

細胞株の違いによる抗体糖鎖分析はこれで決まり！

FcR アフィニティーカラムで、培養細胞(セルライン)の違いによる糖鎖の違いを迅速に分析
(オープンアクセス論文より)



抗体医薬品は、N 結合型糖鎖 (N-グリカン) の構造の違いが薬効や安全性などの品質特性に大きく影響することが知られています。一方、わずかな培養条件の違いによっても糖鎖構造は変化することから、品質を管理する上で糖鎖の分析は非常に重要となります。以下の文献では、異なる細胞株 (セルライン) を用いて発現した抗体の N-グリカンの構造および物性の違いについて報告されており、N-グリカンの比較に、アフィニティーカラム TSKgel FcR-III A-NPR® が用いられています。

Highly sensitive HPLC analysis and biophysical characterization of N-glycans of IgG-Fc domain in comparison between CHO and 293 cells using FcγRIIIa ligand

H. Kosuge, S. Nagatoishi, M. Kiyoshi, A. Ishii-Watabe, T. Tanaka, Y. Terao, S. Oe, T. Ide and K. Tsumoto, *Biotechnol. Progress.* 2020: e3016, <https://doi.org/10.1002/btpr.3016>

(要旨)

- モノクローナル抗体の品質管理は“challenging”であり、その一因は翻訳後修飾によって生じる多様性にある。IgG の Fc 領域に存在する N-グリカンの管理は、抗体医薬品の安全性と薬効を担保するうえで重要な要因の 1 つである。
- 大腸菌を用いて得た FcγRIIIa 組換え体を固定化したアフィニティーカラム (FcR カラム) は、モノクローナル抗体の N-グリカンを正確に分析する非常に有効な手段である。Expi293 (HEK293) 細胞および ExpiCHO (CHO) 細胞の 2 種類の異なる細胞株 (セルライン) を用いてモノクローナル抗体を発現させ、FcR カラムで比較した。その結果、両者の分離挙動は大きく異なっていた。これは、IgG-Fc 領域の末端糖鎖 (ガラクトース残基) の違いによるものであった。
- さらに、モノクローナル抗体と FcγRIIIa 組換え体の相互作用を理解するために、速度解析ならびに熱力学的解析を行った。その結果、Expi293 細胞より得られたモノクローナル抗体が、ExpiCHO 細胞より得られたモノクローナル抗体に比較して、FcγRIIIa 組換え体に強い親和性を示すのは、解離速度が遅く、結合のエントロピー損失が小さいためであると考えられた。
- FcγRIIIa 組換え体を固定化したアフィニティーカラムは、抗体の N-グリカンの迅速かつ特異的な分析に適用可能であると結論した。

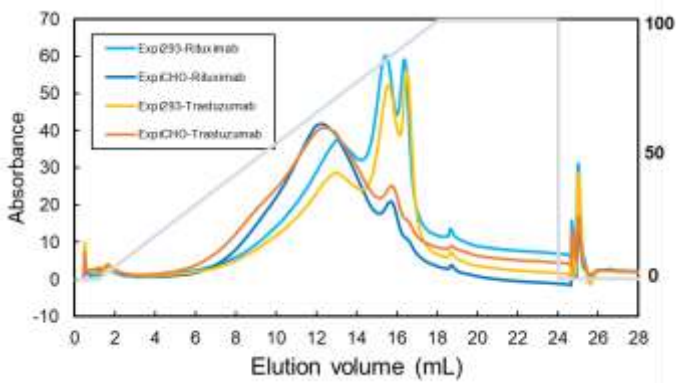
●TSKgel FcR-III A-NPR カラムの主な分析用途 (抗体の糖鎖変化をクロマトグラムで確認)

- 細胞株 (セルライン) (CHO 細胞、HEK 細胞など) による抗体の糖鎖の違い、細胞株スクリーニング
- 細胞培養培地への添加試薬の最適化検討
- 細胞培養時の培養日数と抗体の糖鎖性状の経時変化の確認
- 細胞培養容量のスケールアップや培養法の変更時における抗体の糖鎖性状の変化の有無の確認
- 精製抗体のバッチ・リリーステストとしての抗体の糖鎖性状の確認
- バイオシミラー抗体とオリジナル・リファレンス抗体との類似性の評価

(関連テクニカルノート)

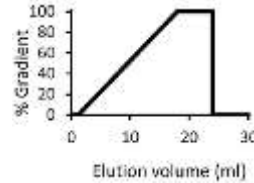
- テクニカルノート (TSKgel) No. 7; 抗体医薬品の品質特性分析はこれで決まり!
- テクニカルノート (TSKgel) No. 10; 細胞株スクリーニング用カラムはこれで決まり!
- テクニカルノート (TSKgel) No. 11; 抗体糖鎖の迅速分析用カラムはこれで決まり!
- テクニカルノート (TSKgel) No. 12; バイオシミラー抗体の糖鎖評価はこれで決まり!

●TSKgel FcR-III A-NPR によるモノクローナル抗体の分離（細胞株による糖鎖の違い）



分析条件

溶離液：バッファーA：20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液
 +50 mmol/L NaCl (pH 5.0)
 バッファーB：10 mmol/L グリシン-HCl 緩衝液 (pH 3.0)
 リニアグラジエント：B 0% - 100% (28分)
 流速：0.6 mL/min 検出：UV (230 nm) 温度：25 °C
 試料：Expi293-Rituximab, ExpiCHO-Rituximab,
 Expi293-Trastuzumab, ExpiCHO-Trastuzumab (14 μM, 10 μL)



データは東京大学大学院工学研究科の津本浩平先生、長門石暁先生のご厚意によります

Ref.; H. Kosuge et al., Biotechnol. Progress, 2020;e3016, <https://doi.org/10.1002/btpr.3016>

Expi293 細胞で発現した抗体は、ExpiCHO 細胞で発現した抗体に比べ、FcR カラムで遅く溶出する成分の比率が高いことがわかった。これは、既報告¹⁾のように、グリコシル化パターンの違いによるものであり、用いる細胞株によって N-グリカンのグリコシル化パターンが異なることがわかった。

FcR カラムを用いた文献

- 1) FcR カラムで分離した 3 つの抗体ピークのオリゴ糖鎖構造と生理活性の関係を分析、また抗体と FcR の結合様式を解析
M. Kiyoshi et al., Assessing the Heterogeneity of the Fc-Glycan of a Therapeutic Antibody Using an Engineered Fcγ Receptor IIIa-immobilized Column, Scientific Reports, 2018, 8:3955
- 2) 均一オリゴ糖鎖を付加した人工抗体の糖鎖構造と活性性能を比較、また FcR カラムを用いて人工抗体の分離挙動を比較
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) FcR カラムで分離した抗体の 3 つのピーク分画を LC/MS で分離、糖鎖構造を解析
Tosoh Bioscience, Characterization of TSKgel FcR-III A-NPR HPLC Column by Top Down Mass Spectrometry, LCGC North America, 37(2) (2019) p142-144
- 4) FcR カラムでバイオンミラー抗体およびオリジナル抗体の製造ロットにおける抗体の糖鎖の違いを解析
L. Xie 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

● 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



※"TSKgel", "NPR"は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※"Herceptin"は Genentech 社の登録商標です

※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

※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12743-1

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