

# アフィニティクロマト法による 抗体医薬品の構造および活性分析

田中 亨, 村中 和昭, 井出 輝彦

## 1 はじめに

抗体医薬品は標的細胞への特異的な吸着性と患者自身の免疫機能を利用することを特長とする医薬品であり、2000年頃よりガンや自己免疫疾患などの治療薬として実用化され、17兆円（2020年、世界）を超える巨大市場を形成している。2022年現在においても6000件を超える治験が実施されており、今後も年率10%を超える高成長率での市場拡大が見込まれている。一方で、軽鎖2本および重鎖2本から成る分子量約15万の抗体分子は非常に複雑な構造であり（図1(a)）、生産される抗体医薬品の品質を担保するための分析が欠かせない。特に、抗体医薬品のFc領域に付加される糖鎖の構造が抗体医薬品の薬効、物理化学的安定性、免疫原性、血中半減期など、重要な物性に影響することが報告されており<sup>1)~3)</sup>、生産ロットごとに詳細かつ多方面からの分析を行う必要がある。

抗体糖鎖が薬効に関与する機序については、抗体のFc領域と免疫反応にかかわるエフェクター細胞の表層に発現するFc受容体との相互作用が変化するためと考えられている<sup>4)</sup>。すなわち、薬効が高い抗体分子はFc受容体と強く結合し、結果としてエフェクター細胞をガ

ン細胞などの標的細胞に強く引き付けることができる。抗体医薬品の大部分を占めるIgG型抗体に結合するFc受容体としてはFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIaおよびFcγRIIIbが知られているが、特に重要なFc受容体はナチュラルキラー細胞（NK細胞）の表層に発現しているFcγRIIIaであり（図1(b)）、抗体医薬品の活性を一定に保つためには本受容体と抗体医薬品の相互作用を一定にコントロールする必要がある。

一般に抗体医薬品はCHO細胞などの培養細胞で生産されるが、その糖鎖構造は不均一であり、かつ1分子に2か所の修飾を受けることから非常に多様な分子種の混合物となっている。さらに、生産細胞株の種類はもとより、pHや通気量、栄養源濃度などの各種培養条件も糖鎖構造に影響する<sup>5)</sup>。そのため、医薬品製造時の品質のバラつきを抑制し、糖鎖構造の組成比を一定に制御するための生産技術や品質管理技術が求められる。

抗体医薬品とFc受容体の相互作用解析はELISA法や表面プラズモン共鳴（SPR）法が用いられている。しかしながら、これらの解析法は構造的に不均一な抗体混合物の平均値を与えるに過ぎず、成分組成に関する情報は得られない。また、糖鎖構造については酵素で切断後に蛍光標識しLC-MSで分析する手法が用いられているが、先述したとおり抗体分子は2か所の糖鎖修飾を受けているため、インタクト抗体の組成比そのものではないことに注意が必要である。この様な既存法における制限を解消可能な分析技術として、筆者らはFcγRIIIaを充填剤に固定化したHPLC用分析カラムTSKgel® FcR-IIIa-NPRを作製し、アフィニティクロマト法による抗体医薬品の成分分析技術を開発した。本法によれば、抗体医薬品を前処理なしに直接分析でき、糖鎖構造とFcγRIIIaへの親和性に基づく組成比の情報が得られる。本稿では、本分析カラムの仕様や基本的性質、医薬品分析への応用例を紹介する。

## 2 Fc受容体によるアフィニティ分析技術の開発

### 2.1 安定化FcγRIIIaリガンドの開発

抗体医薬品の薬効にかかわるヒトFcγRIIIaは細胞外ドメインと膜貫通領域、細胞内領域から構成される。ア

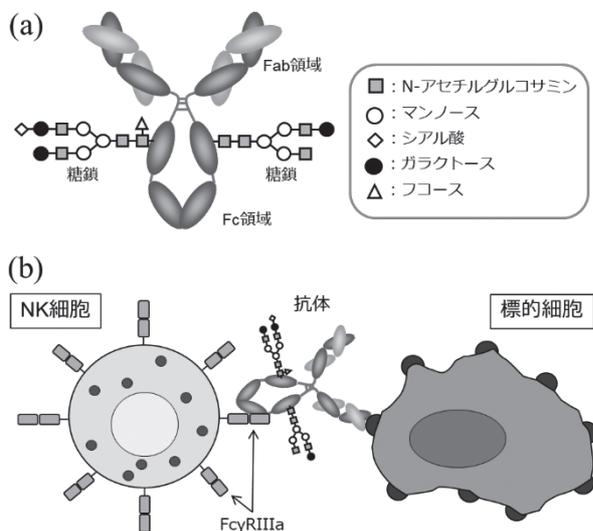


図1 抗体医薬品の構造 (a) と作用模式図 (b)

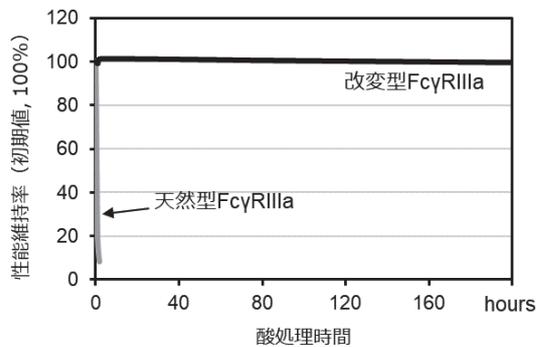


図2 FcγRIIIa リガンドの耐久性比較  
酸処理条件：pH3, 25℃

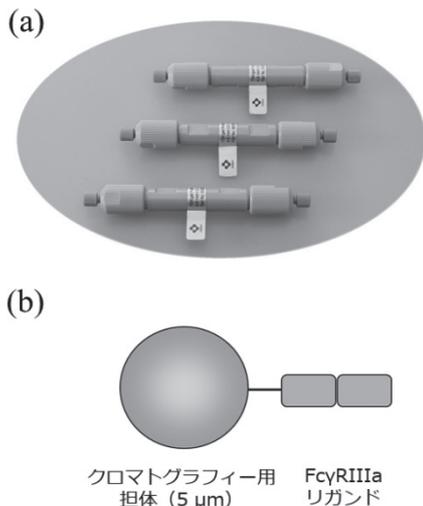


図3 開発カラムの外観 (a) と充填剤の構造 (b)

フィニッシュクロマトに用いるリガンドの構造設計に際して、抗体に結合する細胞外ドメインのみを組換えタンパク質として調製した。得られた天然型 FcγRIIIa リガンドは大腸菌などの微生物発現系で生産可能であり、かつ抗体への結合性を確認した。しかしながら、クロマト用充填剤への利用を考慮した際には安定性が十分ではなく、繰り返しクロマトグラフィーを行うと徐々に結合性が損なわれることが判明した。そこで、エラープロン PCR による変異体ライブラリ作製とスクリーニングを繰り返す進化工学的手法によりリガンドの安定性改良を行い、顕著に安定性が向上した改変型 FcγRIIIa リガンドを創製した (図 2)。

## 2.2 FcγRIIIa 固定化ゲル, HPLC カラムの開発

改変型 FcγRIIIa リガンドをクロマト用充填剤に共有結合で固定し、FcγRIIIa 固定化ゲルを調製した。固相には分離性能やロット間差を考慮して非多孔性の親水性ポリマー (5 μm) を採用した。また、カラムサイズは 4.6 mm I.D.×7.5 cm とし、部材はバイオイナートな PEEK を選択した (図 3)。

本カラムの長期的な保存安定性に関してはリガンドに依るところが大きい。リガンドの安定性を考慮した保存

表 1 開発分析カラムの諸元表

製品名	TSKgel FcR-IIIa-NPR	
基 材	非多孔性親水性ポリマー (5 μm)	
リガンド	改変型ヒト FcγRIIIa	
カラム	4.6 mm I.D.×7.5 cm, PEEK 製	
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)	
標準使用条件	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)
	流 速	1.0 mL/min
	グラジエント	0-2 分 B0 %, 2-20 分 B0 → 100 % (リニア), 20-25 分 B100 %, 25-30 分 B0 %

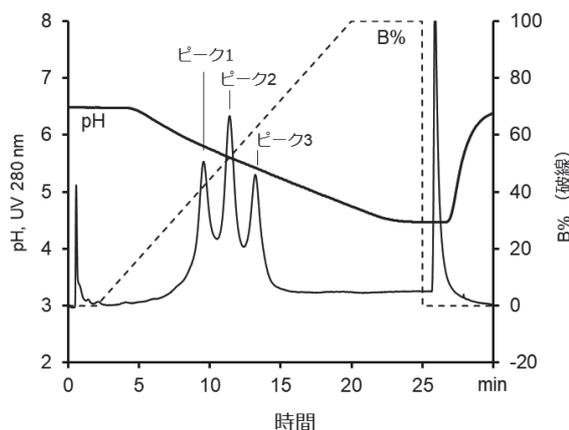


図4 抗体医薬品 A の分析例  
分析温度 25℃, その他条件は表 1 に記載

溶液組成を種々検討した結果、0.65 mM クエン酸、9.35 mM クエン酸三ナトリウム (pH6.5) に防腐剤として 0.025 % ProClin300 を添加した水溶液を保存溶液 (出荷溶媒) として使用することとし、保管温度は冷蔵 (2~8℃) とした。

本製品は東ソー株式会社より TSKgel FcR-IIIa-NPR として販売している (表 1)。

## 3 抗体医薬品の分析

多くの抗体は中性付近 (pH6.0~7.5) で FcγRIIIa に吸着し、酸性条件下 (pH4.0~5.0) で脱着するため、TSKgel FcR-IIIa-NPR によるアフィニティ分析は pH の異なる 2 液による pH グラジエント溶出法で行う。溶離液には種々の緩衝液が使用できるが、幅広い pH 範囲で緩衝能を有するクエン酸ナトリウム緩衝液が好適である。また、LC-MS 分析を行う場合には揮発性の酢酸アンモニウムを用いた緩衝液も用いることができる。

TSKgel FcR-IIIa-NPR を用いて pH グラジエント法による抗体医薬品 A のアフィニティ分析を試みた結果、三つのピークを検出した (図 4)。そこで、さらなる詳細解析を行うために各ピーク成分を単離して各種解析を行った。まず、改変型 FcγRIIIa リガンドに対する親和

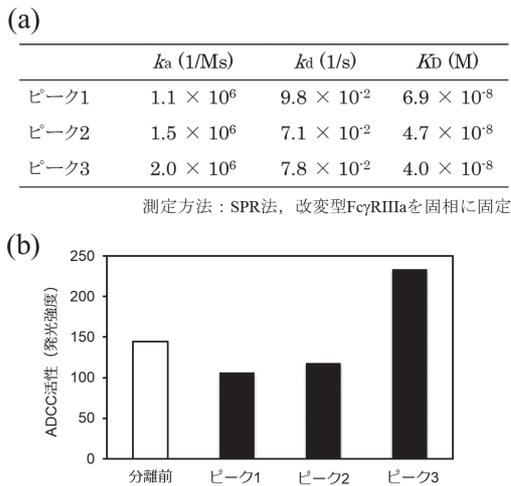


図5 抗体医薬品A分離成分の解析

(a) FcγRIIIa 親和性，(b) ADCC 活性：抗体濃度 4.1 ng/mL，反応時間 6 時間

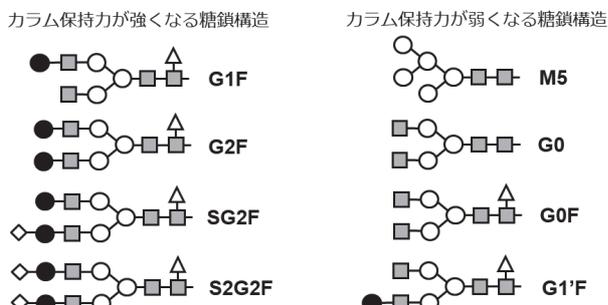


図6 抗体の糖鎖構造とカラム保持力の関連性  
単糖を示すシンボルマークは図1参照

性を表面プラズモン共鳴装置にて解析したところ，カラムから早く溶出した抗体は中性条件 (pH7.4) においても親和性が弱いことが判明した (図5(a))。すなわち，クロマトグラムの保持時間と FcγRIIIa への親和性が正の相関を示すことが明らかとなった。続いて，各ピーク成分の抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性) を測定したところ，クロマトグラムの保持時間と ADCC 活性も正の相関を示すことが判明し，FcγRIIIa への結合性が高い程，活性が高くなる結果が得られた (図5(b))。最後に，各ピーク成分の糖鎖構造を解析した結果，カラム保持力が強くなる構造と弱くなる構造が明らかとなった (図6)。抗体医薬品の Fc 領域には N-結合型糖鎖が付与されるが，糖鎖末端部に位置するガラクトース残基の有無が FcγRIIIa への親和性に影響することが判明した。

開発したアフィニティクロマト法を用いて種々のモノクローナル抗体を分析した結果，糖鎖構造の組成比に基づいて様々な分離パターンを示した (図7)。本法は抗体医薬品を特別な前処理なく直接分析可能な点に特長があり，医薬品のロット間差など糖鎖構造のバラつきを評価可能であることが示唆された。

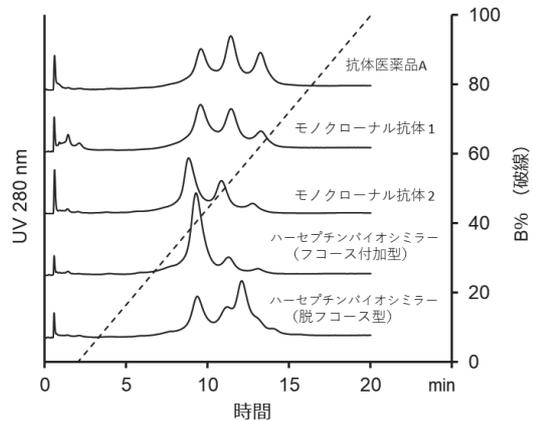


図7 各種モノクローナル抗体の分析例  
分析温度 25 °C，その他条件は表1に記載

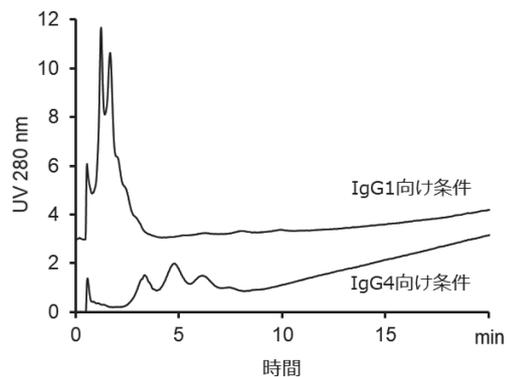


図8 IgG4 抗体の分析例

上段：分析条件は表1に記載，下段：溶離液 A を 20 mM クエン酸緩衝液 (pH6.5) に変更，その他は表1と同一，ともに分析温度 25 °C

#### 4 分析条件に関する検討

種々の検討から，FcγRIIIa リガンドと抗体の親和性は pH だけでなく，温度やイオン強度の影響を受けることが判明している。そのため，本アフィニティ分析を実施する際には，溶離液の調製を厳密に行うこと，およびカラムオープンを利用して恒温条件で分析を行うことが肝要である。また，抗体培養液などのクルードサンプルを直接分析する場合においては，夾雑成分が非特異的にカラムに吸着して抗体成分の保持力が徐々に低下する可能性がある。このようなケースにおいては，溶離液に 150 mM 程度の NaCl を添加するなど，高イオン強度条件下で分析することで非特異的な吸着を抑制でき，安定した分析を繰り返し実施できる。一方で，イオン強度を上げるとカラム保持力が低下する傾向があるため，保持時間のシフトに注意する必要がある。

このような特性を上手く利用することで，様々な抗体医薬品の分析が可能となる。一例として，ヒト IgG4 抗体の分析事例を紹介する。一般に IgG4 抗体は FcγRIIIa に対する親和性が低く，ADCC 活性も低いことが知られている<sup>6)7)</sup>。実際に IgG1 抗体向けの分析条件で IgG4 を分析すると，カラム保持力が十分でないため分析が困

表 2 開発分析カラムの諸元表

製品名	TSKgel FcR-III A-5PW	
基 材	多孔性親水性ポリマー (10 μm)	
リガンド	改変型ヒト FcγRIIIa	
カラム	7.8 mm I.D.×7.5 cm, PEEK 製	
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)	
標準使用条件	溶離液 A	50 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0)
	溶離液 B	50 mM クエン酸緩衝液 (pH4.0)
	流 速	0.3 mL/min
	グラジエント	0-10 分 B0 %, 10-130 分 B0 → 100 % (リニア), 130-150 分 B100 %, 150-180 分 B0 %

難であるが、低イオン強度条件で保持力を増大させることで分析が可能であった (図 8)。

### 5 分取クロマト用製品への展開

TSKgel FcR-III A-NPR は表面積の比較的小さい非多孔性ベースゲルを用いているため高い分離能が得られるが、一方で、一度のクロマト操作で分離できる抗体量が約 50 μg 程度に制限される。そのため、各ピーク成分を分離精製した上での詳細解析が困難であった。特に、FcγRIIIa によるアフィニティクロマト分析法を医薬品の品質管理に適用するためには分析法バリデーション<sup>8)</sup>に基づいた検証が求められ、規格値策定には各ピーク成分の構造や機能についての詳細データが不可欠である。一般に抗体医薬品の親和性解析や活性測定に必要な抗体量は少量であるが、糖鎖構造の詳細解析には約 1 mg の抗体を要する。そのため、mg オーダーでの成分分取が可能に分取用カラムを開発した。

具体的には、ベースゲルを多孔質化して表面積を増大させることで抗体吸着量の向上を図るとともに、分取用クロマト装置での使用を想定して圧力損失が小さい粒子径 10 μm 品を選択した。また、カラムサイズを 7.8 mm I.D. × 7.5 cm (3.6 mL 容) に拡大し、結果として分離可能な抗体量を FcR-III A-NPR 比で 100 倍量となる 5 mg/回まで向上させることに成功した。

本製品は TSKgel FcR-III A-5PW として販売している (表 2, 図 9)。

### 6 ま と め

近年、抗体医薬品における糖鎖構造の重要性が広く認知され、製薬企業各社では様々な製造技術による糖鎖構造と品質のコントロールが為されている。しかしながら、培養生産中の糖鎖修飾反応は細胞内で段階的に進行し、かつ厳格な制御機構がないことから、糖鎖構造の完全な均一化は困難である。この様な背景のもと、今回開発した FcγRIIIa を用いたアフィニティクロマト分析技

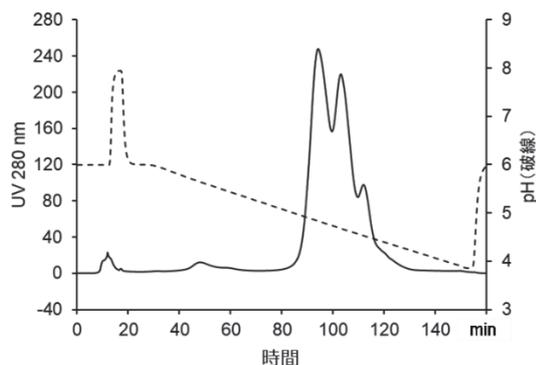


図 9 FcR-III A-5PW によるモノクローナル抗体の分離例  
抗体量 5 mg, 温度 25 °C, 分離条件は表 3 に記載

術は簡便で迅速な抗体糖鎖の分析を可能とし、抗体医薬品の品質向上の一助になると期待している。また、本法は抗体医薬品の品質管理だけでなく、抗体生産細胞株のスクリーニングや培養生産中の糖鎖構造モニタリングなど、製薬企業における研究開発や製造工程管理においても応用が可能である。

本分析法に関して、現在までに複数の研究機関から技術論文が報告されており<sup>9)~14)</sup>、今後、本格的な社会実装が期待される。是非、これらの論文も参照されたい。

謝辞 本研究開発の推進に多大なるご尽力とご協力を賜りました東京大学大学院工学系研究科の津本浩平教授、Jose M. M. Caaveiro 博士 (現、九州大学薬学研究院准教授)、木吉真人博士 (現、国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部)、長門石暁博士 (現、東京大学医科学研究所特任准教授) に心から感謝申し上げます。また、本研究開発の一部は AMED (課題番号 JP17ac 0101003) 支援の下、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合で行われました。

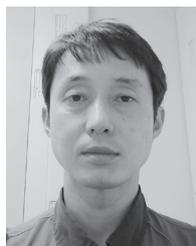
### 文 献

- 1) M. Schiestl, T. Stangler, C. Torella, T. Cepeljnik, H. Toll, R. Grau : *Nat. Biotechnol.*, **29**, 310 (2011).
- 2) J. Fang, J. Richardson, Z. Du, Z. Zhang : *Biochemistry*, **55**, 860 (2016).
- 3) D. Reusch, M. Tejada : *Glycobiology*, **25**, 12, 1325 (2015).
- 4) R. L. Shields, J. Lai, R. Keek, L. Y. O'Connell, K. Hong, Y. G. Meng, S. H. A. Weikert, L. G. Presta : *J. Bio. Chem.*, **277**, 30, 26733 (2002).
- 5) P. Hossler, S. F. Khattak, Z. Jian : *Glycobiology*, **19**, 9, 936 (2009).
- 6) M. Brueggemann, G. T. Williams, C. I. Bindon, M. R. Clark, M. R. Walker, R. Jefferis, H. Waldmann, M. S. Neuberger : *J. Exp. Med.*, **166**, 1351 (1987).
- 7) P. Bruhns, B. Iannascoli, P. England, D. A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, M. Daeron : *Blood*, **113**, 16, 3716 (2009).
- 8) International Conference on Harmonization of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q2 (R2).
- 9) 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).
- 10) R. Wada, M. Matsui, N. Kawasaki : *mAbs*, **11**, 2, 350 (2019).

- 11) H. Kosuge, S. Nagatoishi, M. Kiyoshi, A. Ishii-Watabe, T. Tanaka, Y. Terao, S. Oe, T. Ide, K. Tsumoto : *Biotechnol. Prog.*, e3016 (2020).
- 12) D. W. Woodall, T. M. Dillon, K. Kalenian, R. Padaki, S. Kuhns, D. J. Semin, P. V. Bondarenko : *mAbs*, **14**, 1, e2004982 (2022).
- 13) B. Yao, D. Zhang, W. Cao, G. Yang, W. Li, X. Hui, P. Ouyang, G. Chen, B. Liu : *BioMed Res. Int.*, ID 7868391 (2022).
- 14) A. Chakrabarti, J. Kervinen, E. Mueller, T. Tanaka, K. Muranaka : “*Monoclonal Antibodies*”, Chapter 4, p81 (2021), (IntechOpen, London).



村中和昭 (Kazuaki MURANAKA)  
 東ソー株式会社バイオサイエンス事業部  
 第二開発部 (〒746-8501 山口県周南市  
 開成町 4560). 茨城大学理学部化学科 (学  
 士). 《趣味》家庭菜園, 釣り.  
 E-mail : kazuaki-muranaka-xf@tosoh.co.jp



田中 亨 (Toru TANAKA)  
 東ソー株式会社ライフサイエンス研究所  
 (〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-  
 1). 東京農工大学大学院工学府 (修士).  
 《現在の研究テーマ》 改変タンパク質を用  
 いたアフィニティークロマト用充填剤の開  
 発. 《趣味》ランニング, サッカー, ス  
 ノーボード.  
 E-mail : tooru-tanaka-pb@tosoh.co.jp



井出輝彦 (Teruhiko IDE)  
 東ソー株式会社執行役員ライフサイエン  
 ス研究所長兼東京研究センター長 (〒252  
 -1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-1).  
 千葉大学大学院園芸学研究科農芸化学専  
 攻 (理学博士). 《主な著書》 “コンビナト  
 リアル・バイオエンジニアリング”. (化  
 学同人).  
 E-mail : teruhiko-ide-zj@tosoh.co.jp

会社ホームページ URL :

<https://www.tosoh.co.jp/>

関連製品ページ URL :

<https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>