

VHH 抗体の化学修飾に関する研究(Ⅱ)：抗 EGFR-VHH 抗体の還元と HPLC 分析

(埼玉大院理工¹・埼玉先端ラボ²・埼玉戦略研究³) ○稲垣賢伍¹・松下隆彦^{1,2,3}・小山哲夫¹・幡野健^{1,2,3}・松岡浩司^{1,2,3}

Study on chemical modification of VHH antibodies (II): Reduction and HPLC analysis of anti-EGFR-VHH antibodies (¹Grad. Sci.&Engin. Saitama University, ²Adv. Inst. Innov. Tech. Saitama University, ³ Strategic Res. Ctr. Saitama University) ○Kengo Inagaki¹, Takahiko Matsushita^{1,2,3}, Tetsuo Koyama¹, Ken Hatano^{1,2,3}, Koji Matsuoka^{1,2,3}

VHH antibodies can be mass-produced more cheaply than conventional IgG antibodies, and are attracting attention as next-generation biopharmaceuticals. VHH antibodies have retained disulfide bond, and a previous study¹ reported that the oxidized and reduced forms can be separated by high-performance liquid chromatography. In this study, we evaluated the disulfide bond formation rate and the progress of the reduction reaction in anti-EGFR-VHH antibodies by HPLC, with an eye toward the applicability of chemical modification targeting disulfide bond.

When anti-EGFR-VHH antibodies were analyzed by reversed phase HPLC, only one peak was confirmed. This result suggests that the antibody may exist mainly in the oxidized form, but since no change was observed in the retention time or peak area even when the reducing agent TCEP was added, it is possible that the reduction reaction was insufficient or that the HPLC elution conditions were inappropriate, preventing the separation of the oxidized and reduced forms. Future challenges include optimizing the elution conditions and examining conditions to ensure the reduction reaction proceeds.

Keywords : VHH antibodies, HPLC, Disulfide bonds, Reducing Agent

VHH 抗体は従来の IgG 抗体に比べて安価に大量生産が可能であり、次世代バイオ医薬品として注目されている。VHH 抗体は保持されたジスルフィド結合を有しており、先行研究¹では酸化型と還元型が高速液体クロマトグラフィーによって分離できることが報告されている。本研究では、ジスルフィド結合を標的とした化学修飾の適用可能性を見据え、抗 EGFR-VHH 抗体におけるジスルフィド結合の形成率や還元反応の進行を HPLC で評価した。

抗 EGFR-VHH 抗体を逆相 HPLC で分析した結果、1 つのピークのみが確認された。この結果は、抗体が主に酸化型で存在している可能性を示唆するが、還元剤 TCEP を添加しても保持時間やピーク面積に変化が見られなかったことから、還元反応が不十分であった、または HPLC の溶離条件が不適切で酸化型と還元型を分離できていない可能性も考えられる。溶離条件の最適化や、還元反応を確実に進行させるための条件検討が今後の課題である。

1) Lucie H, *et al.*, *Protein Science.*, **2019**, 28, 1865-1879.