

## 抗体医薬品の迅速な糖鎖分析を目指して

豊田 雅哲

## 概 要

糖タンパク質性バイオ医薬品の開発や製造において糖鎖分析は必須である。これまで弊社(住友ベークライト)は、さまざまな糖タンパク質の糖鎖分析にユニバーサルに対応できる糖鎖調製キット (BlotGlyco<sup>®</sup>キット)を開発・販売してきた。近年、糖タンパク質性バイオ医薬品の中でも抗体医薬品に特化した迅速かつ簡便な糖鎖分析が求められている。このような背景の下、抗体医薬品に特化した迅速かつ簡便な糖鎖調製キット (EZGlyco<sup>™</sup> mAb-N Kit with 2-AB, 以下EZGlyco<sup>™</sup>キット)を開発し上市した。その後、このEZGlyco<sup>™</sup>キットを用いて自動で糖鎖調製できる自動化装置 (GlycoAutoPrep<sup>™</sup>)を開発し、2018年から販売を開始している。本稿では、これらの詳細について紹介する。

## 抗体医薬品と糖鎖

従来の医薬品は低分子医薬品が中心であったが、近年は抗体医薬品に代表されるバイオ医薬品が市場の約半分を占める。低分子医薬品と抗体医薬品の大きな違いの一つとして製造方法があげられ、低分子医薬品は化学合成で製造されるのに対し、抗体医薬品は細胞を用いて製造される。そのため抗体医薬品は細胞の培養条件が変化すると、生産物となる抗体医薬品の構造に影響が及ぶ。特に抗体医薬品に結合している糖鎖は、培地成分や培養条件、培養方法、時間、スケールの違いによって構造やパターンが変動する<sup>1)</sup>。抗体医薬品の糖鎖は、医薬品としての特性(薬効、物性、体内動態)や安全性などを左右するため、詳細な糖鎖構造や糖鎖パターンを調べることが求められている。

EZGlyco<sup>™</sup>キットの開発

抗体医薬品は細胞培養により生産され、抗体は培養液中に含まれる。培養液には夾雑物(抗体以外のタンパク質、培地由来の物質など)が多く含まれており、抗体の糖鎖分析を行うためにはまず、①培養液からの抗体精製を行う必要がある。その後、②抗体からの糖鎖の切り出し、③糖鎖精製、④糖鎖の蛍光ラベル化までを行い、LC分析する流れが一般的である。従来は、①~④の工程を

単独で行うことが多く、それぞれ数時間~1日程度の時間を要していたため、トータルで1~2日程度の時間が必要であった。筆者らは各工程の中で時間短縮・操作改善が可能な操作を抽出し、操作の省略、工程の統合化をすることで、迅速かつ簡便に糖鎖調製できるキットの開発に着手した。

糖鎖を調製する工程の中で、②抗体からの糖鎖の切出しは、抗体の還元アルキル化、トリプシン消化、PNGase F(糖鎖遊離酵素)処理による煩雑かつ時間も要する操作を経て行われる。この煩雑な操作(還元アルキル化+トリプシン消化)を省略し、単純にPNGase F処理のみで糖鎖の切出しを行うことが可能か検討した。比較検討のために処理対象の糖タンパク質としてヒト由来の抗体(IgG)、ウシ由来のリボヌクレアーゼB(RNase B)、ウシ由来の甲状腺刺激ホルモン(TSH)を用いた。これら3種の糖タンパク質について、PNGase F処理のみ行った場合(処理A)と煩雑な操作後にPNGase F処理を行った場合(処理B)とで検出される糖鎖パターン、収量を比較した。得られた糖鎖は2-アミノベンズアミド(2-AB)で蛍光標識し、LC分析を行った(図1)。その結果、3種の糖タンパク質ともすべて、処理Bを行った場合が収量もよく、多数の糖鎖のピークが検出された。しかしながら、IgGは処理Aでも、処理Bを行った場合の収量やピークパターンにもっとも近く、IgGの糖鎖がPNGase F処理のみでも糖鎖が切出されやすいことが判

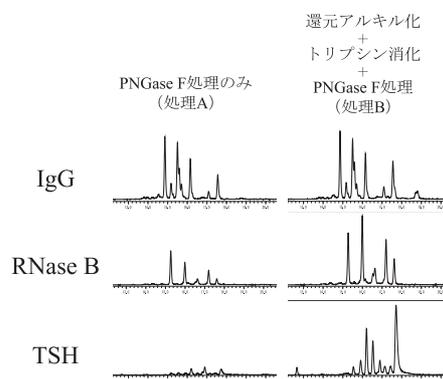


図1. 3種の糖タンパク質 (IgG, RNase B, TSH) をPNGase F処理のみ(処理A)行った場合(左図)、還元アルキル化しトリプシン消化後にPNGase F処理(処理B)を行った場合(右図)



図2. 抗体医薬品専用の糖鎖前処理キットEZGlyco™ mAb-N Kit with 2-AB

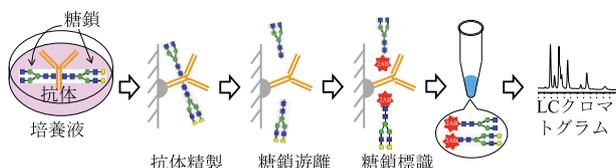


図3. EZGlycoキットを用いた糖鎖調製の流れ

明した。

そこで、対象となる糖タンパク質をヒト由来の抗体(IgG)に限定し、単純な処理Aのみでも十分な糖鎖の切出しが行える手法を検討した。その結果、前工程である①培養液からの抗体精製の際、固相上の抗体に糖鎖遊離を促進する前処理を行い、その後固相上で処理Aを行うことで、煩雑な処理Bを行った結果と同等の結果が得られた。

このような各工程の検討および前後の工程との統合を図り、上記①～④の工程を約2.5時間で完了可能な抗体医薬品専用の糖鎖前処理キットEZGlyco™ mAb-N Kit with 2-AB(図2)を開発することができた。本キットを用いた糖鎖調製は、図3に示すように多くの工程を固相上で行うことを特徴としている。本キットは、必要な試薬類をすべてキットに同梱しており、プロトコルに従いマニュアルで操作するキットとなっている(2016年より販売開始)。本キットの開発および製品化は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合(MAB)を通じた関係者との相互交流によるものである。

### GlycoAutoPrep™の開発

開発したEZGlyco™キットの製薬企業での活用が進む中、本キットはマニュアル操作向けであるため、取り扱うサンプル数が多くなると、マニュアル操作では限界があり、ヒューマンエラーや精度面から自動化に対する要望が製薬企業からよせられた。そこで、EZGlyco™キットを自動で処理できる自動化装置の開発に取り組んだ。

EZGlyco™キットのマニュアル操作には、「カラムに通液させる操作」「チューブに溜まった溶液を廃棄する操作」「溶液の吸引吐出操作」「カラム、チューブ、チップ類の移動操作」が必要である。これらの各操作を効率よく自動で行うことができる方式、機構の開発を行った。

まず、「カラムに通液させる操作」の方式について検討した。この操作には、吸引方式と遠心方式の二つの方式が考えられた。EZGlyco™キットは、1本のミニカラムに複数の溶液を順次添加し通液させる工程があり、前工程の液残りが次工程に影響を及ぼしやすい。そのため、通液後に液残りの少ない方式が求められる。この二つの方式を検討し、より液残りの少ない遠心方式による通液法を本自動化装置に採用した。

次に、「チューブに溜まった溶液を廃棄する操作」について検討した。この操作は、処理数が多くなると処理時間の増加につながる。そこで、この操作の時間短縮のために、専用のチューブと遠心ローターの開発を行い、遠心時に同時に廃液を行う方式にすることで、この操作を省略化することが可能となり、時間短縮を実現できた。

「溶液の吸引吐出操作」については、自動分注ノズルとディスポーザブルチップの組合せで操作する機構を用いた。自動化装置を試作し、実際に多数のサンプル処理を実施する検討の中で、微量の酵素溶液(PNGase F含有溶液)をカラムに添加する際に、チップから吐出した溶液がチップの外壁に回り込み、カラム担体への添加が不十分になる現象がみられた。この問題を解決するために、液切れ性が高く、チップの外壁に溶液が回り込みにくい高撥水性のチップを採用し、さらに、微量の溶液がチップから吐出と同時にカラム担体に浸透するように、チップの添加位置、および吐出タイミングを最適化した。この改良法を用いることで、微量溶液を安定してカラム担体へ添加することが可能となった。

「カラム、チューブ、チップ類の移動操作」については、メカニカルチャックアームおよび自動分注ノズルを用いた。これらの機械駆動部の動作は、本装置の扉を開けると自動で止まる機構を備えており、安全にも配慮している。遠心機についても、自動で回転や位置決め制御を行うものを用いており、安全のため回転時は自動でカバーが閉じる機構になっている。

試薬類、カラム、チューブを入れるラックは、ヒーター部分を除き、取り外し可能であり、これら消耗品類をセットしやすくなっている(図4)。チップをセットするラックはチッププレートを同時に2枚置くことができる(図4)。最大処理数で処理を行ったとしても、チッププレートを1枚使い切ることはないため、使用の際はチッププ



図4. GlycoAutoPrep™の試薬類、カラム、チューブ、チップのセット部。①：試薬ラック，②：チューブラック，③：カラムラック，④：ヒーター部分，⑤：チップラック。



図5. GlycoAutoPrep™の操作画面

レートを一枚使い切った時点で補充すればよく、チップ補充の手間やチップの無駄が少ない方式となっている。

本自動化装置の操作はタッチパネルのコンピュータで行う。ソフトを立ち上げ、サンプル処理数を入力した後は、「実行」ボタンを押すのみである(図5)。その後は精製された蛍光標識糖鎖が得られるところまで完全自動化となっている。設置に当たって、装置は床置きタイプとなっている。また、アセトニトリルなどを使用(80 mL以下)するため、排気設備が必要となる。

このような検討および改良を積み重ね、EZGlycoキットを全自動で処理できる自動化装置GlycoAutoPrep™(図6)を開発することができた。本装置は、試料となる抗体溶液をセットしてから蛍光標識された糖鎖を調製するまで4時間以内に処理可能であり、最大処理数は24サンプルである。本装置は2018年から販売を開始している。

開発したGlycoAutoPrep™に用いるカラムやチューブ、チップ類の形状は重要である。そのため、GlycoAutoPrep™用のEZGlycoキット(Auto-EZGlyco™ mAb-N Kit with 2-AB(図7))を用意しており、必要なカラム、チューブ類を同梱している。本キットは、GlycoAutoPrep™と同時に販売を開始している。



<設置仕様>

サイズ・重量	幅110×奥行70×高さ132 cm (扉を開けた状態の最大高さ=182 cm) 150 kg (床置きタイプ)
設置スペース	幅130×奥行90×高さ200 cm
電源	100 V コンセント 15 A 1個 200 V 単相 コンセント 20 A 1個 (=NEMA L6-20) , 直結 (端子台接続でも可)
排気	アルミダクト出し (外径 70 mm, 内径 60 mm) シロコファン流量・・・最大0.44 m <sup>3</sup> /min
使用環境	温度:10~30℃, 湿度:10~90% (結露なきこと)

図6. EZGlycoキットを全自動で処理できる自動化装置GlycoAutoPrep™および設置仕様



図7. GlycoAutoPrep™専用のキット Auto-EZGlyco™ mAb-N Kit with 2-AB

まとめ

バイオ医薬品の糖鎖分析において糖鎖サンプルを調製する方法はいくつか提案されているが、標準化された方法はない。培養液から抗体の糖鎖調製を行う方法は、品質管理だけでなく、創薬スクリーニング、プロセス開発、連続生産における糖鎖の管理システムとしても有用である。筆者らは、開発した本手法を標準化手法として仕上げていく。今後は、MABで取り組む次世代の抗体医薬品製造プラットフォームとなることが期待されている連続生産技術に向けた連続生産プロセス高度化のための生産管理・品質分析技術の開発にも貢献していきたい。

## 謝 辞

本研究の一部は、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（JP18ae0101057）の支援によって行われた。

## 文 献

- 1) Costa, A. R. *et al.*: *Crit. Rev. Biotechnol.*, **34**, 281 (2014).