

**2P-081 定量的レーザー回折散乱法によるバイオ医薬品の凝集性評価**

○山本 岳<sup>1</sup>, 十時 慎一郎<sup>2</sup>, 内山 進<sup>1</sup>, 福井 希一<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>阪大院・工, <sup>2</sup>島津製作所)  
 suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp

抗体医薬等のバイオ医薬品はガンや自己免疫疾患の治療において成功を取っており、さらに増加傾向にある。ただしバイオ医薬品の有効成分は蛋白質であるため、生産から保管の間に受ける攪拌や振とう等により凝集体を形成する。近年、蛋白質凝集体の中でも、Subvisible particle (SVP) と呼ばれる 100 nm~10 μm の凝集体が免疫原性を持つことが報告され、SVP の適切なモニター、さらには、SVP の量を減らす努力が求められている。現在、200 nm 以下および 2 μm 以上の SVP は適切なモニターが実現されつつあるが、200 nm~2 μm の SVP のモニター手法は開発途上にある。本研究では定量的レーザー回折散乱法(qLD)によるバイオ医薬品に含まれる SVP の定量的評価を目的に研究を進めた。qLD として島津製作所製 Aggregates Sizer を用いた。蛋白質凝集体のように屈折率が溶媒(水)と近い場合でも qLD が有効に検証するため、水と屈折率が近いシリカ粒子について解析を行った。その結果、シリカ粒子の屈折率として正確な実験値(1.43)を用いれば、200 nm~10 μm の粒子サイズと量を評価可能であることが分かった。そこで免疫グロブリン (IVIG) について凝集体を作製し屈折率を実験的に 1.46 と決定し以降の解析に用いることとした。IVIG に加熱または振とうストレスを加え、発生する SVP の散乱パターンを測定し解析を行ったところ、200 nm~10 μm にサイズ分布を持つ SVP の定量的評価に成功した。qLD はバイオ医薬品に含まれる SVP を適切に評価可能であり、今後、製造現場等での利用が期待される。

**Quantitative laser diffraction method for the assessment of protein subvisible particles**

○Gaku Yamamoto<sup>1</sup>, Shinichiro Totoki<sup>2</sup>, Susumu Uchiyama<sup>1</sup>, Kiichi Fukui<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Shimadzu Corp.)

**Key words** protein aggregation, antibody, biopharmaceutical

**2P-082 抗体凝集機構におけるマルチドメイン構造の階層性**

○八桁 清樹<sup>1</sup>, 本田 真也<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>東大院・新領域, <sup>2</sup>産総研・バイオメディカル)  
 s.honda@aist.go.jp

抗体医薬品はがんなどに対する新しい治療薬として今後も需要の拡大が見込まれている。需要拡大に合わせ、製造効率の向上やコスト低下、輸送・保存における品質維持技術が求められ、その実現のためには、抗体のタンパク質としての物性を正しく理解する必要がある。我々は、抗体医薬品の生産性や品質・安全性に悪影響を及ぼす凝集反応に着目し、その発生メカニズムを解析している。抗体は、物性の異なる複数種のドメインから構成されるマルチドメインタンパク質であり、抗体凝集反応は異なる物性をもつドメイン間の複雑な相互作用に基づいている。しかし抗体全体(インタクト抗体)を用いた凝集反応の解析では、各ドメイン固有の凝集反応に関連する物性変化や相互作用について詳細な情報を得ることは難しく、抗体凝集反応の分子論的なメカニズムを解明することは困難である。そこで本研究では、各ドメイン固有の物性や凝集のしやすさをより明確に理解するため、IgG1 の定常領域を構成するドメイン(CH2, CH3, CL, CH1-CL ヘテロダイマー)を個別に合成し、広範な酸性溶液条件下(pH 2-8, 0-300 mM NaCl)におけるコンホメーション状態と凝集反応を解析した。解析の結果、酸変性を生じた CH3 と CH2 が特に凝集体を生じやすいことが確認され、またこれら2つのドメイン間でコロイド化学的な安定性が異なることが明らかとなった。本研究成果により、抗体が中性から酸性に至る各溶液条件下に曝された時、抗体にどのようなコンホメーション変化や凝集反応が起こるかを、ドメイン単位の物性変化に基づいて予測することが可能となった。

**The hierarchy of the antibody aggregation mechanism of the multi-domain protein architecture**

○Seiki Yageta<sup>1</sup>, Shinya Honda<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Front. Univ. Tokyo, <sup>2</sup>Biomed. Res. Inst., AIST)

**Key words** antibody, aggregation

**2P-083 Fc 融合型二重特異性抗体の安定性の向上を目指したヒンジ領域の設計**

○浅野 竜太郎, 今野 翔太, 尾形 裕末, 下村 一平, 梅津 光央,  
 熊谷 泉  
 (東北大院・工)  
 ryutaro@prn.che.tohoku.ac.jp

二重特異性が介する治療効果に加えて、抗体依存性細胞傷害活性などのエフェクター効果を誘導可能、かつプロテイン A を用いた精製も可能な Fc 融合型二重特異性抗体は、次世代抗体として有望な形態であるが、医薬化を加速させるためには、その詳細な分子特性を明らかにする必要がある。そこで、がん関連抗原と T 細胞の表面抗原を標的とした Fc 融合型二重特異性抗体をモデルに、安定性評価とその向上を目指した分子設計を行った。まずゲル濾過で分取した Fc 融合型二重特異性抗体を用いて、長期保存に於ける安定性を評価した結果、保存条件により進行は異なるものの、主としてヒンジ部分での断片化が認められた。興味深いことに、抗原結合ドメインの連結順を入れ換えた配向性改変体では、断片化の明らかな軽減がみられたが、保存期間の延長に伴い、徐々に同様の断片化が進行したため、その本質的な抑制に向けて、ヒンジ領域の改変に取り組んだ。より強固な配列への改変を目的に、データベース等を用いて探索し、天然のタンパク質中でもドメイン間を繋ぐリンカー様の役割を担っているヘリックス配列を選択した。既に組換えタンパク質の連結にも用いられた実績もあるこのヘリックス配列を基に、置換するヒンジ配列の長さや天然のヒンジ配列の情報を踏まえた新たなリンカー配列を設計し、従来のヒンジと入れ換えたところ、顕著な断片化の軽減がみられた。今後は、ヒンジを改変したことによる機能への影響を評価する予定である。本研究は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の再委託を受けて実施した。

**Design of a hinge region in a Fc-fused bispecific antibody for increasing stability**

○Ryutaro Asano, Shota konno, Hiromi Ogata, Ippei Shimomura, Mitsuo Umetsu, Izumi Kumagai  
 (Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.)

**Key words** antibody, protein engineering, bispecific antibody, Fc fusion protein

**2P-084 二次元電気泳動技術を用いた抗体医薬評価方法の検討**

○後藤 真一, 矢部 公彦, 松永 貴輝, 木下 英樹  
 (シャープ株式会社)  
 hideki.kinoshita@sharp.co.jp

**【目的】**

抗体医薬は、生合成の過程で、糖鎖修飾などの翻訳後修飾、ジスルフィド結合による高次構造形成など、複雑な物理化学的特性が付加され形成される不均一性のある生体高分子である。近年、抗体医薬の高機能化、製造工程の改良、品質管理の観点から、抗体医薬の詳細な構造を解析可能な分析技術、評価方法が要望されている。今回、我々は、抗体医薬の高精度な評価方法を確立することを目的とし、二次元電気泳動の自動化装置 (Auto2D) を用いた評価方法を検討した。

**【方法と結果】**

今回、抗体医薬の高精度な二次元電気泳動を目指して、等電点電気泳動用ゲルの開発および、抗体医薬の前処理、膨潤、電気泳動条件の最適化を行った。等電点電気泳動用ゲルは、アクリルアミドゲル組成が T=3.6%, C=2.7% のときに高分子量タンパク質を好適に吸収し、分解能よく等電点電気泳動可能なことを確認した。また、等電点電気泳動のみ還元剤 Dithiothreitol を添加しない条件(非還元条件)を確立し、二次元電気泳動をした結果、抗体医薬の H 鎖と L 鎖の等電点の位置がほぼ同じ位置に検出されたため、非還元条件下での等電点電気泳動では抗体医薬目的成分の構造が保たれていると推察された。さらに、抗体医薬のグライコフォーム分離を検出でき、各種抗体医薬を詳細に比較解析できた。

**【考察】**

今回、二次元電気泳動の自動化装置を利用することにより、100 分で、抗体医薬を高精度に分離、解析できた。一連の品質評価方法の実用化可能性を確認できた。

**Evaluations of an antibody drug by using two dimensional electrophoresis**

○Shinichi Goto, Kimihiko Yabe, Takateru Matsunaga, Hideki Kinoshita  
 (Sharp corporation)

**Key words** antibody, two dimensional electrophoresis