

2P-229 質量分析を用いた抗体試料中不純物評価技術の開発

○藤井 紳一郎^{1,2}, 絹見 朋也^{1,2}, 稲垣 和三^{1,2}, 高津 章子¹
(¹産総研・物質計測標準, ²MAB組合)
s-fujii@aist.go.jp

【背景と目的】 バイオ医薬品開発において、不均一性評価は品質管理上重要である。抗体分子の構造変化と共に、抗体試料に含まれる不純物も不均一性の要因となりうる。本研究では、抗体試料中に混在する不純物タンパク質、核酸などを質量分析によって定量的に評価する技術を構築した。
【方法】 タンパク質を対象とした評価技術では、アミノ酸点変異導入タンパク質を内標準としたLC/MS/MS法を用いた。C反応性タンパク質(CRP)をモデルとして試料溶液へ既知量添加し、点変異導入CRPを内標準として質量分析による定量を行った。核酸を対象とした評価では、核酸分子内リンを指標とし、新規開発試料導入装置を搭載した誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)による定量を実施した。DNAを試料溶液へ既知量添加し、サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)で分離した後、ICP-MSでりん定量法を実施した。
【結果】 CRP定量においては、調製濃度1μg/mLとしたところ、点変異導入内標準法を用いた測定結果は1.2±0.2μg/mLであった。DNA中りん定量においては、SECで高分子DNAとりん含有低分子化合物を分離でき、抗体濃度比1ppm以下の抗体溶液中DNAを定量可能であった。

Development of analytical methods for impurities in antibody solution using mass spectrometry

○Shin-ichiro Fujii^{1,2}, Tomoya Kinumi^{1,2}, Kazumi Inagaki^{1,2}, Akiko Takatsu¹
(¹NMIJ, AIST, ²MAB)

Key words protein, nucleic acid, impurities, mass spectrometry

2P-230 酸ストレスによる抗体の凝集化

○今村 比呂志^{1,2}, 本田 真也^{1,2}
(¹産総研・バイオメディカル, ²MAB組合)
s.honda@aist.go.jp

抗体医薬品の製造プロセスでは、アフィニティーカラムによる精製が標準となっている。そこでは酸を用いて抗体が溶出され、一時酸変性状態となる。その後、溶液を中和して立体構造のリフォールディング反応を誘起し、天然状態の抗体を得るが、一部非天然構造状態の抗体が現れる。この非天然構造状態は、免疫反応を惹起し得る分子種であり、製品に混入しないように取り除くプロセスは製造コストを増加させる一因となっている。非天然構造状態の形状、会合状態やその時間依存的変動は不明である。本研究ではヒトモノクローナル抗体を対象とし、酸ストレスによって生成される非天然構造状態を、クロマトグラフィーと散乱法で解析した。酸ストレスを与えたサンプルのサイズ排除クロマトグラムでは、中和後に自己会合が起り、これらの会合状態が時間オーダーで変化する過程が捉えられた。また、動的光散乱法では、酸ストレス抗体の15℃から40℃における凝集サイズの時間依存を明らかにした。この凝集の成長は、スモルコフスキー凝集速度式を基にすると、フラクタルかつ反応律速凝集で記述できることが明らかとなった。温度依存性より、凝集反応の活性化エネルギーは正、すなわち吸熱反応であった。これは抗体溶液中に凝集が発生、混入した際の保管期限を予測するのに役立つ。

Aggregation of antibody triggered by pH-shift stress

○Hiroschi Imamura^{1,2}, Shinya Honda^{1,2}
(¹Biomed. Res. Inst., AIST, ²MAB)

Key words antibody, aggregation, protein folding, kinetics

2P-231 PURE Ribosome Display 法による Protein L の改良

伍 広明, 松林 英明, 長田 江里子, ○上田 卓也
(東大院・新領域・メディカル情報生命)
ueda@k.u-tokyo.ac.jp

近年、抗体医薬の有効性が認められ、産業応用に資する抗体の研究開発が盛んに行われている。このような動向を踏まえ、多種多様な抗体を精製するためには、全長のIgGのみならず、FabやscFvにも強く結合する親和性の高いアフィニティーリガンドの開発が求められている。現在、抗体精製にはProtein AやProtein Gが利用されているが、これらタンパク質は抗体のFc領域に結合するため、FabやscFvの精製には適さない。Protein Lは免疫グロブリン(Ig)のkappa軽鎖に結合し、全長のIgGのみならず、FabやscFvにも結合できるため、多種多様な抗体の精製に最適である。しかしながら、例えばヒトIgG2に対してのProtein Lの解離定数は10-8 M程度であり、10-11 M程度のProtein GやProtein Aより劣る。そこで、本研究では、Protein Lの抗体結合ドメイン全域に対する変異ライブラリから、Fabに対し、より高い親和性を持つ改変型Protein Lの取得を目指した。
はじめに、Protein Lの抗体結合ドメインに由来するタンパク質全体に対するランダム変異ライブラリを作製し、PURE Ribosome Displayにより、天然型よりも結合能の高い改変型Protein Lの選抜を行った。具体的には、ランダム変異ライブラリに対しPURE Ribosome Displayによるoff rate selectionを行い、いくつかの改変型Protein Lの候補を取得した。次に、取得した改変型Protein LのFabに対する結合のパラメーターを測定し、改変型Protein Lの評価を行った。本発表では、これらの結果について議論をしたい。
なお、本研究は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合からの再委託を受けて実施した成果の一部である。

Improvement of Protein L using PURE Ribosome Display

Guangming Wu, Hideaki Matsubayashi, Eriko Osada, ○Takuya Ueda
(Dept. CBMS., Grad. Sch. Frontier Sci., Univ. Tokyo)

Key words PURE Ribosome Display, PURE system, Protein L

2P-232 バイオ医薬品製造工程におけるウイルス不活化技術の検討

○上平 崇^{1,2}, 坂井 薫^{1,2}, 澁谷 明美^{1,2}, 包 栄梅^{1,2}, 市野 晃^{1,2}, 浦山 健^{1,2}, 柚木 幹弘^{1,2}
(¹次世代バイオ医薬品製造技術研究組合, ²日本血液製剤機構)
yunoki-mikihiko@jbpo.or.jp

【背景および目的】 バイオ医薬品はその製造過程で、生物由来原料からの病原体の混入リスクを伴う。近年においてもウイルス不活化・除去処理に対して抵抗性の高い小型ウイルスの混入事例が報告されており、その対策が議論されている。我々はこうしたウイルスを対象に、バイオ医薬品の製造工程に導入可能な不活化法として、液状加熱法・紫外線照射法等について検討した。
【方法】 バイオ医薬品の代表製剤として抗体製剤の製造工程を想定した。工程サンプルには、ヒトポリクローナルIgGを模倣サンプルとして用いた。IgGの安定性が担保されるウイルス不活化処理条件を設定し、工程模倣液にモデルウイルスを添加して不活化実験を行った。不活化処理前後のウイルス量の減衰率から不活化効果を評価した。
【結果および考察】 液状加熱処理では、60℃・10時間処理でもIgGが変性せず、かつウイルスを検出限界以下まで不活化する条件を見出した。一方、高温短時間処理ではこのウイルスを効果的に不活化することはできなかった。一方、UV-C照射においても一定のウイルス不活化効果を示す工程条件を確認した。ウイルス不活化方法として一般的な低pH処理に加えて、このような機作の異なる不活化技術を組みあわせて導入する事は、バイオ医薬品の迷入ウイルスに対する安全性向上に寄与すると考える。

Evaluation studies on virus inactivation during manufacturing process of biopharmaceuticals

○Takashi Uehira^{1,2}, Kaoru Sakai^{1,2}, Akemi Shibuya^{1,2}, Rongmei Bao^{1,2}, Akira Ichino^{1,2}, Takeru Urayama^{1,2}, Mikihiko Yunoki^{1,2}
(¹MAB, ²JB)

Key words virus, pasteurization, UV-C, inactivation