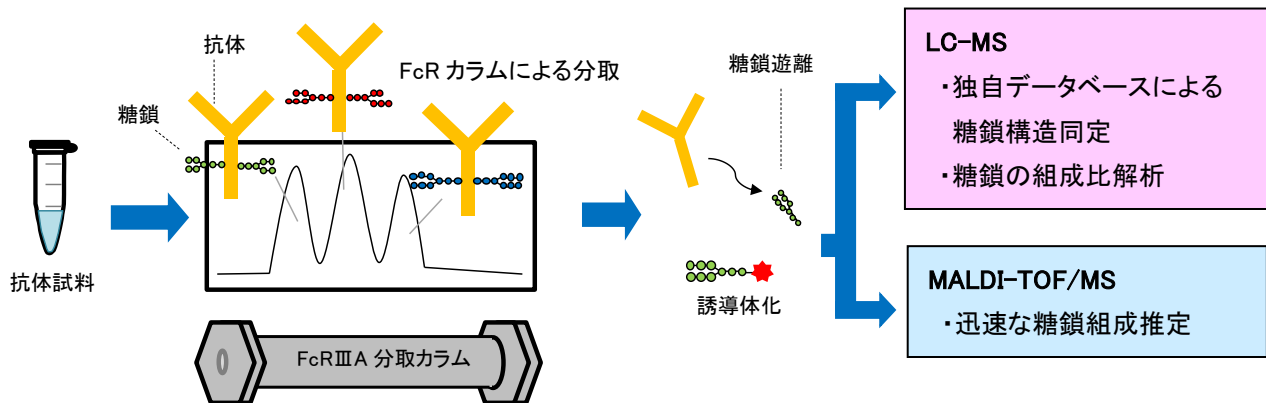


【技術資料】抗体分離と糖鎖構造解析 - FcRⅢA 分取用カラムを用いた抗体分離と糖鎖構造解析 -

【概要】

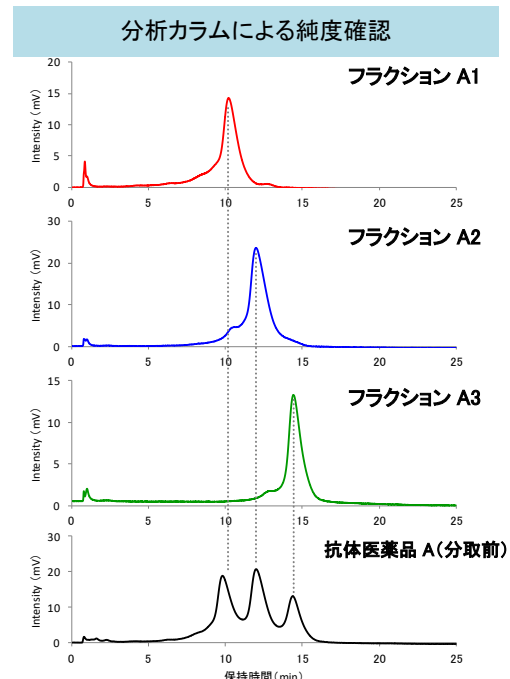
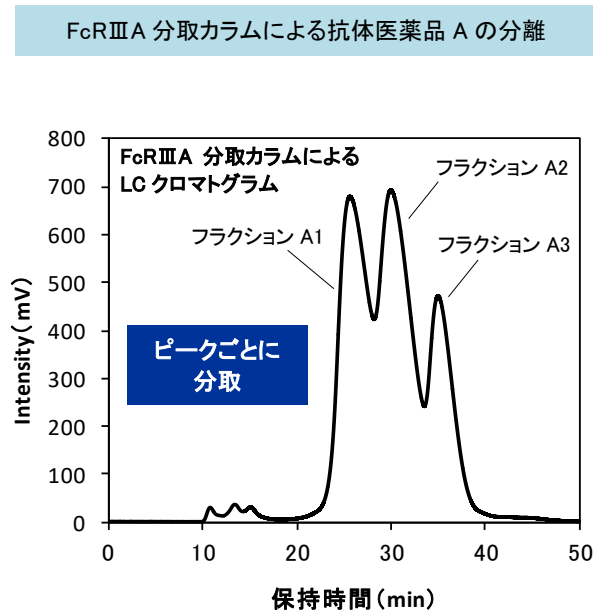
FcRⅢA カラム[※]は、抗体 Fc 領域の糖鎖を認識し、活性に基づき抗体を分離する世界初のアフィニティーカラムです。FcRⅢA カラムの抗体負荷量を大きくした分取用カラムを用いて抗体を迅速に分離・分取し、得られた抗体画分の N 結合型糖鎖の構造解析を行うことが可能です(Fig. 1)。^{※東ソー株式会社開発}



【Fig. 1】 FcRⅢA 分取抗体糖鎖解析の流れ

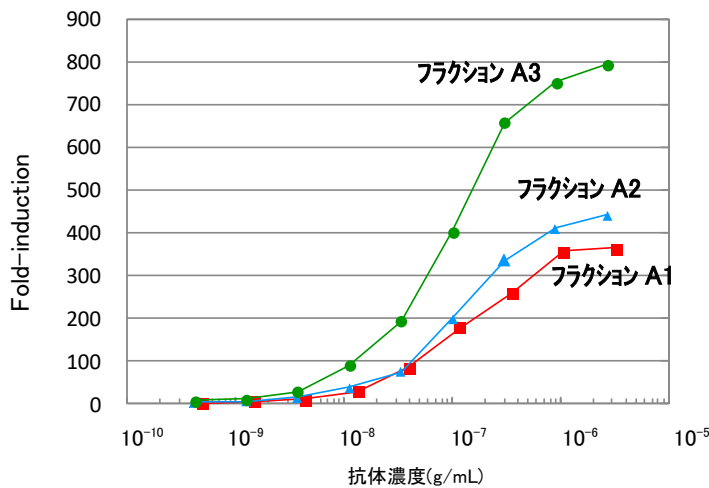
【抗体医薬品 A の解析例】

市販の抗体医薬品 A を FcRⅢA 分取カラムで分離・分取し、抗体活性測定および糖鎖解析をした例を以下に示します。抗体医薬品 A を FcRⅢA 分取カラムで分離し、ピークごとに分取しました。分取したフラクションはそれぞれ FcRⅢA 分析カラムにより純度の確認を行い、目的のピークがほぼ単離できていることを確認しました(Fig. 2)。



【Fig. 2】 FcRⅢA カラムによる抗体医薬品 A の分離・分取及び純度確認

分取した各フラクションの ADCC (抗体依存性細胞障害) 活性を測定した結果を、Fig. 3 に示します。ADCC をルシフェラーゼの発光シグナルにより検出する手法^{※2}を用いて、活性測定を行いました。その結果、発光強度比はカラムの溶出時間の遅いフラクションほど大きく、EC₅₀ (50%効果濃度) はカラムの溶出時間の遅いフラクションほど小さいことが分かりました (Table 1)。以上から、カラムの溶出時間の遅いフラクションほど ADCC 活性が高いと考えられます。 ^{※2} ADCC レポーターバイオアッセイ (プロメガ株)



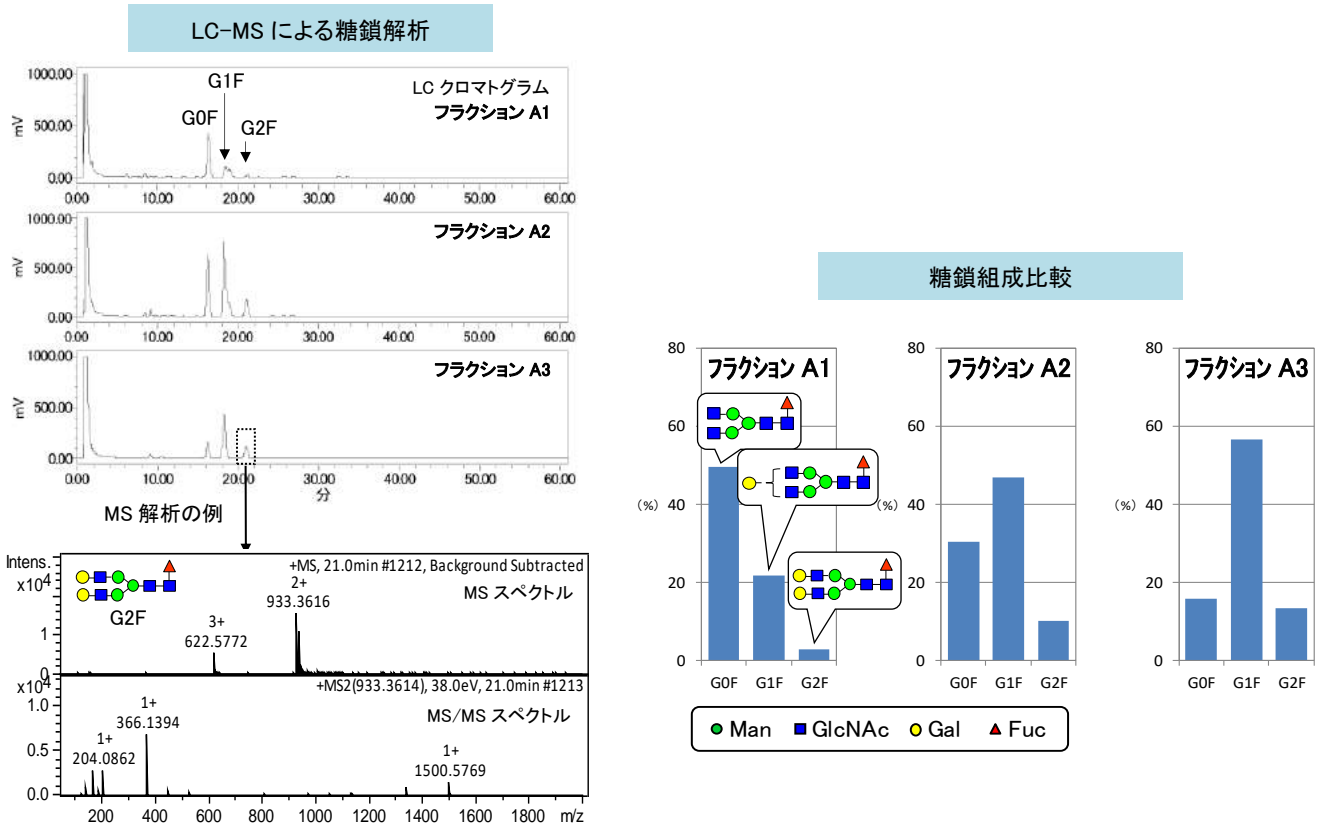
【Table 1】 EC₅₀ 算出結果

	EC ₅₀ (μg/mL)
フラクション A1	0.14
フラクション A2	0.12
フラクション A3	0.10

【Fig. 3】 各フラクション中抗体の ADCC 活性測定結果

各フラクションの抗体の糖鎖解析と、糖鎖 (G0F、G1F、G2F) の組成比較を LC-MS により行いました (Fig. 4)。FcRⅢA カラムの溶出時間の遅いフラクションほど、非還元末端側にガラクトースが付加した糖鎖の割合が多くなる傾向が確認されました。糖鎖の非還元末端側ガラクトース残基の数が多いほど抗体の CDC (補体依存性障害) 活性が高いことが報告されており¹⁾、糖鎖解析の結果から、FcRⅢA カラムの溶出時間が遅いフラクションほど CDC 活性が高いことが推測できます。

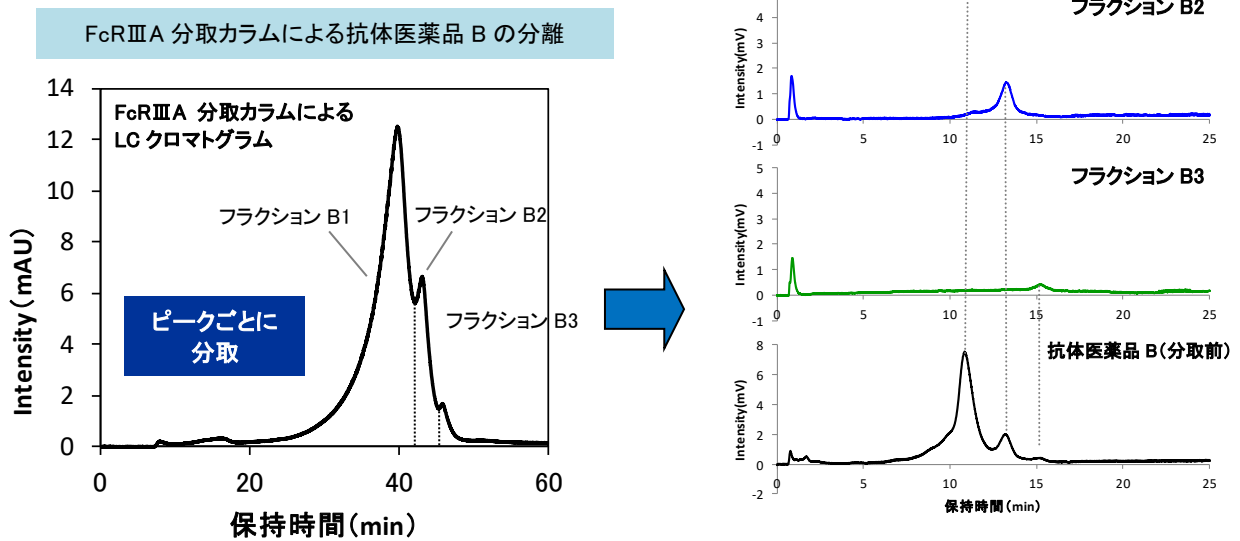
1) Hodoniczky J., Zheng Y. Z., James D. C., *Biotechnol. Prog.*, 2005, **21**, 1644–1652



【Fig. 4】 FcRⅢA カラムにより分離した抗体医薬品 A の各フラクションの糖鎖解析結果

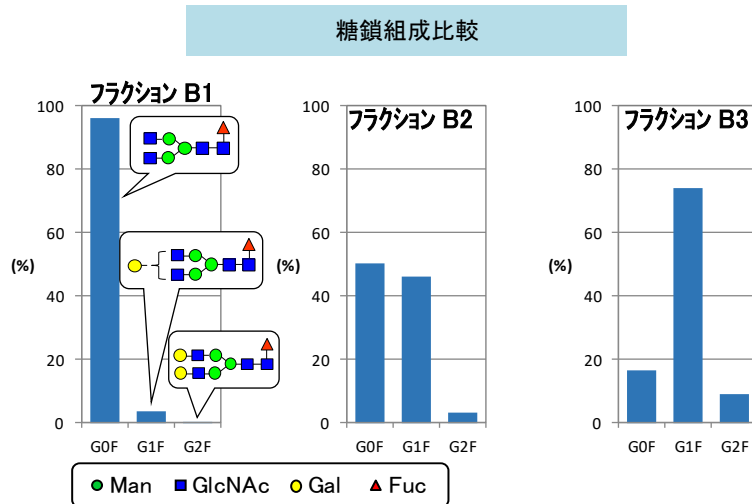
【抗体医薬品 B の解析例】

上記とは異なる抗体医薬品 B を FcRⅢA 分取カラムで分離・分取し、糖鎖解析をした例を以下に示します。Fig. 5 に分取カラムによるクロマトグラムと分取フラクションの分析カラムによる純度確認結果を示します。分析カラムにより目的のピークがほぼ単離できていることを確認しました。



【Fig. 5】 FcRⅢA カラムによる抗体医薬品 B の分離・分取及び純度確認

各フラクションの抗体の糖鎖(G0F、G1F、G2F)組成比較を LC-MS により行った結果、抗体医薬品 A の場合と同様 FcRⅢA カラムの溶出時間の遅いフラクションほど非還元末端側にガラクトースが付加した糖鎖の割合が多くなる傾向が確認され、CDC 活性が高いことが推測出来ます (Fig. 6)。



【Fig. 6】 FcRⅢA 分取抗体 (抗体医薬品 B) の糖鎖解析結果

FcRⅢA カラムで分取した抗体の糖鎖構造解析は、抗体のロット間差分析、抗体産生細胞培養状態のモニタリング等に有用であると考えられます。

FcRⅢA カラム開発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た。

課題番号：JP17ae0101003

キーワード：抗体医薬品、IgG、糖鎖、ADCC 活性