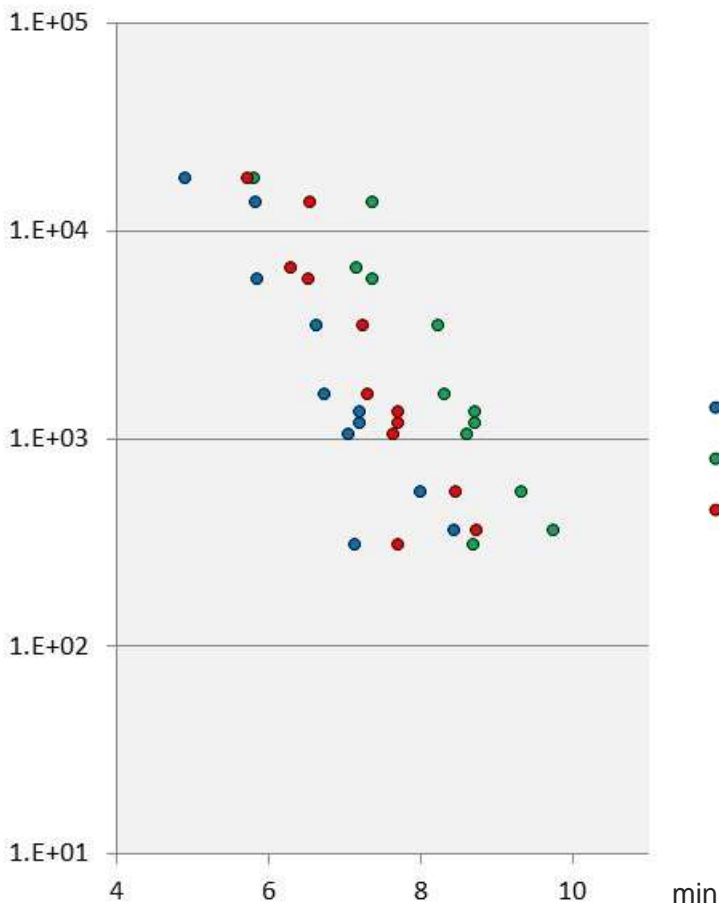


UP-SW2000 (開発品)

- ✓ TSKgel G2000SWxL, SuperSW2000 と同一選択性、高分離
分子量10万以下のタンパク質、ペプチド、核酸の分離に好適
- ✓ 2 μm のUP-SW2000は、5 μm SWxLの分析時間半分、より高分離
- ✓ 操作圧30 MPa以下で汎用HPLC (セミマイクロシステム) で使用可能



ペプチド校正曲線比較



Conditions

Column UP-SW2000 4.6 mm I.D. x 30 cm (開発品)
 SuperSW2000 4.6 mm I.D. x 30 cm
 A社 4.6 mm I.D. x 30 cm

Mobile phase 0.1% TFA in 40% ACN

Flow-rate 0.35 mL/min

Temperature 25 deg C

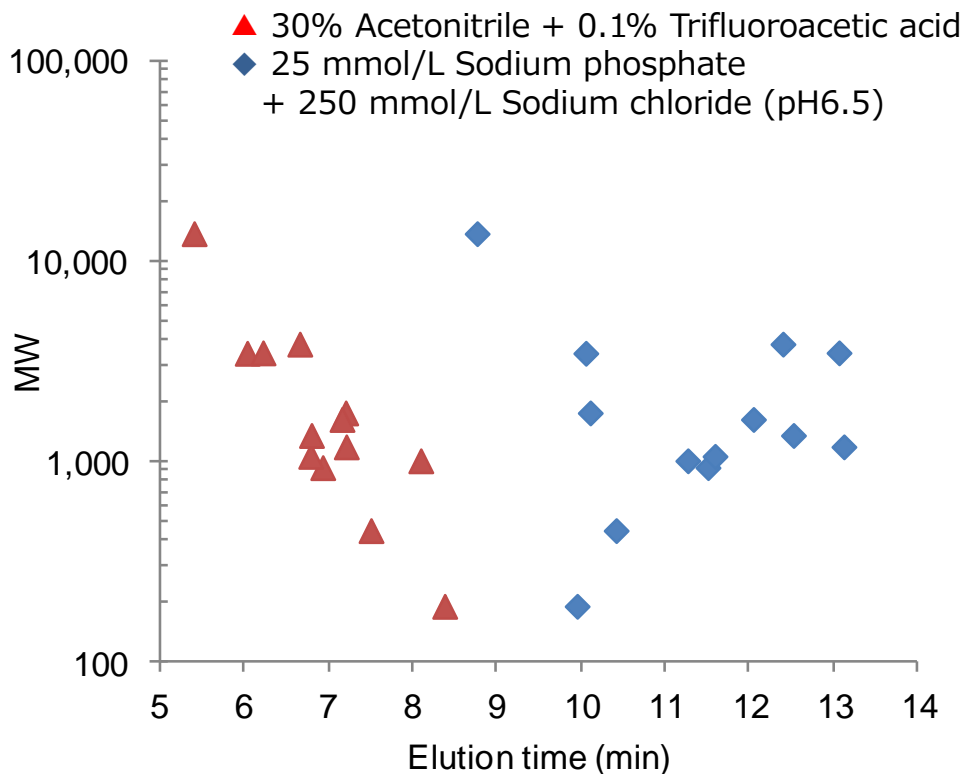
Detect 215 nm

Sample	MW
Myoglobin	17,800
Ribonuclease A	13,700
Aprotinin	6,612
Insulin	5,808
Glucagon	3,483
Bombesin	1,620
Substance P	1,348
LH-RH human	1,182
Angiotensin II	1,046
Leucine-Enkephalin	556
TRH	362
Glutathione	307

Calibration curve

ペプチド分析 移動層の影響

- 移動相にアセトニトリル、TFAを用いることで固定相との吸着等を抑制



Condition

Column: TSKgel UP-SW2000 (開発品)
2 μm, 4.6 mm I.D. x 30 cm

Flow rate: 0.35 mL/min

Temperature: 25 deg C

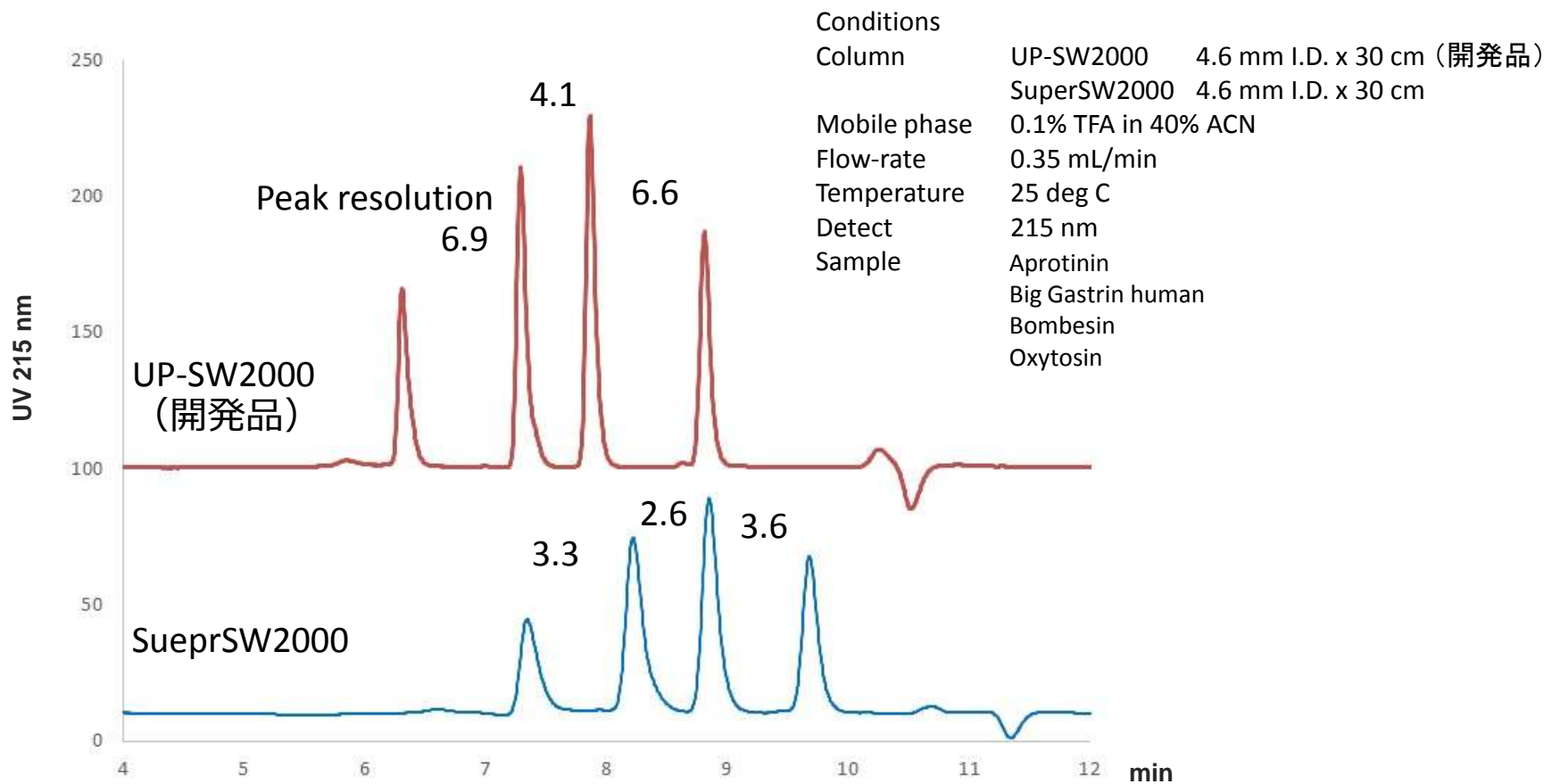
Detection: UV 214, 280 nm

Injection vol.: 10 μL

Sample:	Da
RibonucleaseA	13,700
Big Gastrin	3,849
Glucagon	3,482
β-Endorphin	3,465
α-Endorphin	1,746
Bombesin	1,620
Substance P	1,348
LH-RH	1,182
Bradykinin	1,060
Oxytocin	1,007
Angiotensin III	931
Gly-Gly-Tyr-Arg	451
Gly-Gly-Gly	189

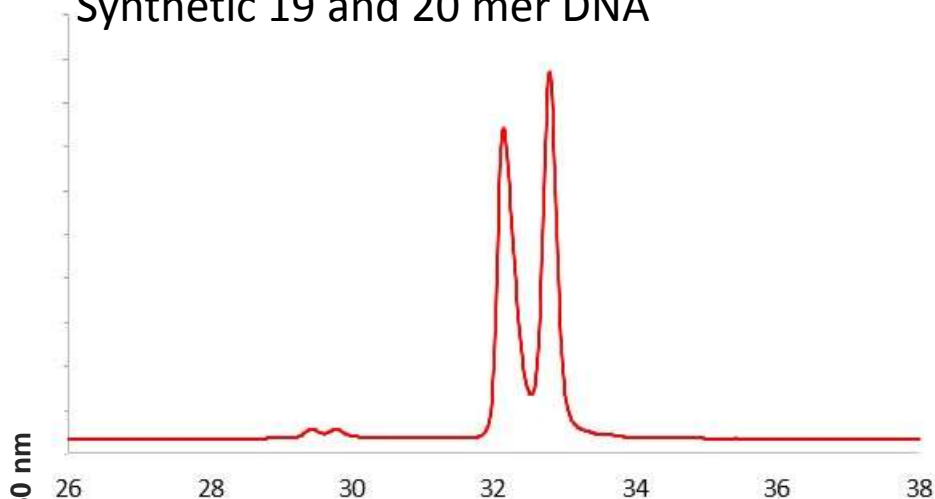


ペプチド分析 クロマト比較



低分子核酸の分離例

Synthetic 19 and 20 mer DNA



Conditions

Column UP-SW2000 4.6 mm I.D. x 30 cm x 2 (開発品)

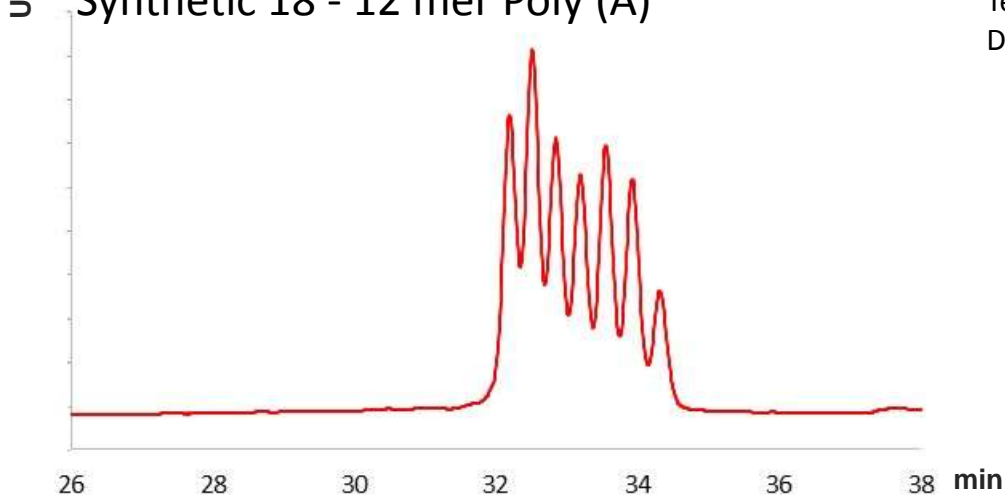
Mobile phase 0.05% NaN₃ and 0.3 mol/L NaCl
in 0.05 mol/L Phosphate (pH6.7)

Flow-rate 0.20 mL/min

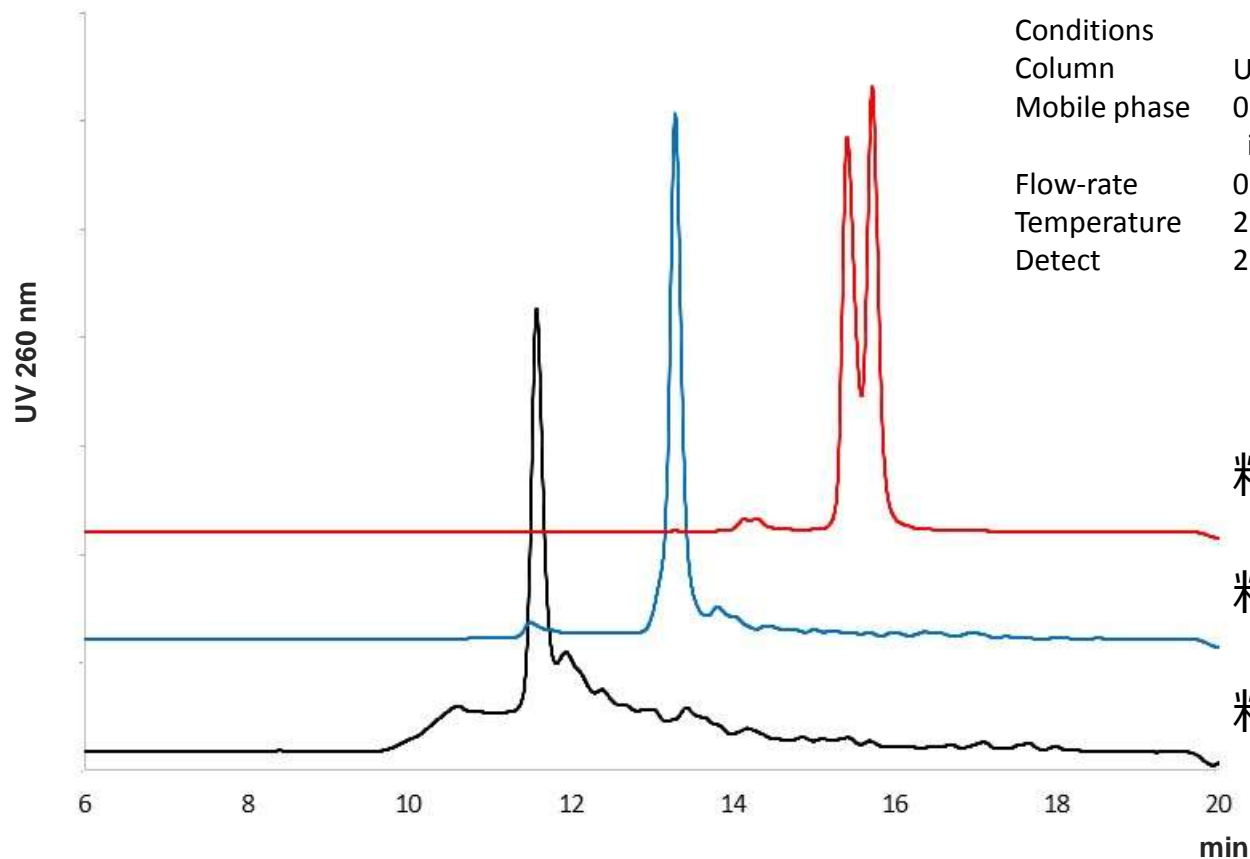
Temperature 25 deg C

Detect 260 nm

Synthetic 18 - 12 mer Poly (A)



低分子核酸の分離例



Conditions

Column UP-SW2000 4.6 mm I.D. x 30 cm (開発品)

Mobile phase 0.05% NaN₃ and 0.3 mol/L NaCl
in 0.05 mol/L Phosphate (pH6.7)

Flow-rate 0.20 mL/min

Temperature 25 deg C

Detect 260 nm

精製 19, 20mer DNA

粗精製 50mer DNA

粗精製 100mer DNA

まとめ UP-SWシリーズの特徴

1. SWXLと同等の選択性で高分離

- 3000 抗体凝集体、フラグメント
- 2000 ペプチド、オリゴ核酸

2. 迅速分析

- 5 μm SWXL の1/2の分析時間でより高分離

3. セミマイクロ仕様汎用液クロ装置で使用可能

- 操作圧は30 MPa以下

まとめ 広がるバイオ医薬品分析・精製

	分析		精製
抗体	サイズによる分離	UP-SWシリーズ	rProtein A シリーズ
	糖鎖直接分析、活性	FcRカラム	rProtein L
	糖鎖解析	Amide-80	NH ₂ -750
	チャージバリエーション	STAT、NPRシリーズ	Phenyl-650
ADC	Butyl-NPR	GigaCapシリーズ	
核酸 ペプチド	サイズによる分離	UP-SWシリーズ	IEX-PW (SuperQ-5PW)
	イオン交換による分離	STAT、NPRシリーズ	HIC-PWシリーズ
	疎水性による分離	ODS-100V、120H	ODS

東ソー(株)の出展 7B-401・セミナー

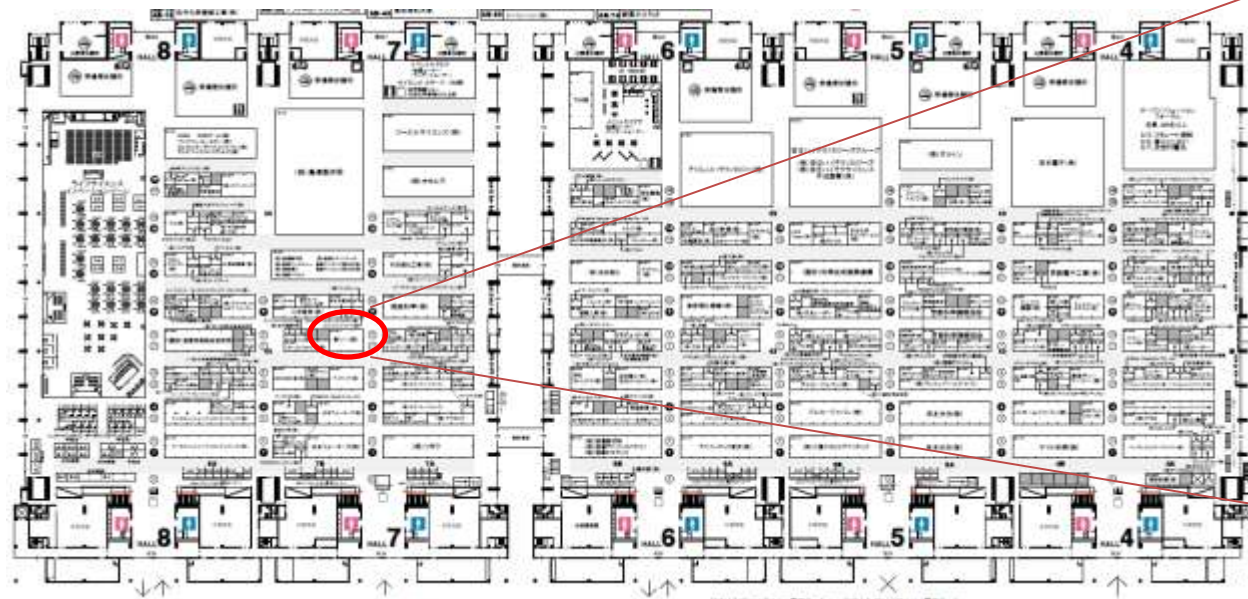
セミナー

『最新の高速GPCシステムHLC-8420GPC EcoSEC Eliteの紹介』

日時:9月6日(木) 13:45 ~ 14:10 会場 A-9

『高速イオンクロマトグラフィーによる水道水質分析 ~改正告示法への対応~』

日時:9月7日(金) 14:25 ~ 14:50 会場 A-10



10-401 (株)島津製作所 (株)島津テクノリサーチ (株)島津ジーエルシー 島津サイエンス東日本(株) (株)島津理化 島津サイエンス西日本(株) (株)島津アクセス		
(株)ニッパト		
10-301 (株)ニッパト	10-302 朝日ライフ サイエンス(株)	10-303 安立計器(株)
10-300 三洋貿易(株)		
アンソウインフォス(株) キヤノンマーケティングジャパン(株) (株)信長印刷制作所 ジャパンサンナリー(株)		
10-403 東ソー(株)		
10-402 カールツァイス(株)		
10-304 日本分析工業(株)	10-305 日本フッ素 (株)	10-307 アメテック(株)
アイネクス(株) BRMCO GmbH & Co. KG		
10-206 日本カーボ ナリクス(株)	10-207	10-201 日本ウォーターズ(株)

ご清聴 有り難う御座いました