

## 抗体医薬品リツキシマブ軽鎖可変領域の多量化会合挙動

(奈良先端大先端科技<sup>1</sup>・大分大研究マネジメント機構<sup>2</sup>・九州先端研ナノテク<sup>3</sup>) ○南部 蓮琳<sup>1</sup>・酒井 隆裕<sup>1</sup>・真島 剛史<sup>1</sup>・小林 直也<sup>1</sup>・一二三 恵美<sup>2</sup>・宇田 泰三<sup>3</sup>・廣田 俊<sup>1</sup>

Studies on association property of light chain variable region of therapeutic antibody rituximab (Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST<sup>1</sup>, Inst. Res. Mgmt., Oita Univ<sup>2</sup>, Nano-tech Lab., ISIT<sup>3</sup>)

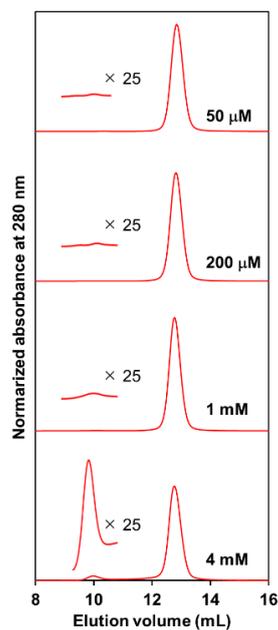
○Renri Nambu<sup>1</sup>・Takahiro Sakai<sup>1</sup>・Tsuyoshi Mashima<sup>1</sup>・Naoya Kobayashi<sup>1</sup>・Emi Hifumi<sup>2</sup>・Taizo Uda<sup>3</sup>・Shun Hirota<sup>1</sup>

Monoclonal antibodies often form aggregates, which decreases their antigen-recognition capabilities. Although aggregation of antibodies is an important issue, atomic-level structural examinations of antibody aggregates are sparse. We have previously shown that the variable region ( $V_L$ ) of human antibody #4 light chain forms a 3D domain-swapped dimer and a pair of dimers forms a tetramer through hydrophobic interactions. On the other hand, therapeutic antibody rituximab has been reported to form oligomers. In this study, we investigated the oligomerization property of rituximab  $V_L$  to evaluate whether it contributes to the oligomerization. Rituximab  $V_L$  was expressed in *E. coli* and purified by column chromatography. An equilibrium between monomers and oligomers of rituximab  $V_L$  was revealed by size-exclusion chromatography (SEC). Monomer bands were observed in the SDS-PAGE analysis of the SEC oligomer fractions of rituximab  $V_L$  under reducing and non-reducing conditions, suggesting that rituximab  $V_L$  forms oligomers through non-covalent interactions.

**Keywords** : antibody light chain; domain swapping; protein aggregation; rituximab; therapeutic antibody

医薬品に幅広く利用されている抗体は不安定で会合しやすく、凝集により抗原補足能が低下することが多いが、その会合状態について原子レベルでの研究は限られている。我々はヒト抗体#4の軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) の多量化挙動を調べ、 $V_L$  が 3D ドメインスワッピングで多量化することを明らかにした<sup>1</sup>。一方、抗体医薬品リツキシマブはわずかに多量体を形成することが報告されている。本研究では、リツキシマブの多量化における  $V_L$  の寄与を明らかにするため、リツキシマブ  $V_L$  の多量化挙動を調べた。大腸菌を用いてリツキシマブ  $V_L$  を発現させ、カラムにより精製した。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析により、リツキシマブ  $V_L$  は単量体と多量体の平衡状態にあることが分かった。SEC で分取した多量体画分の還元と非還元での SDS-PAGE において、いずれも単量体の位置にバンドが観測されたことから、リツキシマブ  $V_L$  は非共有結合により多量体を形成することが明らかになった。

1) Sakai, T. *et al.*, *Nat. Commun.*, 14, 7807 (2023).



**Figure 1.** SEC analysis of rituximab  $V_L$  at different concentrations.