

## P-3 二次元電気泳動を用いた抗体医薬の分離手法の開発

○木下英樹、矢部公彦、筒井 藍、松永貴輝、鶴沼 豊

シャープ株式会社 新規事業推進本部 健康医療事業推進センター

【背景】抗体の特異的結合性を利用した抗体医薬は副作用の少ない効果的な治療薬として注目されているが、より詳細な抗体医薬の不均一性の評価技術の開発が望まれていた。二次元電気泳動法はタンパク質の電荷と分子量の差を同時に分離できるために抗体医薬の不均一性をより詳細に分離できると予想された。しかしながら、抗体医薬は2本のH鎖と2本のL鎖とがジスルフィド結合により共有結合しており、非還元条件下では高分子量（≒160kDa）で塩基性の等電点を有しているために、抗体医薬を高分解能で分離できる等電点ゲルの開発が望まれていた。

【方法】等電点ゲルは、低比重溶液として所定濃度のアクリルアミド溶液を含む酸性アクリルアミドバッファ混合液と高比重溶液として同濃度のアクリルアミド溶液を含む塩基性アクリルアミドバッファ混合液を所望のpH勾配を有するようにグラジエントミキサを用いて混合しながらゲル作製器具に充填して作製した。また、二次元電気泳動はAuto2D装置（シャープマニファクチャリングシステム（株））を用いて評価した。二

次元電気泳動条件は、還元剤を添加しない非還元条件および非変性条件にて行った。

【結果および考察】高分子量タンパク質の吸収を向上させるためにアクリルアミド濃度と架橋度の検討を行った結果、T=3.6%,C=2.7%のときに高分子量タンパク質のスポット強度が向上した。抗体医薬の高次構造が等電点電気泳動によって変化するか確認をするために、等電点電気泳動のみ Dithiothreitol を添加しない条件下（非還元）で二次元電気泳動を行なったところ、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。次に、等電点電気泳動およびSDS-PAGEともに非還元条件下でAuto2Dを用いて抗体医薬の二次元電気泳動分離を行なったところ、高い解像度でタンパク質を分離することができた。

さらに、非変性条件で等電点電気泳動を行うために、変性剤を含まない等電点電気泳動用緩衝液に非界面活性剤型スルホベタインを添加して二次元電気泳動を行った結果、同様の高い解像度が得ることができた。