

抗体医薬の物理的安定性評価における 示差走査型マイクロカロリーメーターの活用

阿萬 大介, 長谷川 淳, 内山 進, 福井 希一

(受取日: 2010 年 11 月 17 日, 受理日: 2010 年 12 月 19 日)

Applications of Differential Scanning Microcalorimeter for Physical Stability Evaluation of Therapeutic Antibodies

Daisuke Ama, Jun Hasegawa, Susumu Uchiyama, and Kiichi Fukui

(Received Nov. 17, 2010; Accepted Dec. 19, 2010)

The number of therapeutic antibody under development has increased markedly over the last several years and this trend continues. In fact, there are more than 20 approved antibodies on the US market. One of the most important characteristics of the antibodies for the successful development as biotherapeutics is their conformational stability, which can be defined as the ability of molecule to maintain the native higher-order structure under broad range of conditions. The antibodies in unfolded state frequently have greater propensity to form aggregates than those in native state. The differential scanning calorimetry (DSC) is the only technique for direct measurement of the thermodynamic parameters accompanied by the thermal unfolding. The DSC is also an effective tool to estimate the contribution of each domain to overall stability for multi-domain protein such as antibodies. Although thermal stabilities of different antibodies have been examined by using DSC, apparent unfolding temperature where heat capacity takes maximum value was mainly discussed and thermodynamic parameters of each domain and inter-domain interactions were not estimated. It is now expected to establish analytical technique that takes intrinsic stabilities of each domain and inter-domain interactions into account for complete understanding of thermodynamics of whole antibody.

Keywords: antibody therapeutics, conformational stability, domain-domain interaction, differential scanning calorimetry

1. はじめに

1990 年代に欧米で実用化が始まった抗体医薬は、複数のブロックバスターを創出し、2000 年代に入り世界的な成功を収め、今や医薬品として一つの確固たるカテゴリーを形成している。抗体医薬も低分子医薬と同様に、その薬理作用・臨床効果が優れているだけでなく、製造工程、保存及び輸送においても安定であることが求められる。蛋白質である抗体は複雑な構造を持つためその安定性評価は簡単ではないが、近年、抗体の熱安定性を評価する手法として、示差走査型マイクロカロリーメーター(以下 DSC と略記する)が

汎用されている。本稿では、抗体医薬の構造上の特徴や抗体医薬の研究開発における安定性研究について述べた後、実際の DSC の活用例を紹介すると同時に、より精細な DSC データ解析を実施する上で取り組みが必要な点について論じる。

2. 抗体医薬の特徴と安定性研究

2.1 抗体医薬の歴史

抗体療法の歴史は、19 世紀後半にベーリングと北里によって行われたジフテリアに対する抗血清療法に遡ることができるが、抗体医薬としての実用化は、1975 年のケーラーとミルシュタインらによるハイブリドーマ技術の確立以降、すなわち単一の抗原認識能を有するマウスモノクローナル

Table 1 Global sales ranking (2008), Uto Brain.

Antibody product is highlighted with underline.

Rank	Product Name	Generic Name	Indication	Company
1	Lipitor	Atorvastatin	cholesterol/statin	Pfizer/Astellas
2	Plavix	Clopidogrel	antiplatelet	Sanofi-Aventis/BMS
3	Advair Diskus	Fluticasone/salmeterol	asthma	GlaxoSmithKline
4	<u>Rituxan/Mab Thera</u>	<u>Rituximab</u>	<u>Non-Hodgkin's Lymphoma</u>	<u>Biogen Idec/Roche</u>
5	Enbrel	Etanercept	Rheumatoid Arthritis	Amgen/Wyeth/Takeda
6	<u>Remicade</u>	<u>Infliximab</u>	<u>Rheumatoid Arthritis</u>	<u>I&J/SP/Tanabe-Mitsubishi</u>
7	Diovan	Valsartan	hyper tension/ARB	Novartis/Ipsen
8	Nexium	Esomeprazole	anti-ulcer/PPI	AstraZeneca
9	Epogen/Espo	Epoetin alfa	renal anemia	Amgen/J&J/Kirin
10	<u>Avastin</u>	<u>Bevacizumab</u>	<u>cancer/colon.breast</u>	<u>Genentech/Roche</u>

抗体の調製が可能となつてから急速に進展し、現在では、20を超える抗体医薬が米国食品医薬品局（FDA）に認可され、癌や感染症、アレルギー疾患、自己免疫疾患など様々な疾患に適用されている。2008年の全世界における売上高ランキングでは、トップ10に3つの抗体医薬がランクインするまでとなっている（Table 1）。

1986年に臓器移植時の急性拒絶反応の緩和を目的としたヒトCD3に対するマウスモノクローナル抗体（Muronomab）が初めての抗体医薬としてFDAに認可された。しかしながら、ヒトにとって異物であるマウス抗体のヒトへの投与により、ヒト抗ヒト抗体（HAHA）が出現するなど、異種抗原に対する免疫反応の惹起が、しばしば大きな問題となった。¹⁾その後、遺伝子組み換え技術とCHO細胞を用いた抗体産生技術の進展により、抗体間で共通な定常領域をヒト型抗体の対応部分に置き換えたキメラ抗体や抗原との結合に関与するアミノ酸領域以外をヒト型化したヒト型化抗体の作製が進められ、²⁾ HAHAの出現を大幅に抑制することが可能となった（Fig.1）。現在では、完全ヒト抗体の調製も可能で、³⁾ ヒト型化抗体及びヒト抗体が主流となっている。加えて、抗体自身の高機能化、すなわち、抗癌剤や放射性同位体の結合、あるいは毒素との融合抗体、アゴニスト抗体、さらには、抗体の持つ抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）を増強したポテリジェント抗体などの高機能性抗体の開発が進められている。⁴⁾

2.2 抗体の構造

抗体は免疫グロブリンとも呼ばれ、IgA、IgD、IgE、IgM及びIgGの5つの異なるクラスの分子が存在する。Fig.2に抗体医薬としてもっとも広く用いられているIgGの構造を示すが、基本構造はクラスを問わず分子量約50 kDaの重鎖（H鎖）と約25 kDaの軽鎖（L鎖）から構成され、IgG1の場合、それぞれ相同な2本のH鎖と2本のL鎖がジスルフィド結合及び非共有結合により会合している。また、アミノ酸約100残基ごとに、H鎖には4つ、L鎖には2つのIgフォールドと呼ばれる一対のジスルフィド結合で安定化されたドメイン構造を形成している。その中でH鎖可変領域

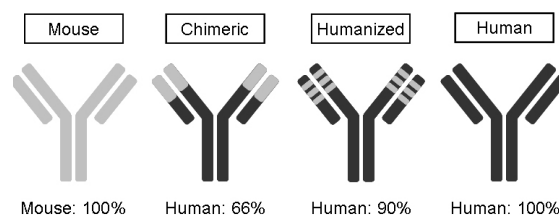


Fig.1 Mouse, Chimeric, Humanized, Human Antibody.

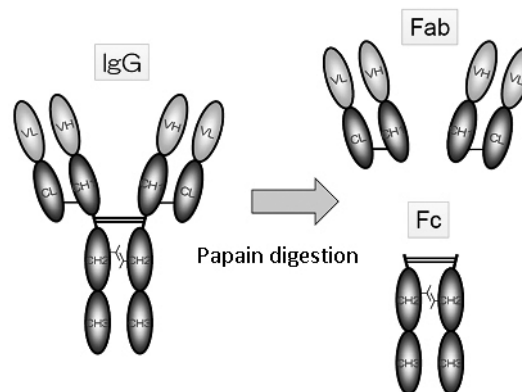


Fig.2 Structure of IgG1. Fab and Fc are generated by papain digestion.

（VH）及びL鎖可変領域（VC）と呼ばれるドメインからなる可変領域断片（Fv）が、抗原との結合に直接関与し、個々の抗体により構造が異なる。可変領域のうち、直接抗原と結合する領域は特に抗体間で変化が大きく、この超可変領域を相補性決定領域（CDR）と呼び、H鎖及びL鎖各々に、3ヶ所存在する。その他のドメインは各クラスではほぼ一定で、定常領域（CH及びCL）と呼ばれる。定常領域のうち、CH2-CH3の二量体で形成されるFcは、抗体医薬の主要な作用機序の一つである抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）や補体依存性細胞傷害活性（CDC）などの生物学的活性をもたらす。Fcは通常パパイン消化により調製さ

れ、同時に生成する抗原結合性断片をFabと呼ぶ。このFabには、可変領域が含まれることから、その一次構造は抗体により大きく異なる。H鎖のFab領域とFc領域はヒンジ領域でつながっており、ヒンジ領域は他のIgフォールドのドメインに比べ、柔軟性が高いのが特徴となっている。

2.3 抗体の安定性研究

抗体は一般に、他の蛋白質に比べて安定と考えられるが、他の蛋白質と同様に、様々な物理的・化学的経路により分解することが知られている。抗体の安定性は、抗体自身の構造だけでなく、溶液のpHやイオン強度などの周囲の環境からの影響を受ける。⁵⁾ 例えば、西らが報告したように、たとえ構造が変化しなくてもイオン強度の低下により抗体同士が会合し、結果として液-液相分離を起こすケースもある (Fig.3 及び Fig.4)。⁶⁾ こうした背景により、近年、安定性に基づいた開発候補抗体や製剤処方スクリーニング技術に注目が集まっている。抗体の安定性評価としては、変性と凝集が重要であり、変性は高次構造の変化を伴い、凝

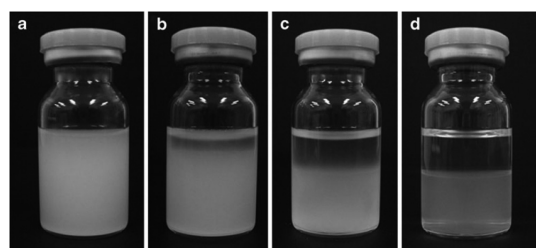


Fig.3 Time course of visual appearance of MAb A solution at $107.22 \text{ mg mL}^{-1}$ in low ionic strength buffer of 5 mM sodium phosphate, 10 mM sodium chloride, 5 % sucrose, pH 5.5 at ambient temperature after a: 0 min, b: 5 min, c: 20 min, d: 2 days.⁶⁾

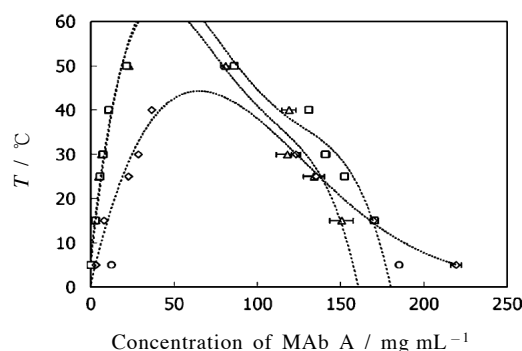


Fig.4 Phase diagram of MAb A solution at 5 mM (△), 10 mM (□), 20 mM (◇) and 40 mM (○) of sodium chloride in 5 mM sodium phosphate, 5 % sucrose, pH 5.5.⁶⁾

集の一因であると考えられているため、天然状態の抗体の熱力学的安定性の評価が重要となる。

蛋白質の熱力学的安定性評価として、熱ストレスに伴って変性した抗体の量あるいは天然状態に対する比率をCDスペクトルや蛍光スペクトル,⁷⁾ FT-IR,⁸⁾ DSC⁹⁾ により測定する方法がある。DSCは天然状態から変性状態への転移に伴う熱容量変化を直接測定するため、抗体の熱力学的安定性を直接評価可能な唯一の方法であり、抗体のように複数のドメインから構成される蛋白質において、個々のドメインの挙動を解析する上でも非常に有用な方法である。筆者らは、抗体を対象に、そのDSCデータから熱力学的安定性を評価する解析手法、及び熱力学的安定性と物理的安定性の相関に関する研究を行っている。次項では、抗体の物理的安定性評価におけるDSCの活用例を紹介する。

3. DSCによるIgGの熱力学的安定性の解析

3.1 IgG全体の熱安定性

DSCによる典型的なIgGの熱容量曲線をFig.5に示す。見かけ上、3つのピークが観測され、低い温度から順にCH2, Fab, 及びCH3の各ドメインの転移に対応している。なお、IgGのDSCを熱力学的に解析した例は、20年以上前にTischenkoらにより報告されている。¹⁰⁾ しかしながら、報告の多くはウサギの血液から精製した試料についての解析結果であるため、得られた熱力学的パラメータは多数の性質が異なるIgGについての平均値となっている。今後、高度に精製された単一の組換え抗体を用いた測定と解析による検証が必要である。

3.2 IgG Fcの熱変性

抗体のFcは、抗体間でその一次構造に変化がなく、また、ADCCやCDCなどのエフェクター機能発現を担っていることから、Fcに焦点を当てた様々な解析が古くより実施されている。Tischenkoらは、骨髄腫の患者の血清から調製したIgG-Fcについて、異なるpH条件下での熱安定性を評

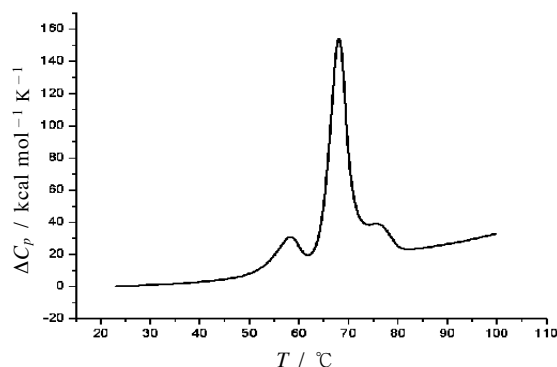


Fig.5 Typical DSC curve of IgG1 (pH 5).

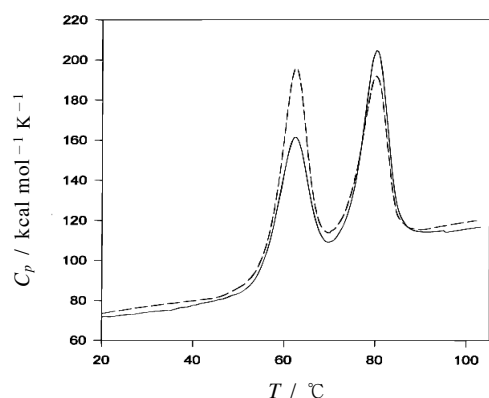


Fig.6 Temperature dependences of molar partial heat capacity of Fc fragment of human IgG1 at pH 3.8 with 10 mM glycine buffer (solid line) and at pH 4.6 with 10 mM acetate buffer (dashed line).¹¹⁾

価することにより、Fcの各ドメインの熱安定性や相互作用に関する考察を行っている。¹¹⁾ Fig.6に示したように、IgG-Fcの熱容量曲線には、2つの吸熱ピークが認められた。このような熱容量曲線上の複数のピークは、互いに独立した構造上のドメインに対応するケースが多い。この研究では、選択的な蛍光ラベル化を用いた熱安定評価の結果、60℃付近のピークがCH2ドメインの変性の吸熱ピークに対応し、80℃付近のピークがCH3ドメインの変性に由来する吸熱ピークであることが確認された。pH 4.2から8.0の領域では、最初の吸熱ピークが2番目の吸熱ピークよりも、高さ・面積とも大きくなる傾向が見られたが、pH 4.2未満では反対の結果となっていた。このことは、pH 4.2以上の領域にCH2ドメインの安定化に寄与する要因が存在していることを示唆している。筆者らは、X線結晶構造解析により構築したFcの三次元モデルを用いて、熱力学データと実際の構造との相関性を調べた。CH2ドメイン間の相互作用は、Asn297に結合するN結合型糖鎖のみを介した非常に弱いものであるにも関わらず、pH 4.2-8.0の領域では、CH2ドメインの変性におけるエンタルピーがCH3ドメインのそれを上回っている。そのため、pH 4.2-8.0の領域では、同じH鎖上のCH2ドメインとCH3ドメインとの間に強い相互作用が存在し、このことにより、CH2ドメインが安定化されていると考えられた、逆に低いpHでは、その相互作用が弱まることで、CH2ドメインの安定性が低下すると考えられた。この相互作用の低下が、低pH条件下におけるIgG-Fcの運動性の増大や沈降速度の増加に繋がっている。こうした解析から筆者らが示した、Fcの各ドメイン間の相互作用の模式図がFig.7である。

一方、Fcに存在するN結合型糖鎖がFc、特にCH2ドメ

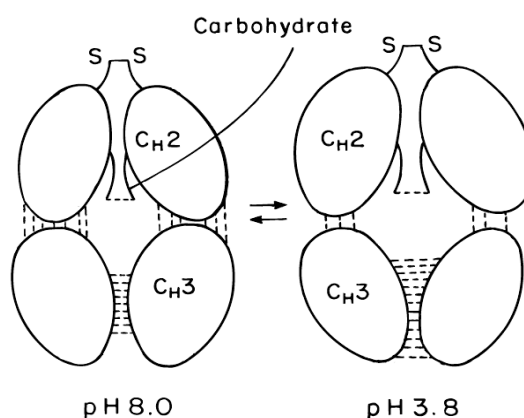


Fig.7 Scheme of interdomain interactions in the Fc fragment in acidic and neutral pH. Line density corresponds to the intensity of interactions.¹¹⁾

インの安定性に大きな影響を及ぼすことは、近年の複数の研究により示されている。Ghirlandoらは、組換えIgG4から調製したFc断片について、N型糖鎖の還元末端のNアセチルグルコサミンと蛋白質のアスパラギンの間を切断する酵素、ペプチドNグリコナーゼF (PNGase F)を用いてCH2ドメインに存在する糖鎖を除去し、DSC測定を実施した。¹²⁾ その結果、Fig.8のように、PNGase F処理をしていないIgG4-Fcでは、CH2及びCH3ドメインの変性に由来する2つの吸熱ピークが重なっているため、見かけ上1ピークとなっているが、PNGase F処理したIgG4-Fcでは、2つのピークが観測された。分離した2つのピークのうちの低温側のピークは、最大値を取る温度が約4℃低温側にシフトしていた。糖鎖はCH2ドメインに結合していることから、糖鎖除去により、CH2ドメインが不安定化したことが示唆された。

また、Mimuraらは、グリコシダーゼを用いて、Fc糖鎖の末端構造を変化させ、糖鎖構造がFcの熱安定性に及ぼす影響について考察を行っている。¹³⁾ DSC測定の結果、PNGase F処理による糖鎖除去により、CH2ドメインのTmが低温側に約5℃シフトしたのに加え、Nアセチルグルコサミニダーゼを用いて、末端のN-アセチルグルコサミンを除去することにより、CH2ドメインのTmが低温側に約3℃シフトした (Fig.9)。

このように、DSCを用いた熱力学的解析により、IgGのFcの構造安定性にCH2ドメインの糖鎖及び溶媒のpHが重要であることが実験的に確認されている。

3.3 Fabの熱安定性が抗体の熱安定性に及ぼす影響

抗体の定常領域は、同じサブクラスの抗体であれば同一のアミノ酸配列を持つため、抗体自身の熱安定性は、可変領域の安定性の違いに起因すると考えられる。抗体の可変領域のうち、直接抗原と結合する領域は特に抗体間で配列

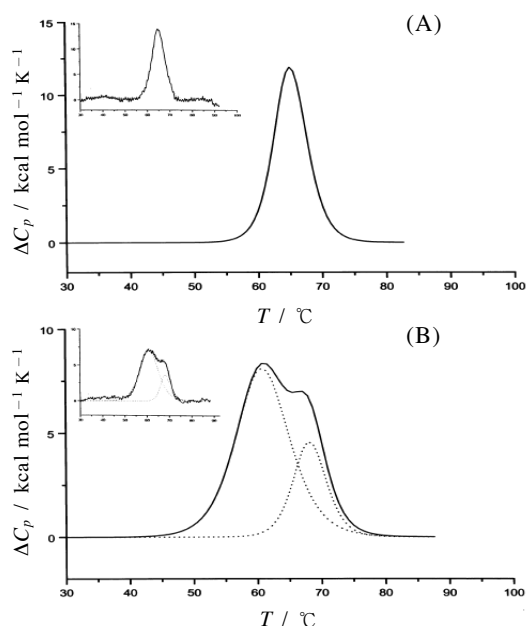


Fig.8 DSC data for the thermal denaturation of (A) fully galactosylated (G2) IgG4-Fc and (B) the deglycosylated IgG4-Fc in phosphate buffered saline at pH 7.4. The data are baseline corrected. Inset: the thermograms before deconvolution.¹²⁾

の変化が大きく、この超可変領域を相補性決定領域 (CDR) と呼び、それ以外の比較的变化の少ない領域をフレームワーク領域と呼ぶ。マウス等で取得された標的抗原に対する抗体のCDRをヒト抗体のフレームワークに移植するCDRグラフトイングによりヒト化抗体を作製するため、フレームワーク構造がFabの安定性に及ぼす影響に関する研究も実施されている。

Garberらは、自社で開発中の抗体について、そのCDRの配列を17種類の異なる組み合わせのフレームワークに移植した抗体を作製し、DSCを用いて熱安定性評価を実施した。¹⁴⁾ **Fig.10**に示した4種のIgG1抗体の熱容量曲線の通り、各Fab間で T_m (この論文では熱容量が最大値を取る温度)が大きく異なる結果が得られた。各々のVH及びVLのアミノ酸配列について、ヒト抗体での出現頻度に基づいてhuman V-geneデータベースを用いてスコア化し、Fabの T_m との相関を検証したところ、スコアが低い、すなわち、出現頻度の低い配列のFabほど熱安定性が高い結果となった。加えて、Fabの T_m が60°Cより低温となる抗体では、発現量の低下や精製中の凝集体の増加といった、製造可能性上の問題となる現象も認められた。更に、Garberらは、IgGのサブクラスの違いによる熱安定性への影響を検証するため、同一の可変領域に、異なるサブクラスの定常領域を繋

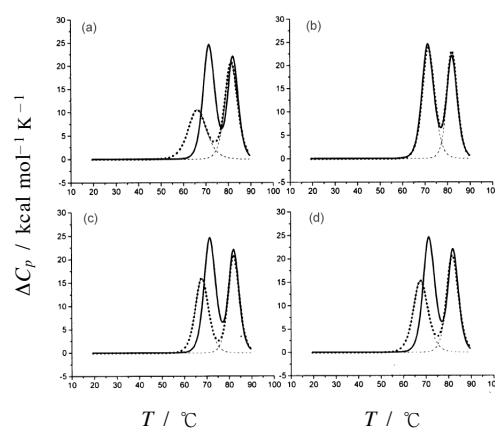


Fig.9 Deconvoluted thermograms of native and (a) deglycosylated, (b) (NGA2)₂, (c) (M3N2)₂ and (d) (MN2)₂ glycoforms of IgG1-Fc in phosphate buffered saline. In each thermogram the solid line represents the profile of native IgG-Fc. The data were baseline corrected.¹³⁾ NGA2: non galactosylated biantennary oligosaccharide; Asn-(GlcNAc)₂(Man)₃(GlcNAc)₂, M3N: Trimannosyl core with chitobiose; Asn-(GlcNAc)₂(Man)₃, MN2: Mono mannose with chitobiose; Asn-(GlcNAc)₂-Man.

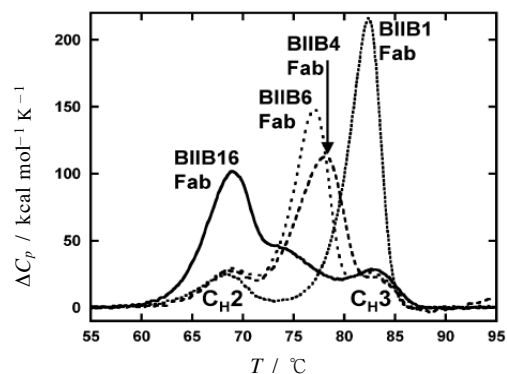


Fig.10 Thermal unfolding curves of four human(ized) IgG1 antibodies in 20 mM sodium citrate, 150 mM NaCl buffer at pH 6.0. Note, the unfolding transitions of CH2 and CH3 domains for all IgG1 constructs are identical while the Fab unfolding transitions are highly variable.¹⁴⁾

げた各抗体についても、DSC測定を実施した。**Fig.11**に示した異なるサブクラスのIgG抗体の熱容量曲線の通り、各Fab間で T_m にほとんど差が認められなかった。その一方、CH2及びCH3ドメインの熱安定性は、各サブクラス間で大きく異なるパターンを示した。このことから、IgGでは各ドメインの変性が互いに独立して進行していることが示唆

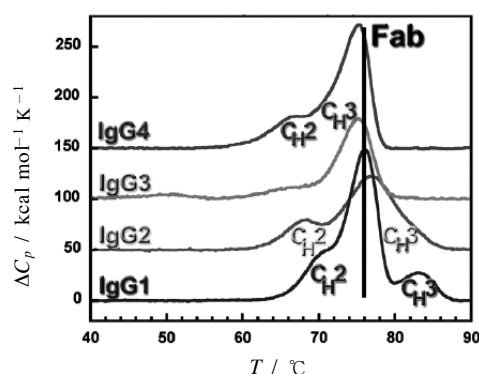


Fig.11 DSC curves representing the four human IgG subclasses in 20 mM sodium citrate, 150 mM NaCl buffer at pH 6.0. A single line is drawn through the Fab unfolding transitions of each IgG.¹⁴⁾

された。

一方、Ionescuらは、自社（メルク社）の開発抗体（Mrk）に加え、上市されている2つの抗体（ハーセプチン及びアバスタチン）について、Fabが抗体全体の熱安定性に及ぼす影響を検証した。¹⁵⁾ これら3種のIgG1抗体は異なる抗原に対する抗体である。3種のIgG1抗体のFab及びFcのDSC熱容量曲線はFig.12に示した通りで、Fcの熱容量曲線がいずれの抗体も概ね一致しているのに対して、Fabでは各抗体で T_m が大きく異なる結果となった。なお、よく見ると3種類の抗体から作製したFcにおいて、 T_m がわずかに異なっているが、著者らは、糖鎖のパターンが抗体間で異なるためであると推測している。用いたIgG1抗体のうち、ハーセプチン及びアバスタチンは、同一のフレームワークを有しているにも関わらず、Fabの T_m が大きく異なるのに対し、フレームワークが異なるMrk抗体のFabがハーセプチンと同等の T_m を示した。ハーセプチン及びアバスタチンに用いられているフレームワークが最も安定なドメインであるのに対し、Mrk抗体のフレームワークは最も不安定なドメインであることから、¹⁶⁾ フレームワークの構造が、Fabの熱安定性に及ぼす影響は、相対的に小さいことが示唆された。加えて、最も低い安定性のフレームワークを持つMrk抗体が高い安定性を示したことから、CDRの配列がVH及びVLドメイン自身の安定化、または、VH及びVLの相互作用を介した安定化に寄与している可能性が示唆された。この研究で見られたハーセプチンとアバスタチンの安定性の違いの要因については、可変領域に含まれるドメイン間の相互作用に関する詳細な解析が重要となると考えられる。

4. 今後の課題

これまで述べてきたように、抗体医薬の物理的安定性評

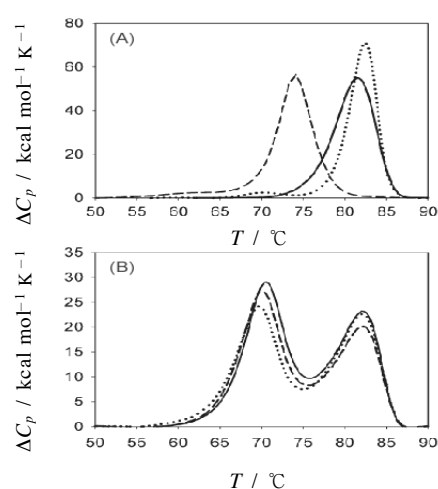


Fig.12 Temperature-induced unfolding of (A) Fab fragments and (B) Fc fragments of IgG monoclonal antibodies: Mrk (solid line), Herceptin (dotted line), Avastin (dashed line).¹⁵⁾

価において、DSC測定により得られる情報は非常に重要であると考えられる。しかしながら、DSCデータの解釈という点では、十分な解析が実施されているとは言えない。多くのケースでは、変動の大きいピークの T_m の挙動のみによって、安定性を評価しているのが実情である。今後は、抗体の各ドメインの解析を詳細に行うことにより、ドメイン間の相互作用を考慮した、抗体全体の構造安定性評価の手法の確立が望まれる。そこで、著者らが考える抗体の熱安定性評価法について最後に述べる。抗体のようなマルチドメイン蛋白質の熱安定性の評価は、リゾチームやシトクロームcなどの単ドメイン蛋白質の場合¹⁷⁻¹⁹⁾と比べ、それ程簡単ではない。さらに、ドメイン間に相互作用が存在する場合には更に難しい解析となる。マルチ蛋白質の熱変性過程について、変性過程に現れる各状態を考慮した統計熱力学に基づいた非線形フィッティングは、城所により提唱され、²⁰⁾ 実際に用いられた例として本田らによる解析や飯田らによる解析例がある。^{21,22)} 一方、ドメインを複数持つ蛋白質において、ドメイン間の相互作用を考慮した蛋白質の熱安定性を解析するモデルがBrandtsらによって提唱され、ホスホグリセリン酸化酵素やクレアチンリン酸化酵素を始めとした複数の解析例がある。²³⁾ すでに述べたが、抗体においてはFabとFcという2つの大きなドメインが存在し、さらにそれぞれのドメインはCH2やCH3といった更に小さなドメインから構成され、CH2とCH3にはドメイン間の相互作用が存在する。従って、抗体の熱安定性解析には、ドメイン間の相互作用エネルギーを考慮したマルチドメイン解析が適切である。こうした解析を行うこ

とで、各ドメインの安定性の違いが初めて厳密に評価可能となり、抗体の医薬品としての安定性との相関が明らかとなると予想している。

文 献

- 1) G. Ritter, L. S. Cohen, C. Williams, Jr., E. C. Richards, L. J. Old, and Sydney Welt, *Cancer Res.* **61**, 6851 (2001).
- 2) M. Clark, *Immunol. Today* **21**, 397 (2000).
- 3) N. Lonberg, *Nat. Biotechnol.* **23**, 1117 (2005).
- 4) A. M. Wu and P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **23**, 1137 (2005).
- 5) W. Wang, S. Singh, D. L. Zeng, K. King, and S. Nema, *J. Pharm. Sci.* **96**, 1 (2007).
- 6) H. Nishi, M. Miyajima, H. Nakagami, M. Noda, S. Uchiyama and K. Fukui, *Pharm. Res.* **27**, 1348 (2010).
- 7) N. Harn, C. Allan, C. Oliver, C. R. Middaugh, *J. Pharm. Sci.* **96**, 532 (2007).
- 8) T. J. Kamerzell and C. R. Middaugh, *Biochemistry* **46**, 9762 (2007).
- 9) T. J. Kamerzell, J. D. Ramsey, and C. R. Middaugh, *J. Phys. Chem. B* **112**, 3240 (2008).
- 10) V. M. Tischenko, V. P. Zav'yalov, G. A. Medgyesi, S. A. Potekhin, and P. L. Privalov, *Eur. J. Biochem.* **126**, 517 (1982).
- 11) V. M. Tischenko, V. M. Abramov, and V. P. Zav'yalov, *Biochemistry* **37**, 5576 (1998).
- 12) R. Ghirlando, J. Lund, M. Goodall, and R. Jefferis, *Immunol. Lett.* **68**, 47 (1999).
- 13) Y. Mimura, S. Church, R. Ghirlando, P. R. Ashton, S. Dong, M. Goodall, J. Lund, and R. Jefferis, *Mol. Immunol.* **37**, 697 (2000).
- 14) E. Garber and S. J. Demarest, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 751 (2007).
- 15) R. M. Ionescu, J. Vlasak, C. Price, M. Kirchmeier, *J. Pharm. Sci.* **97**, 1414 (2008).
- 16) S. Ewert, T. Huber, A. Honegger and A. Plückthun, *J. Mol. Biol.* **325**, 531 (2003).
- 17) R. Kuroki, S. Kawakita, H. Nakamura, and K. Yutani, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 6803 (1992).
- 18) J. Hasegawa, S. Uchiyama, Y. Tanimoto, M. Mizutani, Y. Kobayashi, Y. Sambongi, and Y. Igarashi, *J. Biol. Chem.* **275**, 37824 (2000).
- 19) S. Uchiyama, J. Hasegawa, Y. Tanimoto, H. Moriguchi, M. Mizutani, Y. Igarashi, Y. Sambongi, and Y. Kobayashi, *Protein Eng.* **15**, 455 (2002).
- 20) S. Kidokoro and A. Wada, *Biopolymers* **26**, 213 (1987).
- 21) S. Honda, H. Uedaira, F. Vonderviszt, S. Kidokoro and K. Namba, *J. Mol. Biol.* **293**, 719 (1999).
- 22) T. Iida, S. Nishimura, M. Mochizuki, S. Uchiyama, T. Ohkubo, Y. Urade, A. Tanaka and T. Inui, *FEBS J.* **275**, 233 (2008).
- 23) J. F. Brandts and L.-N. Lin, *Biochemistry* **29**, 6927 (1990).

要 旨

開発中の抗体医薬の数は近年、飛躍的に増加しており、この傾向は今後も継続すると考えられる。現在、20を超える抗体医薬が、米国内で上市されている。抗体が抗体医薬としての開発で成功するための最も重要な特性の一つとして、構造安定性が挙げられる。構造的に安定であることは、様々な条件下において、天然状態の高次構造を維持できることを指す。変性した抗体は、天然状態の抗体に比べ凝集体を生成しやすいと考えられている。示差走査型カロリーメトリー (DSC) は、温度依存的な蛋白質の変性における熱容量の変化を直接的に測定できる唯一の方法であり、抗体のように複数のドメインから構成される蛋白質において、個々のドメインの挙動を解析する上でも非常に有用な方法である。これまでに、DSCを用いた抗体の様々な熱安定性解析が行われてきたが、それは専ら変性中点温度や熱容量が最大となる温度を用いた解析であり、ドメインごとの熱力学量についてはほとんど考慮されていなかった。今後は、ドメイン間の相互作用を考慮した、抗体全体の構造安定性評価の手法の確立が望まれる。

阿萬 大介 Daisuke Ama

第一三共(株)製薬技術本部 分析評価研究所, Analytical & Quality Evaluation Research Laboratories, Pharmaceutical Technology Division, DAIICHI SANKYO CO., LTD., 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻, Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, E-mail: ama.daisuke.ea@daichisankyo.co.jp

研究テーマ：抗体医薬品の物性解析

趣味：スキー、読書

長谷川 淳 Jun Hasegawa

第一三共(株)製薬技術本部 分析評価研究所, Analytical & Quality Evaluation Research Laboratories, Pharmaceutical Technology Division, DAIICHI SANKYO CO., LTD.

研究テーマ：蛋白質の立体構造、相互作用および物理化学的性質の解析

趣味：音楽

内山 進 Susumu Uchiyama

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻, Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

研究テーマ：蛋白質および蛋白質複合体の生物物理化学

趣味：料理

福井 希一 Kiichi Fukui

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻, Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

研究テーマ：動植物染色体の高次構造の解明

趣味：果樹の園芸