

## Study on stabilization of human IgG4 antibodies

浪崎, 博史

<https://doi.org/10.15017/2534401>

---

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (創薬科学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

ヒト IgG4 抗体の安定化に関する研究  
Study on stabilization of human IgG4 antibodies

2019

九州大学 大学院薬学府  
臨床薬学部門 細胞生物薬学分野  
浪崎 博史

## 略語表

CD; cluster of differentiation

Ig; Immunoglobulin

CDR; complementary determining region

V; variable

D; diversity

J; joining

RAG; recombination-activating gene

RSS; recombination signal sequences

TdT; terminal deoxynucleotidyl-transferase

AID; activation induced cytidine deaminase

BCR; B cell receptor

TCR; T cell receptor

Fab; fragment, antigen binding

Fc; Fragment, Crystallizable

VH; variable heavy

CH; constant heavy

VL; variable light

CL; constant light

CDC; complement-dependent cytotoxicity

ADCC; antibody-dependent cellular cytotoxicity

ADCP; antibody-dependent cellular phagocytosis

NK; natural killer

Fc $\gamma$ R; Fc gamma receptor

ITAM; immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM; immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

FcRn; neonatal Fc receptor

PD-1; programmed cell death 1

PD-L1; programmed cell death –lignd1

VLA4; very late antigen-4

DNP; dinitrophenol

ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay

$K_D$ ; dissociation constant

SEC; size-exclusion chromatography

DSF; differential scanning fluorimetry

DSC; differential scanning calorimetry

$T_m$ ; melting transition

RU; resonance unit

## 目次

第一章	序論	p.5
1-1	背景	p.5
1-1-1	免疫グロブリンの種類および機能	p.5
1-1-2	免疫グロブリンの多様性獲得	p.7
1-1-3	ヒト IgG の構造および機能	p.9
1-1-4	抗体医薬の開発および承認状況	p.13
1-1-5	ヒト IgG4 の抗体医薬の研究開発状況	p.17
1-1-6	ヒト IgG サブクラスにおける安定性	p.21
1-2	引用文献	p.25
第二章	ヒト IgG4 抗体の低 pH 誘導性凝集体形成における アミノ酸改変による抑制効果に関する研究	p.30
2-1	要旨	p.30
2-2	研究背景	p.32
2-3	材料および方法	p.35
2-4	結果	p.43
2-5	考察	p.78
2-6	引用文献	p.87
	謝辞	p.94

## 第一章 序論

### 1-1 背景

#### 1-1-1 免疫グロブリンの種類および機能

免疫グロブリン (Immunoglobulin ; Ig) は哺乳細胞に存在する B 細胞から産生される糖タンパク質であり、外来抗原を認識して結合する機能を有する。Ig は主に血液中および組織体液中に存在し、細菌やウイルスなどの外来抗原に結合することにより、白血球またはマクロファージによる食作用、ならびに免疫細胞の結合による免疫作用により生体防御に関わっている。ヒトの免疫グロブリンは、IgG, IgA, IgM, IgD および IgE の 5 つのクラスが存在し (Fig. 1-1)、重鎖と軽鎖から構成される。重鎖の定常領域の配列によりさらにクラスが分類され、IgG は、重鎖の定常領域の配列から IgG1, IgG2, IgG3 および IgG4 の 4 つのサブクラスに分類される [Schur, 1988]。また、IgA は、IgA1 および IgA2 の 2 つのサブクラスに分類される。

IgG は、血液中に最も多く存在し、抗体の 70-75% を占めており、細菌やウイルスなどの様々な抗原に結合し、食作用、毒素の中和などに関与している。IgA は、抗原や細菌に暴露されやすい消化管および呼吸器で分泌され、粘膜の免疫防御に関与している [Morton *et al.*, 1996]。IgM は、ジスルフィド結合により多量体を形成しており、その多くは 5 量体である。細菌などの初期感染により発現し、補体活性が高く、初期の生体防御に関与している [Klimovich, 2011]。IgD は、IgM 発現の直後に発現し、抗原の自己または非自己の選択に関与している。また、分泌型の IgD は、粘膜免疫に関与していることが報告されている [Gutzeit *et al.*, 2018]。IgE は、アレルギー反応に関与しており、マスト細胞や好塩基球の脱顆粒反応を起こす [Sutton and Gould, 1993]。

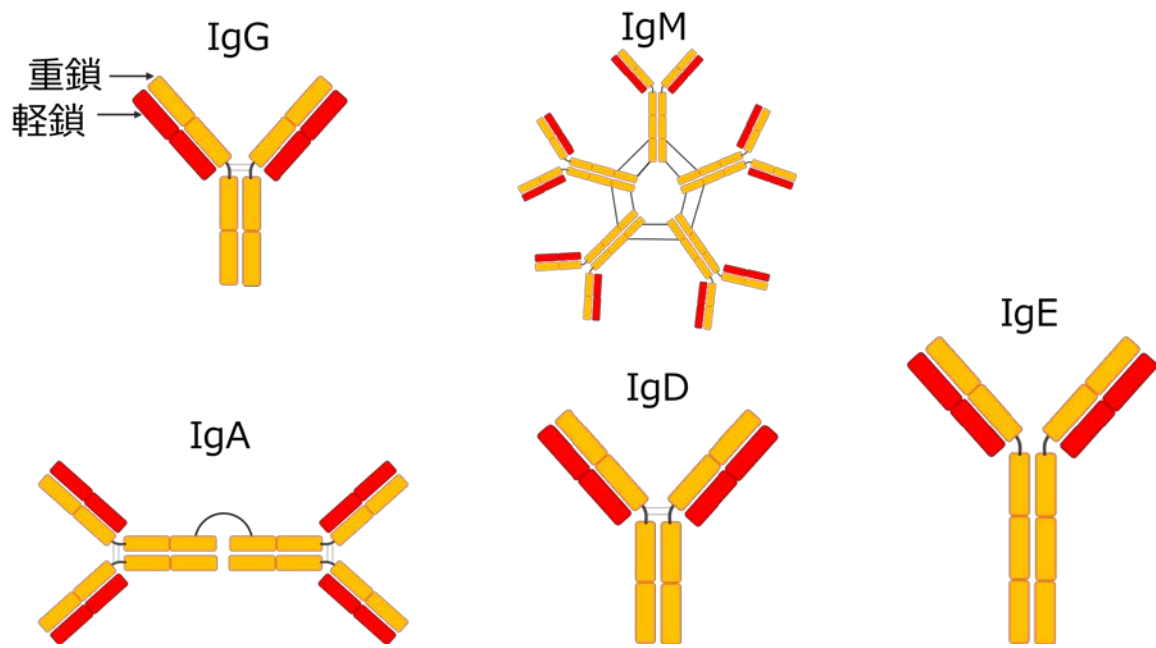


Fig. 1-1 抗体クラスの構造

## 1-1-2 免疫グロブリンの多様性獲得

抗体の大きな特徴として、抗原への結合の特異性、多様性の獲得および自己および非自己の認識が挙げられる。抗体の重鎖と軽鎖は、それぞれ可変領域および定常領域から構成されている。可変領域は抗原に結合する部位であり、3つの相補性決定領域（complementary determining region ; CDR）が存在する。CDRのアミノ酸配列は多様性を有し、N末端側から CDR1、CDR2 および CDR3 と呼ばれている。特に CDR3 のアミノ酸配列の多様性は高く、後述の V(D)J 組換えによるものである。また、CDR 以外の可変領域はフレームワークと呼ばれ、アミノ酸の変化は少なく、構造的な安定性に寄与している。

可変領域をコードする抗体遺伝子座には、可変（variable ; V）、多様性（diversity ; D）および連結（joining ; J）遺伝子断片がそれぞれ複数存在している。B 細胞の分化段階において、それらの遺伝子断片が1つずつ選択・切断・結合し、V、D および J の組み合わせにより無数の異物に対応することができる多様性を獲得している [Tonegawa, 1983]。この組換えの箇所は、CDR3 に該当し、そのため、CDR3 はアミノ酸配列の多様性を獲得する。このプロセスは V(D)J 組換えと呼ばれる。抗体遺伝子座において、V、D および J 遺伝子断片の切断には、recombination-activating gene ; RAG-1、RAG-2 という切断酵素が関与し、遺伝子断片に存在する組換えシグナル配列（recombination signal sequences ; RSS）を認識し、その後、非相同末端結合により遺伝子断片が結合する [Gellert, 2002; Ramsden *et al.*, 1994; Rooney *et al.*, 2004]。また、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（terminal deoxynucleotidyl-transferase ; TdT）は、V(D)J 組換えの遺伝子断片の結合部位に N-ヌクレオチドを挿入することで、さらにアミノ酸配列の多様性獲得に寄与する [Benedict *et al.*, 2000]。抗体軽鎖には、D 領域がないため、V 領域と J 領域が結合する VJ 組換えとなる。さらに、体細胞超変異という活性化誘導脱アミノ化酵素（activation induced cytidine deaminase ; AID）による点変異によって、さらなる多様性を獲得している [Muramatsu



*et al.*, 2000]。上記の機構により、抗体は、あらゆる抗原に結合できる多様性を獲得している。

B 細胞は、免疫応答に応じて、適切な定常領域に変換していく仕組みを有している。B 細胞は、造血幹細胞から pro B 細胞、pre B 細胞、未熟 B 細胞に分化する。未熟 B 細胞では、IgM を発現しているが、抗原刺激により、IgM から IgE、IgG などにクラススイッチし、抗体産生する形質細胞およびメモリー細胞に分化することが知られている。クラススイッチは IgM、IgE、IgG などをコードする重鎖定常領域の DNA の切断および結合を介して起こる。IgM または IgD を細胞表面に発現する B 細胞は、CD40 および B 細胞抗原受容体 (B cell receptor ; BCR) を介した T 細胞の CD40 リガンドまたは T 細胞受容体 (T cell receptor ; TCR) の相互作用により、AID を発現させクラススイッチを誘導する [Muramatsu *et al.*, 2000]。

### 1-1-3 ヒト IgG の構造および機能

現在、抗体医薬として承認されている免疫グロブリンのクラスは、IgG のみである [Grilo and Mantalaris, 2018]。IgG は 2 つの 50kDa の重鎖および 2 つの 25kDa 軽鎖から構成されており、それぞれがヘテロ二量体を形成し、さらに 2 つのヘテロ二量体同士がジスルフィド結合で連結している。重鎖と軽鎖は、それぞれ可変領域 (variable region) および定常領域 (constant region) から構成されており、Fab ; fragment, antigen binding 領域と Fc ; Fragment, Crystallizable 領域に分けられる。Fab 領域は、抗原結合部位であり、Fc 領域は、エフェクター機能発現に関する。重鎖は、N 末端側から順に重鎖可変領域 (variable heavy ; VH) および重鎖定常領域 CH1(constant heavy1)、Hinge (ヒンジ)、CH2 および CH3 で構成されている。軽鎖は、N 末端側から順に軽鎖可変領域 (variable light ; VL) および軽鎖定常領域 (constant light ; CL) から構成されている。軽鎖の定常領域は、 $\kappa$  (カッパ) および  $\lambda$  (ラムダ) 定常領域に分類される。生体内では、IgG1 は、タンパク質の抗原に対して誘導され、サブクラスの血中の割合は 60%程度で、最も多く存在している。IgG2 は、細菌の多糖抗原に対して誘導され、血中の割合は 32%程度である。IgG3 は、細胞傷害活性が高く、そのため、半減期が短く制御されている。血中の割合は、4%程度である。また、ウイルス感染時には、IgG1 と IgG3 が発現するが、感染の初期に IgG3 が発現している。IgG4 は、アレルゲンに対して誘導され、長期間で反復の抗原感作により IgG4 の血中の割合は高くなる。免疫療法において、症状の軽減は IgG4 の誘導と相関があり、免疫反応を抑制し、免疫寛容に関与しているという報告がある [Aalberse *et al.*, 2009; Vidarsson *et al.*, 2014]。また、サブクラスの中でも定常領域のヒンジ領域はアミノ酸の数および重鎖間のジスルフィド結合の数が大きく異なる。IgG のサブクラスの構造の模式図を Fig. 1-2 に示し、また、IgG のサブクラスの特徴を Table. 1-1 にまとめた [Vidarsson *et al.*, 2014]。

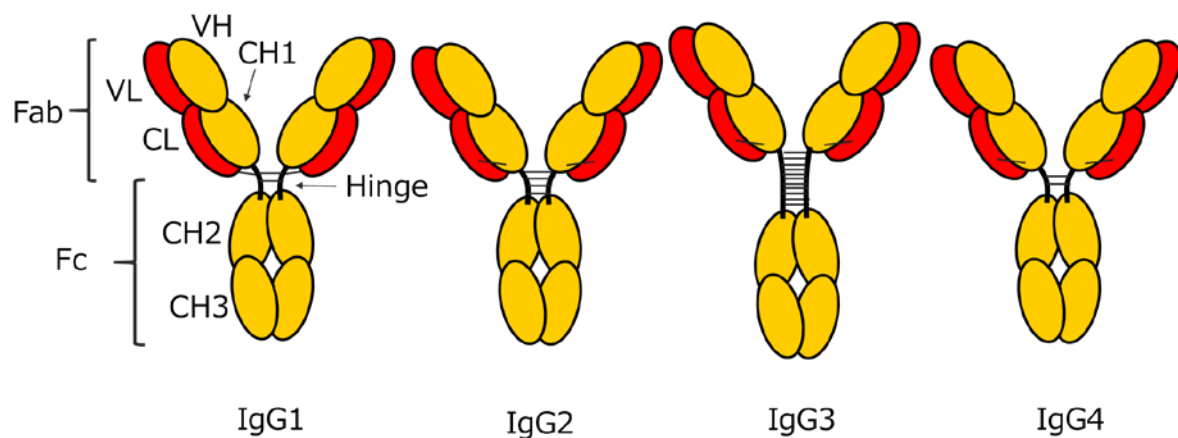


Fig. 1-2 ヒト IgG サブクラスの構造

Table 1-1 ヒト IgG サブクラスの性質

	ヒトIgG サブクラス			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
分子量(kD)	146	146	170	146
ヒンジ領域のアミノ酸の数	15	12	62	12
重鎖間のジスルフィド結合の数	2	4	11	2
血中濃度 (g/L)	6.98	3.8	0.51	0.56
血中の割合 (%)	60	32	4	4
血中半減期(日間)	21	21	7/~21	21
<b>抗原の種類への反応性</b>				
タンパク質	++	+/-	++	++
多糖類	+	+++	+/-	+/-
アレルゲン	+	-	-	+++

IgG サブクラスの Fc 領域のアミノ酸配列の相同性は 90% 以上である一方で、その機能の発現が異なる [Vidarsson *et al.*, 2014]。エフェクター機能とは、抗体が結合した細胞を殺傷して取り除く作用であり、補体依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity ; CDC) 活性、抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity ; ADCC) 活性および抗体依存性細胞貪食 (antibody-dependent cellular phagocytosis ; ADCP) が知られている。CDC は、活性化された補体系によって引き起こされる細胞傷害活性であり、C1q が Fc 領域に結合することで発揮される。IgG のサブクラスによって C1q の結合能は異なり、IgG3 > IgG1 > IgG2 の順で結合能が高く、IgG4 は結合能がほとんどみられない [Vidarsson *et al.*, 2014]。

ADCC は、マクロファージ、ナチュラルキラー (natural killer ; NK) 細胞などの表面に発現している Fc ガンマ受容体 (Fc gamma receptor ; FcγR) に抗体の Fc 領域が結合し、細胞が活性化されることで誘導される細胞傷害活性である。ADCP は、単球、マクロファージなどに発現している FcγR と抗体の相互作用により、細胞の貪食をもたらす。FcγR の種類としては、活性化型である FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIb と抑制型である FcγRIIb がある (Table.1-2) [Kaifu and Nakamura, 2017; Nimmerjahn and Ravetch, 2008]。活性化型 FcγR を発現している細胞は細胞内に immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; ITAM を有しシグナルを介して、ADCC や ADCP のエフェクター機能を発揮する。一方で、抑制型 FcγR を発現している細胞は、細胞内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif ; ITIM を介した活性化シグナルにブレーキをかけている [Nimmerjahn and Ravetch, 2008]。

Table 1-2 FcγR の種類と主な発現細胞

FcγR の種類	発現細胞
FcγRI	マクロファージ、単球、好中球、樹状細胞
FcγRIIa	マクロファージ、単球、好中球、樹状細胞、好酸球、樹状細胞、血小板
FcγRIIb	B 細胞、マクロファージ、単球、好塩基球、樹状細胞
FcγRIIIa	マクロファージ、単球、NK 細胞、樹状細胞
FcγRIIIb	好中球、好酸球、好塩基球

IgG のサブクラスは、それぞれの FcγR への親和性が異なるため、エフェクター機能も異なる。IgG1 および IgG3 はエフェクター機能が高く、IgG2 および IgG4 は低いことが知られている [Vidarsson *et al.*, 2014]。エフェクター機能に関するパラメーターとして、IgG サブクラスの C1q および FcγR への結合性を Table. 1-3 にまとめた。

抗がん剤としての抗体医薬の有効性は、FcγR を介したエフェクター機能に依存しており、これには、FcγRIIIa を介した NK 細胞の活性化によって生じる ADCC によって標的のがん細胞を死滅させるものである。また、興味深いことに、FcγRIIIa には、IgG1 に対して高親和性の FcγRIIIa V158 および低親和性の FcγRIIIa F158 の多型が存在しているが、IgG1 の ADCC 活性は、NK 細胞に発現する多型によって異なる。すべての抗体医薬の臨床試験で同様な結果ということではないものの、高親和性 FcγRIIIa V158 と低親和性 FcγRIIIa F158 の多型を有する患者群でリツキシマブまたはトラスツズマブの有効性は、FcγRIIIa V158 の多型の患者群で有意であると報告されている [Kaifu and Nakamura, 2017; Wang *et al.*, 2018]。これらの背景から、抗体工学により、FcγRIIIa への結合を高めた IgG の改良研究が進んでいる [Wang *et al.*, 2018]。また、生体内における IgG の細胞内のトラフィッキングおよび半減期は neonatal Fc receptor ; FcRn が重要な役割を果たしている [Rath *et al.*, 2013]。FcRn は、FcRn α 鎖および β2 マイクログロブリンから構成され、非共有結合でヘテロダイマーとして存在する [Burmeister *et al.*, 1994]。FcRn は、IgG の Fc 領域とエンドソーム内の弱酸性 pH (6.0 – 6.5) で結合する。細胞内に取り込まれた IgG は、エンドソームで FcRn に結合し、血液中にリサイクリングされる。このように、FcRn は、IgG のリソソームでの分解を阻止し、血中濃度の維持に機能している。

Table 1-3 IgG サブクラスのエフェクター機能に関するパラメーター

	ヒトIgG サブクラス			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
<b>補体活性</b>				
C1q 結合性	++	+	+++	-
<b>Fc 受容体結合性</b>				
FcγR1	+++	-	+++	++
FcγR2a H131	+++	++	+++	++
FcγR2a R131	+++	+	+++	++
FcγR2b	+	-	+	+
FcγR3a F158	++	-	++	-
FcγR3a V158	+++	+	+++	++
FcγR3b	+++	-	+++	-

#### 1-1-4 抗体医薬の開発および承認状況

製薬産業において、抗体医薬は主要なモダリティの1つとして位置づけられている。医薬品としての抗体モダリティの特徴は、安全性、多様性、特異性、溶解性、製造性、長い血中半減期そして安定性が挙げられる [Wang *et al.*, 2018]。日本製薬工業協会の医薬産業政策研究所の調査によると、世界における抗体医薬の開発段階は、全モダリティに対して、販売・承認 2.7%、申請 8.7%、Phase3 段階 9.5%、Phase2 段階 10.5%、Phase1 段階 13.8%と開発後期段階(承認、申請、Phase3)に比べ開発早期段階(Phase1,2)で割合が高くなっている [鍵井英之, 2018]。従来の低分子モダリティの開発割合は、全モダリティに対して、販売・承認 68.6%、申請 70.7%、Phase3 段階 59.1%、Phase2 段階 51.9%、Phase1 段階 53.7%と依然として高水準ではあるが、開発早期段階の割合が低くなっている傾向があり、従来の低分子モダリティから、バイオ医薬品を含む抗体モダリティへ研究開発がシフトしつつある [鍵井英之, 2018]。2018 年現在まで 70 品目以上の抗体医薬が日本、米国または欧州にて承認されている (Table1-4、1-5)

[Ecker *et al.*, 2015; Kaplon and Reichert, 2019; Kaplon and Reichert, 2018b; Reichert, 2016; Reichert, 2017; Sakanaka, 2017; 齊藤幹良, 2016; 米国食品医薬品局 (FDA)、ヨーロッパ医薬品庁 (EMA)、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) ホームページ]。主な承認された抗体医薬の市場性は、2017年の売上高で、980億アメリカドルを超えており、2013年以来、成長率は毎年7.2%以上であり、2016年から2017年の成長率は18.3%である [Grilo and Mantalaris, 2019]。2013年から2017年における承認された抗体医薬の疾患領域の数は、がん領域：15、血液領域：12、皮膚領域：9、リウマチ領域：8、消化器領域：7、呼吸器領域：7、整形外科領域：5、心臓領域：3、眼科領域：2、免疫領域：2、腎領域：1である。例えば、2000年前後には、関節リウマチ治療薬であるヒューミラや乳がん治療薬であるハーセプチンが承認されているが、2015年は高コレステロール血症治療薬のレパーサ、2017年は、血友病治療薬のヘムライブラ、2018年には複数の片頭痛予防薬が承認され、適応疾患の領域が広がりつつある [Grilo and Mantalaris, 2019]。抗体フォーマットの割合は、ヒト抗体：54%、ヒト化抗体：32%、キメラ抗体：14%であり [Grilo and Mantalaris, 2019]、安全性の観点で、免疫原性が低減されたヒト抗体およびヒト化抗体が大多数を占めている。IgG サブクラスの割合は、IgG1：79%、IgG2：7%、IgG4：13%、その他：4%であり、適応疾患によってエフェクター機能の必要性など作用機序に応じたサブクラスの選択がされている [Grilo and Mantalaris, 2019]。

**Table 1-4** 日本、米国または欧州における承認された主な抗体薬品 (キメラ抗体、ヒト化抗体)

名称	商品名	種類	標的	主な適応疾患	承認年
Rituximab	Rituxan/MabThera	chimera IgG1k	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	1997
Basiliximab	Simulect	chimera IgG1k	CD25	急性免疫拒絶反応	1998
Infliximab	Remicade	chimera IgG1k	TNF $\alpha$	関節リウマチ	1998
Cetuximab	Erbitux	chimera IgG1k	EGFR	頭頸部がん、結腸・直腸がん	2003
Palivizumab	Synagis	humanized IgG1k	RSV F protein	RSウイルス感染	1998
Trastuzumab	Herceptin	humanized IgG1k	HER2	転移性乳がん	1998
Alemtuzumab	Campath	humanized IgG1k	CD52	B細胞性慢性リンパ性白血病	2001
Omalizumab	Xolair	humanized IgG1k	IgE	喘息	2003
Bevacizumab	Avastin	humanized IgG1k	VEGF	結腸・直腸がん	2004
Natalizumab	Tysabri	humanized IgG4k	Integrin $\alpha$ 4 $\beta$ 1	多発性硬化症	2004
Tocilizumab	Actemra	humanized IgG1k	IL-6R	キャスルマン病、関節リウマチ	2005
Ranibizumab	Lucentis	humanized IgG1kFab	VEGF	加齢黄斑変性	2006
Eculizumab	Soliris	humanized IgG2/4k	C5	発作性夜間血色素尿症	2007
Mogamulizumab	Poteligeo	humanized IgG1k	CCR4	成人T細胞白血病リンパ腫	2012
Vedolizumab	Entyvio	humanized IgG1	integrin $\alpha$ 4 $\beta$ 7	潰瘍性大腸炎	2014
Pembrolizumab	Keytruda	humanized IgG4k	PD-1	転移性メラノーマ	2014
Mepolizumab	Nucala	humanized IgG1k	IL-5	喘息	2015
Elotuzumab	Empliciti	humanized IgG1k	CS1	多発性骨髄腫	2015
ixekizumab	Taltz	humanized IgG4	IL-17A	乾癬	2016
reslizumab	Cinqair	humanized IgG4k	IL-5	喘息	2016
atezolizumab	Tecentriq	humanized IgG1k	PD-L1	尿路上皮がん	2016
ocrelizumab	Ocrevus	humanized IgG1	CD20	多発性硬化症	2017
emicizumab	Hemlibra	humanized IgG4k	FIXa, FX	血友病A	2017
benralizumab	Fasenra	humanized IgG1k	IL-5R asubunit	喘息	2017
Tildrakizumab	Ilumya	humanized IgG1	IL-23 p19	乾癬	2018
galcanezumab	EMGALITY	humanized IgG4	CGRP	偏頭痛	2018
Ibalizumab	Trogarzo	humanized IgG4	CD4	HIV	2018
Fremanezumab	Ajovy	humanized IgG2	CGRP	偏頭痛	2018

Table 1-4 は以下の参考文献より改変

Ecker *et al.*, 2015; Kaplon and Reichert, 2019; Kaplon and Reichert, 2018b; Reichert, 2016; Reichert, 2017; Sakanaka, 2017; 齊藤幹良, 2016;

米国食品医薬品局 (FDA)、ヨーロッパ医薬品庁 (EMA)、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) ホームページ



**Table 1-5** 日本、米国または欧州における承認された主な抗体薬品（ヒト抗体）

名称	商品名	種類	標的	主な適応疾患	承認年
Adalimumab	Humira	human IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2002
Panitumumab	Vectibix	human IgG2κ	EGFR	結腸・直腸がん	2006
Golimumab	Simponi	human IgG1κ	TNFα	関節リウマチ	2009
Ustekinumab	Stelara	human IgG1κ	IL12/IL23	乾癬	2009
Canakinumab	Ilaris	human IgG1κ	IL-1β	クリオピリン関連周期性発熱症候群	2009
Denosumab	Ranmark	human IgG2	RANKL	骨粗鬆症	2010
Ipilimumab	Yervoy	human IgG1κ	CTLA4	転移性メラノーマ	2011
Belimumab	Benlysta	human IgG1λ	BlyS	全身性エリテマトーデス	2011
Raxibacumab	Abthrax	human IgG1λ	BAPA	肺炎疽	2012
Ramucirumab	Cyramza	human IgG1	VEGFR2	胃がん	2014
Nivolumab	Opdivo	human IgG4	PD-1	転移性メラノーマ	2014
Secukinumab	Cosentyx	human IgG1κ	IL17-A	乾癬	2014
Evolocumab	Repatha	human IgG2	PCSK9	高脂血症	2015
Alirocumab	Praluent	human IgG1	PCSK9	高脂血症	2015
brodalumab	Lumicef	human IgG2	IL17R	乾癬	2016
olaratumab	Lartruvo	human IgG1	PDGFR	軟部肉腫	2016
bezlotoxumab	Zinplava	human IgG1	<i>C. difficile</i> toxin B	クロストリジウム・ディフィシル感染症	2017
avelumab	Bavencio	human IgG1λ	PD-L1	メルケル細胞癌	2017
durvalumab	Imfinzi	human IgG1κ	PD-L1	尿路上皮癌	2017
dupilumab	Dupixent	human IgG4	IL-4Ra	アトピー性皮膚炎	2017
bezlotoxumab	ZINPLAVA	human IgG1κ	<i>C. difficile</i> toxin B	クロストリジウム・ディフィシル感染症	2017
guselkumab	TREMFYA	human IgG1λ	IL-23	乾癬	2017
sarilumab	KEVZARA	human IgG1κ	IL-6R α subunit	関節リウマチ	2017
burosumab	CRYSVITA	human IgG1κ	FGF23	X 染色体遺伝性低リン血症	2018
erenumab	AIMOVIG	human IgG2	CGRP receptor	偏頭痛	2018
Lanadelumab	Takhzyro	human IgG	Plasma kallikrein	遺伝性血管性浮腫の発作	2018
Cemiplimab	Libtayo	human IgG4	PD-1	進行性皮膚扁平上皮がん	2018

Table 1-5 は以下の参考文献より改変

Ecker *et al.*, 2015; Kaplon and Reichert, 2019; Kaplon and Reichert, 2018b; Reichert, 2016; Reichert, 2017; Sakanaka, 2017; 齊藤幹良, 2016;

米国食品医薬品局（FDA）、ヨーロッパ医薬品庁（EMA）、医薬品医療機器総合機構（PMDA）ホームページ

### 1-1-5 ヒト IgG4 の抗体医薬の研究開発状況

現在、抗体医薬品は、その用途に合わせて、IgG のサブクラスが選択されている [Salfeld, 2007]。例えば、IgG1 は、ADCC および CDC などのエフェクター活性によって腫瘍細胞を除去するという薬効コンセプトにて、多数の抗体医薬品で選択されている。一方で、IgG2 または、IgG4 は、結合するだけで薬効を示すため、エフェクター活性を必要としないアンタゴニスト抗体、アゴニスト抗体または中和抗体などのフォーマットとして選択されている [Labrijn *et al.*, 2008]。これまでに承認された IgG4 型の抗体医薬品は、タイサブリ、オプジーボ、キートルーダ、トルツ、デュピクセント、ヘムライブラなどが挙げられる [Poiron *et al.*, 2010; Janice, 2018]。例えば、免疫チェックポイント阻害剤であるオプジーボは、活性化 T 細胞の細胞表面に発現している programmed cell death 1 (PD-1) に対するヒト化抗体で、免疫反応を抑制的に作用するがん細胞に発現する programmed cell death-ligand1 (PD-L1) のシグナルをブロックするアンタゴニスト抗体であり、免疫応答を増強し抗腫瘍効果を発揮している [Iwai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014]。In vitro の解析において、同じ可変領域で、定常領域を IgG1 型と IgG4 型の抗 PD-1 抗体の ADCC 活性を比較したところ、IgG1 型では ADCC 活性が確認されたが、IgG4 型では ADCC 活性が検出されないという報告がある [Wang *et al.*, 2014]。PD-1 は T 細胞に発現しているため、細胞傷害活性は予期せぬ副作用を引き起こす懸念があり、細胞傷害活性が検出されない IgG4 型で研究および開発が進められた。また、オプジーボの臨床試験において、T 細胞の割合に顕著な変化がないことが確認されている [Grosso *et al.*, 2013]。このように、エフェクター機能を必要としない抗体医薬の研究開発も活発化している状況であり、現在、臨床開発段階にある IgG4 の抗体医薬品は 50 品目以上挙げられる。引用文献を参考に、現在の開発段階にある IgG4 の抗体医薬を Table 1-6、1-7、1-8 にまとめた [Poiron *et al.*, 2010]。

**Table 1-6 IgG4 の抗体医薬の臨床開発状況 (Phase III、PhaseII/III、PhaseII)**

名称	構造	標的	主な適応疾患*	疾患領域	開発ステージ
lerdelimumab	IgG4	TGF beta2	Glaucoma surgery	Ophthalmology	Phase III
camrelizumab	IgG4 - kappa	PD-1	Carcinoma, esophageal	Oncology	Phase III
crenezumab	IgG4 - kappa	Abeta42, Abeta40	Alzheimer's disease (AD)	Neurology	Phase III
evinacumab	IgG4 - kappa	ANGPTL3	Homozygous familial hypercholesterolemia	Cardiovascular diseases	Phase III
fasinumab	IgG4 - kappa	NGF	Osteoarthritis (OA)	Immunology	Phase III
ibalizumab	IgG4 - kappa	CD4	HIV-1 infection, AIDS	Infectiology	Phase III
lebrikizumab	IgG4 - kappa	IL13	Asthma	Immunology	Phase III
olokizumab	IgG4 - kappa	IL6	Rheumatoid arthritis (RA)	Immunology	Phase III
sutimlimab	IgG4 - kappa	complement C1s	Cold agglutinin disease	Hematology	Phase III
tabalumab	IgG4 - kappa	BAFF	Systemic lupus erythematosus	Immunology	Phase III
tislelizumab	IgG4 - kappa	PD-1	Cancers, non-small cell lung (NSCLC)	Oncology	Phase III
toripalimab	IgG4 - kappa	PD-1	Melanoma, metastatic	Oncology	Phase III
tralokinumab	IgG4 - lambda	IL13	Asthma, severe	Immunology	Phase III
rovelizumab	IgG4	CD11a, MAC-1	Ischemic stroke	Hematology	Phase III
leronlimab	IgG4 - kappa	CCR5	HIV-1 infection, AIDS	Infectiology	Phase II/III
andecaliximab	IgG4 - kappa	MMP9	Crohn's disease (CD)	Immunology	Phase II
bertilimumab	IgG4 - kappa	CCL11	Crohn's disease (CD)	Immunology	Phase II
bleselumab	IgG4 - kappa	CD40	Psoriasis	Immunology	Phase II
blosozumab	IgG4 - kappa	SOST	Osteoporosis, postmenopausal women	Osteology	Phase II
cedelizumab	IgG4 - kappa	CD4	Allograft rejection (Prevention)	Immunology	Phase II
concizumab	IgG4 - kappa	TFPI	Hemophilia B	Hematology	Phase II

\*適応疾患が複数ある場合は、最も臨床開発ステージが高い疾患を記載している。

参考文献：Poiron *et al.*, 2010 より改変

**Table 1-7 IgG4 の抗体医薬の臨床開発状況 (Phase II、Phase I/II)**

名称	構造	標的	主な適応疾患*	疾患領域	開発ステージ
emibetuzumab	IgG4 - kappa	MET	Cancers, gastric	Oncology	Phase II
fletikumab	IgG4 - kappa	IL20	Rheumatoid arthritis (RA)	Immunology	Phase II
frovocimab	IgG4 - kappa	PCSK9	Heterozygous familial hypercholesterolemia (HeFH)	Cardiovascular diseases	Phase II
gosuranemab	IgG4 - kappa	tau	Progressive supranuclear palsy (PSP)	Neurology	Phase II
inlacumab	IgG4 - kappa	selectin P	Myocardial infarction	Cardiology	Phase II
landogrozumab	IgG4 - kappa	myostatin	Cachexia	Immunology	Phase II
lirilumab	IgG4 - kappa	KIRD2 subgroup	Acute myeloid leukemia	Hematology; Oncology	Phase II
mirikizumab	IgG4 - kappa	IL23A	Crohn's disease (CD)	Immunology	Phase II
relatlimab	IgG4 - kappa	LAG3	Mesothelioma	Oncology	Phase II
rozanolixizumab	IgG4 - kappa	FCRN	Myasthenia Gravis (MG)	Immunology	Phase II
simtuzumab	IgG4 - kappa	LOXL2	Cancers, pancreatic	Oncology	Phase II
spartalizumab	IgG4 - kappa	PD-1	Melanoma (stage IIb and IV)	Oncology	Phase II
temelimab	IgG4 - kappa	MRSV	Multiple sclerosis (MS)	Immunology	Phase II
timolumab	IgG4 - kappa	VAP1	Cholangitis, primary sclerosing (PSC)	Inflammation	Phase II
trevogrumab	IgG4 - kappa	myostatin	Sarcopenia	Myology	Phase II
urelumab	IgG4 - kappa	4-1BB	Tumors	Oncology	Phase II
vatelizumab	IgG4 - kappa	integrin alpha2 subunit	Multiple sclerosis (MS)	Immunology	Phase II
clenoliximab	IgG4 - lambda	CD4	Asthma	Immunology	Phase II
mavrilimumab	IgG4 - lambda	GM-CSF-R-alpha	Rheumatoid arthritis (RA)	Immunology	Phase II
metelimumab	IgG4 - kappa	TGF beta	Fibrotic diseases	Dermatology	Phase I/II

\*適応疾患が複数ある場合は、最も臨床開発ステージが高い疾患を記載している。

参考文献：Poiron *et al.*, 2010 より改変

**Table 1-8 IgG4 の抗体医薬の臨床開発および承認状況 (Phase I、承認)**

名称	構造	標的	主な適応疾患*	疾患領域	開発ステージ
atinumab	IgG4 - kappa	RTN4	Spinal cord injury, acute	Myelopathy	Phase I
cabiralizumab	IgG4 - kappa	CSF1R	Rheumatoid arthritis (RA)	Immunology	Phase I
cetrelimab	IgG4 - kappa	PD-1	Solid tumors	Oncology	Phase I
crotedumab	IgG4 - kappa	GCGR	Type 2 diabetes	Endocrinology	Phase I
dostarlimab	IgG4 - kappa	PD-1	Solid tumors	Oncology	Phase I
fresolimumab	IgG4 - kappa	TGFbeta	Idiopathic pulmonary fibrosis	Respiratory diseases	Phase I
monalizumab	IgG4 - kappa	NKG2A	Cancers	Oncology	Phase I
orilanolimab	IgG4 - kappa	FCRN	Autoimmune diseases	Immunology	Phase I
rinucumab	IgG4 - kappa	PDGFRB	Age-related macular degeneration (AMD)	Ophthalmology	Phase I
sintilimab	IgG4 - kappa	PD-1	Solid tumors	Oncology	Phase I
ulocuplumab	IgG4 - kappa	CXCR4	Acute myeloid leukemia	Hematology; Oncology	Phase I
cemiplimab	IgG4 - kappa	PD-1	Carcinoma	Oncology	承認
dupilumab	IgG4 - kappa	IL4R	Asthma, Atopic dermatitis	Immunology	承認
emicizumab	IgG4 - kappa	factor IX, factor X	Hemophilia A	Hematology	承認
galcanezumab	IgG4 - kappa	CALCB	Migraine	Neurology	承認
ixekizumab	IgG4 - kappa	IL17A	Psoriasis, moderate to severe plaque	Immunology	承認
natalizumab	IgG4 - kappa	integrin alpha4	Multiple sclerosis (MS)	Immunology	承認
nivolumab	IgG4 - kappa	PD-1	Melanoma, metastatic or unresectable	Oncology	承認
pembrolizumab	IgG4 - kappa	PD-1	Melanoma, metastatic	Oncology	承認
reslizumab	IgG4	IL-5	Adult eosinophilic asthma	Immunology	承認

\*適応疾患が複数ある場合は、最も臨床開発ステージが高い疾患を記載している。

参考文献：Poiron *et al.*, 2010 より改変

### 1-1-6 ヒト IgG サブクラスにおける安定性

抗体医薬品として活用されている IgG はタンパク質の中でも安定性が高いという特徴があるものの、近年、IgG の不安定性に関するいくつかの報告がある [Correia, 2010; Vidarsson *et al.*, 2014]。ヒト IgG1 は抗体医薬の中でも最も活用されているサブクラスであるが、抗体医薬の製造における生産細胞の培養において、IgG1 のヒンジが切断される現象が見出されている [Yan *et al.*, 2009]。この現象はラジカル誘導性であり、重鎖の 226 番目のアスパラギン酸から 230 番目のスレオニンの中で切断を受け、Fab ドメインと ヒンジを有する Fc となる。切断されるアミノ酸が 229 番目のヒスチジンであり、その箇所のアミノ酸改変によってある程度のヒンジ切断を抑制できている [Yates *et al.*, 2010]。

IgG2 または IgG4 は、IgG1 型と比較すると開発実績が少ないものの、ADCC または CDC 活性が低いため、エフェクター活性を必要としないアンタゴニスト抗体、アゴニスト抗体または、中和抗体のフォーマットとして用いられることが多く、いくつかの抗体医薬は承認されている。

IgG2 型の抗体医薬では、骨粗鬆症の治療薬デノスマブや高コレステロール血症の治療薬エボロクマブが挙げられる。IgG2 の安定性に関する課題は、生体内において、IgG2 同士が結合して二量体化することが挙げられる [Yoo *et al.*, 2003]。この現象は、IgG2 同士がヒンジ領域を介してジスルフィド結合を形成している。通常、IgG2 は多糖抗原を認識することが多く、一般的に結合性は弱いため、IgG2 が二量体化することによりアビリティ効果により標的に強く結合できるようになると考えられている。

また、IgG2 は生体内で分子内のジスルフィド結合のかけ違いが生じて、IgG2A、IgG2A/B および IgG2B といったアイソフォームが存在することが報告されている [Dillon *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013; Wypych *et al.*, 2008]。アイソフォームの形態を Fig. 1-3 に示した [Vidarsson *et al.*, 2014]。さらにアイソフォームによっ

て、アゴニスト抗体の生物活性が異なることが報告されている [Grujic *et al.*, 2017]。これはアイソフォームによって、Fab の動きが制限されることで活性が変化すると考えられている。

IgG4 の安定性に関しては、他のサブクラスに比べ、以前よりよく知られている。生体内で、重鎖同士を結合しているヒンジ領域のジスルフィド結合が切断し、重鎖および軽鎖を 1 つずつ有するハーフ抗体の状態で存在している [Aalberse and Schuurman., 2002]。高度に保存されている重鎖の 226 番目から 229 番目のヒンジ領域は、システイン-プロリン-X-システインという配列であり、IgG4 は、システイン-プロリン-セリン-システインという配列で、226 番目と 229 番目のシステインがジスルフィド結合を形成している。228 番目のセリンを IgG1 型のプロリンにアミノ酸置換すると、劇的にハーフ抗体を抑制することができる。構造上、ヒンジのシステイン-プロリン-セリン-システインの 2 つのシステインが物理的にジスルフィド結合を形成しにくくなるためである [Aalberse and Schuurman., 2002]。現在、開発されている IgG4 型の抗体医薬は、228 番目のセリンをプロリンに置換した開発品が多く、例えば、IgG4 型の抗体医薬であるオプジーボも同様な変異を導入し、安定化されている [Wang *et al.*, 2014]。

また、IgG4 の安定性に関して、Fab-Arm Exchange という現象が報告されている [van der Neut Kolfshoten *et al.*, 2007]。IgG4 の Fab-Arm Exchange は、生体内で、IgG4 がハーフ抗体となり、異なるハーフ抗体同士が結合して二重特異性抗体になるという現象である (Fig.1-4) [Vidarsson *et al.*, 2014]。Fab-Arm Exchange は、*in vivo* において、約 50% が二重特異性抗体になりうることが示されている [van der Neut Kolfshoten *et al.*, 2007]。

興味深いことに、IgG4 型の抗体医薬であるタイサブりを投与した患者において、内在性の IgG4 と投与されたタイサブりが Fab-Arm Exchange を起こしていることが報告されている [Labrijn *et al.*, 2009]。タイサブりが投与された全ての患者に Fab-

Arm Exchange が確認されてはならず、個人差がでることが予想されている。タイサブリはヒンジ領域に安定化の変異が導入されていない システイン-プロリン-セリン-システインの IgG4 野生型の配列である。228 番目のセリンをプロリンに置換することで、Fab-Arm Exchange は劇的に抑制できることが分かっている [Labrijn *et al.*, 2009]。さらに、Fc 領域の CH3 の 409 番目のアルギニンをリジンに変換することで CH3 ドメイン同士の相互作用を強め、Fab-Arm Exchange を抑制できることが報告されている [Labrijn *et al.*, 2011]。また、409 番目以外にも、370 番目のリジンをスレオニンまたは、350 番目のスレオニンをイソロイシンに置換することでも Fab-Arm Exchange の抑制効果が認められる [Labrijn *et al.*, 2011]。

上記のような抗体の不安定性による不均一性は、抗体医薬を開発する上で予期せぬ副作用または有効性の変化をもたらす懸念があるため、その回避のためにアミノ酸改変などによる安定化が必要となっている。

このような背景から、本研究では、抗体の不安定性という課題の中でも、低 pH 条件下における IgG4 の凝集体形成の課題に着目し、アミノ酸改変による抗体安定化を目指し、検討を行った。以下、論述する。



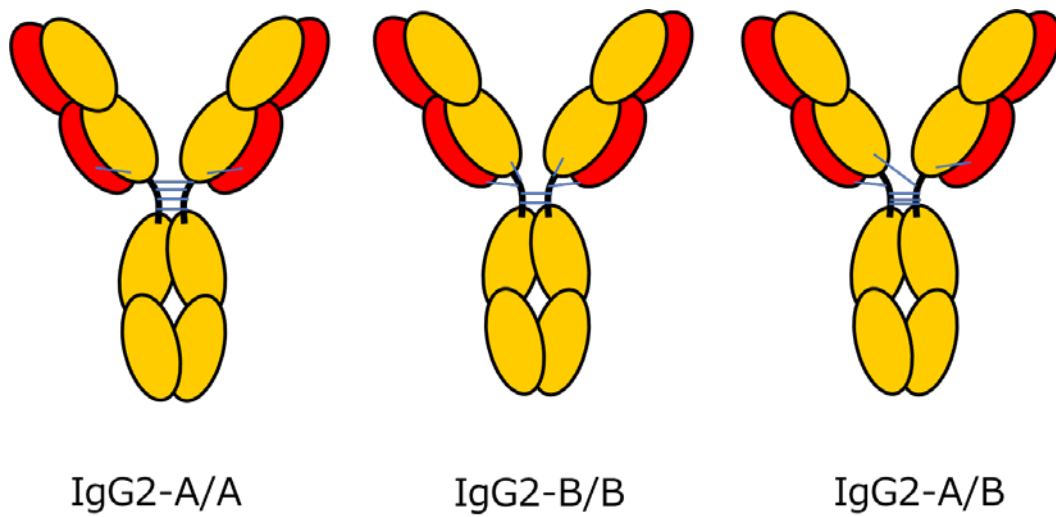


Fig. 1-3 ヒト IgG2 のアイソフォーム

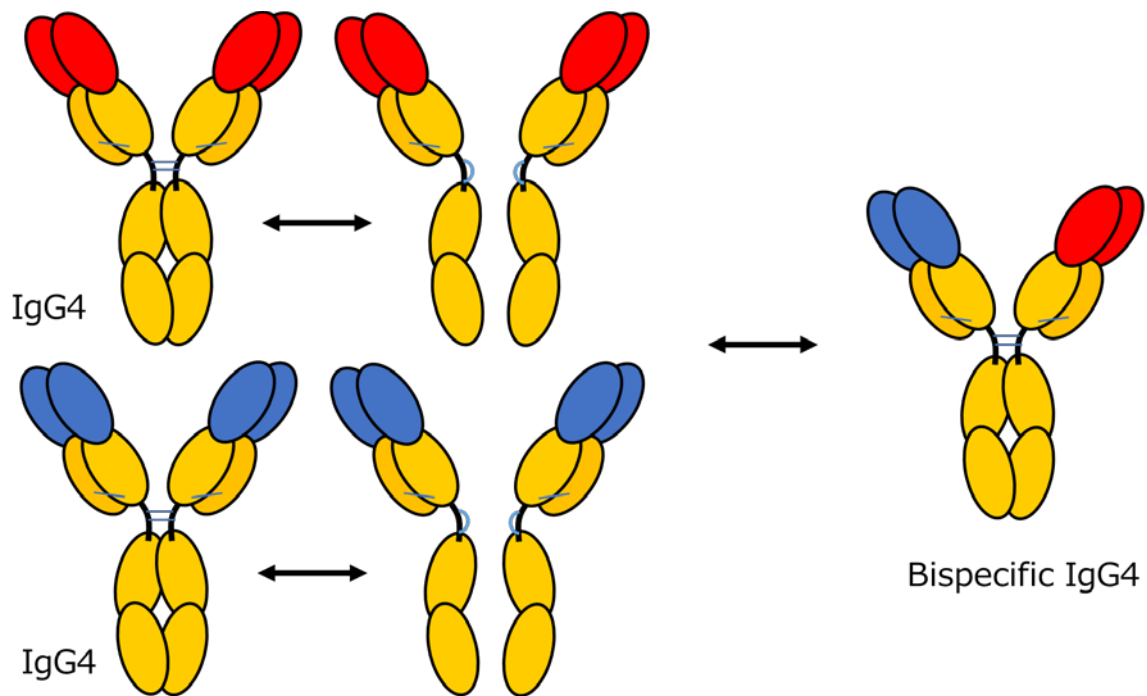


Fig. 1-4 ヒト IgG4 の Fab-Arm Exchange

## 1 – 2 引用文献

- Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology*. 2002; 105(1): 9-19.
- Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*. 2009; 39(4): 469-77.
- Benedict CL, Gilfillan S, Thai TH, Kearney JF. Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol Rev*. 2000; 175: 150-7.
- Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature*. 1994; 372(6504): 336-43.
- Correia IR. Stability of IgG isotypes in serum. *MAbs*. 2010; 2(3): 221-32.
- Dillon TM, Ricci MS, Vezina C, Flynn GC, Liu YD, Rehder DS, et al. Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem*. 2008; 283(23): 16206-15.
- Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*. 2015; 7(1): 9-14
- Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71: 101-32.
- Grilo AL, Mantalaris A. The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends Biotechnol*. 2019; 37(1): 9-16.
- Grosso J, Horak CE, Inzunza D, Cardona DM, Simon JS, Gupta AK, et al. Association of tumor PD-L1 expression and immune biomarkers with clinical activity in patients (pts) with advanced solid tumors treated with nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538). *J Clin Oncol*. 2013; 31(15): suppl 3016-3016.

Grujic O, Stevens J, Chou RY, Weiszmann JV, Sekirov L, Thomson C, et al. Impact of antibody subclass and disulfide isoform differences on the biological activity of CD200R and  $\beta$ klotho agonist antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 486(4): 985-91.

Gutzeit C, Chen K, Cerutti A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. *Eur J Immunol*. 2018; 48(7): 1101-13.

Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(19): 12293-7.

Janice M. Reichert, The Antibody Society; table updated Sep 27, 2018.

<https://www.antibodysociety.org/news/approved-antibodies/>

Kaifu T, Nakamura A. Polymorphisms of immunoglobulin receptors and the effects on clinical outcome in cancer immunotherapy and other immune diseases: a general review. *Int Immunol*. 2017; 29(7): 319-25.

Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2018. *MAbs*. 2018; 10(2): 183-203.

Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs*. 2019; 11(2): 219-238.

Klimovich VB. IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochemistry*. 2011; 76(5): 534-49.

Labrijn AF, Aalberse RC, Schuurman J. When binding is enough: nonactivating antibody formats. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20(4): 479-85.

Labrijn AF, Buijsse AO, van den Bremer ET, Verwilligen AY, Bleeker WK, Thorpe SJ, et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol*. 2009; 27(8): 767-71.

Labrijn AF, Rispens T, Meesters J, Rose RJ, den Bleker TH, Loverix S, et al. Species-specific determinants in the IgG CH3 domain enable Fab-arm exchange by affecting the noncovalent CH3-CH3 interaction strength. *J Immunol*. 2011; 187(6): 3238-46.

Liu YD, Chen X, Enk JZ, Plant M, Dillon TM, Flynn GC. Human IgG2 antibody disulfide rearrangement in vivo. *J Biol Chem*. 2008; 283(43): 29266-72.

Liu YD, Wang T, Chou R, Chen L, Kannan G, Stevenson R, et al. IgG2 disulfide isoform conversion kinetics. *Mol Immunol*. 2013; 54(2): 217-26.

Morton HC, van Egmond M, van de Winkel JG. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit Rev Immunol*. 1996; 16(4): 423-40.

Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000; 102(5): 553-63.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(1): 34-47.

Poiron C, Wu Y, Ginestoux C, Ehrenmann F, Patrice D, Lefranc M-P. IMGT/mAb-DB: the IMGT database for therapeutic monoclonal antibodies. *JOBIM* 2010; 13.

<http://www.imgt.org/mAb-DB/doc>

Ramsden DA, Baetz K, Wu GE. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22(10): 1785-96.

Rath T, Kuo TT, Baker K, Qiao SW, Kobayashi K, Yoshida M et al., The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG. *J Clin Immunol*. 2013; 33 Suppl 1: S9-17.

Reichert JM. Antibodies to watch in 2016. *MAbs*. 2016; 8(2): 197-204.

- Reichert JM. Antibodies to watch in 2017. *MAbs*. 2017; 9(2): 167-181.
- Rooney S, Chaudhuri J, Alt FW. The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol Rev*. 2004; 200: 115-31.
- Sakanaka C. Antibody Therapeutics: Bench to Bedside. *Yakugaku Zasshi*. 2017; 137(7): 817-22.
- Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(12): 1369-72.
- Schur PH. IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr Allergy*. 1988; 23: 1-11.
- Sutton BJ, Gould HJ. The human IgE network. *Nature*. 1993; 366(6454): 421-8.
- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983; 302(5909): 575-81.
- van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martínez-Martínez P, Vermeulen E, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*. 2007; 317(5844): 1554-7.
- Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014; 5: 520.
- Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT, Huang H, Feingersh D, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2(9): 846-56.
- Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell*. 2018; 9(1): 63-73.
- Wypych J, Li M, Guo A, Zhang Z, Martinez T, Allen MJ, et al. Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms. *J Biol Chem*. 2008; 283(23): 16194-205.
- Yan B, Yates Z, Balland A, Kleemann GR. Human IgG1 hinge fragmentation as the result of

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated radical cleavage. *J Biol Chem.* 2009; 284(51): 35390-402.

Yates Z, Gunasekaran K, Zhou H, Hu Z, Liu Z, Ketchum RR, et al. Histidine residue mediates radical-induced hinge cleavage of human IgG1. *J Biol Chem.* 2010; 285(24): 18662-71.

Yoo EM, Wims LA, Chan LA, Morrison SL. Human IgG2 can form covalent dimers. *J Immunol.* 2003; 170(6): 3134-8.

鍵井英之 新モダリティの開発動向の調査 医薬産業政策研究所 政策研ニュース  
No.55 2018年11月

<http://www.jpma.or.jp/opir/news/news-55.pdf>

斉藤幹良 抗体医薬の現状と新たな潮流, *Folia Pharmacol. Jpn.* 2016;147:168-74

## 第二章

### ヒト IgG4 抗体の低 pH 誘導性凝集体形成におけるアミノ酸改変による抑制効果に関する研究

#### 2-1 要旨

ヒト IgG4 は、ADCC または CDC 活性といった細胞傷害性のエフェクター活性が低いいため、結合することで作用できるアンタゴニスト、アゴニストまたは中和抗体の抗体医薬のフォーマットとして適している。IgG4 は、IgG1 と比較して凝集体を形成しやすく、特に低 pH 条件下でその傾向がある。抗体医薬は、精製の製造プロセスにおいて、低い pH に曝されるため、低 pH 誘導性の凝集体形成抑制は解決すべき研究課題の一つである。

本研究目的は、IgG4 において、凝集体形成を抑制できる改変体を確立することである。今回の検討において、一般的に安定化 IgG4 として知られているコアヒンジ領域の 228 番目のセリンをプロリンに置換した変異 (IgG4\_S228P) では、凝集体形成を抑制する効果は認められなかった。一方で、Fc 領域の CH3 ドメインを IgG4 から IgG1 のアミノ酸に変換することで、低 pH 誘導性の凝集体形成を抑制することが明らかとなった。さらに、凝集体形成の原因となっているアミノ酸を同定するために、CH3 において、IgG1 と IgG4 のアミノ酸配列を比較し、異なるアミノ酸を IgG4 から IgG1 のアミノ酸に置換した IgG4 改変体を作製したところ、IgG4 の 409 番目のアルギニンをリジンに置換した改変体 (IgG4PE\_R409K) において、IgG1 と同等な凝集体形成の抑制効果が認められた。また、可変領域が異なる複数の抗体においても、IgG4PE\_R409K の凝集体形成抑制効果は認められ、特定の抗体クローンに特有な現象ではないことが示唆された。さらに熱安定性を検討するために、示差走査熱量測定法により R409K のアミノ酸置換によって、CH3 の Tm 値が高くなることが示され、CH3 ドメインの構造的変化による安定性の向上が寄与していると示唆された。

また、IgG4 はハーフ抗体を形成することが知られているが、SDS-PAGE に供したところ、IgG4\_S228P はハーフ抗体の形成を抑制したが、IgG4\_R409K はハーフ抗体が確認され、IgG4\_R409K は、非共有結合による Fc と Fc の相互作用を増強することが示唆された。さらに、IgG4 における S228P および R409K のアミノ酸置換の組み合わせは、*in vitro* および *in vivo* で Fab-Arm Exchange を IgG1 と同等に抑制することが示された。最後に、R409K のアミノ酸置換は、抗体の抗原またはヒト Fc $\gamma$  受容体への結合および CDC 活性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。これらの結果は、IgG4PE\_R409K が、安定性をより改善した低エフェクター活性の抗体医薬のフォーマットの一つとなる可能性を示している。



## 2-2 研究背景

今日まで、50以上のモノクローナル抗体が癌、慢性疾患、自己免疫疾患に対する治療薬として承認されており、500を超えるモノクローナル抗体の臨床試験が進行中である [Poiron *et al.*, 2010]。2018年に米国または欧州において、12の抗体医薬が承認され、近年、多様な疾患を適応とし、IgG1、2または4のサブクラスが選択されている [Kaplon and Reichert, 2019]。抗体医薬は、所望の機能的作用のためにサブクラスを選択する必要がある [Salfeld, 2007]。IgG1は、CDC活性、ADCC活性などのエフェクター機能によって標的細胞を除去させるために必要とされており、さらに有効性を向上させるため、ADCCまたはCDC活性の増強技術が知られている [Elgundi *et al.*, 2016; Natsume *et al.*, 2009]。一方で、IgG2またはIgG4は、IgG1およびIgG3と比較して低い細胞傷害性のため、アンタゴニスト、アゴニストまたは中和作用が求められる抗体医薬のフォーマットとして適している [Labrijn *et al.*, 2008]。多くの抗体医薬は、IgG1サブクラスが使われている。しかしながら、IgG4サブクラスは多くはないものの、米国また欧州において2018年までナタリズマブ、ペンブロリズマブ、イクスキズマブ、リスリズマブ、ニボルマブ、エミシズマブ、ソラネズマブなどのIgG4の抗体医薬が承認されている。近年、腫瘍免疫領域において、CD4陽性T細胞など標的が正常細胞に発現している場合、細胞傷害性を有しないIgG4のフォーマットで臨床開発を進めているケースが多くなっている [Sheridan, 2015]。例えば、IgG1型のニボルマブは *in vitro* の試験において、ADCC活性が観察されたが、IgG4型であるニボルマブにADCC活性は認められず、そのため、IgG4が選択されている [Wang *et al.*, 2014]。IgG4は特徴的な物理化学的および生理学的特性があり、ヒトIgG4は、1つの軽鎖および1つの重鎖からなるハーフ抗体を形成できることが挙げられる。ハーフ抗体は、ヒンジ領域の重鎖間のジスルフィド結合が切断し、分子内でジスルフィド結合を有している [Schuurman *et al.*, 2001]。現在、IgG4の抗体医薬、例えばニボルマブは、ハーフ抗体の形成を抑制するために、228番目のセリンをプロリンに置

換 (S228P) したアミノ酸の改変を有している [Wang *et al.*, 2014]。さらに、IgG4 は、*in vitro* および *in vivo* において、可変領域が異なるハーフ抗体同士が結合することで、二重特異性抗体となる Fab-arm exchange という動的な現象が知られている [Labrijn *et al.*, 2009; van der Neut Kolfshoten *et al.*, 2007]。Fab-arm exchange は、S228P のヒンジ安定化で劇的に抑制できることが報告されている [Labrijn *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2015]。また、ヒンジ安定化だけではなく、CH3 ドメインの Fc 相互作用を高めるアミノ酸改変により Fab-arm exchange を抑制できることが報告されている [Davies *et al.*, 2013; Labrijn *et al.*, 2011]。

また、IgG4 は、低 pH 条件下で凝集体を形成しやすいという特徴を有する [Ejima *et al.*, 2007]。抗体の凝集体は、免疫原性、輸注反応および補体活性化などの安全性および有効性に影響をおよぼす懸念がある [Food and Drug Administration, 2014; Moussa *et al.*, 2016; Rosenberg, 2006]。抗体医薬の製造において、プロテイン A によるアフィニティ精製時に低 pH で溶出され、さらにウイルス不活化のため、一定時間、低 pH に曝されることで、凝集体の形成につながる [Mazzer *et al.*, 2015]。従って抗体医薬の臨床適用のためには、抗体の凝集体をできるだけ除去する必要がある。また、製造プロセスにおいて、凝集体が形成されない安定性を有する抗体分子の開発が理想的である。IgG4 のヒンジ安定化 S228P 変異は、pH 4.0 で IgG4 野生型と同様に凝集体を形成する傾向がある [Ito and Tsumoto, 2013; Ishikawa *et al.*, 2010]。さらに、IgG4 での S228P 変異を有するニボルマブは、pH 3.5 の条件下で約 30% の凝集体を形成するという報告もある [Liu *et al.*, 2016]。

S228P 変異体はインビトロ、インビボおよびヒト臨床試験において Fab-Arm Exchange を劇的に抑制することが報告されているが [Labrijn *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2015]、低 pH 誘導性の凝集体形成の抑制には、ヒンジ安定性だけでは不十分であり、ヒンジ以外の部位が関与していると予想される。一方で、IgG1 は低 pH 条件下で凝集体を形成しづらく、サブクラスでは、IgG1 > IgG2 > IgG4 の順で安定であることが

報告されている [Ito and Tsumoto, 2013; Ishikawa *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2014]。そこで、IgG1 および IgG4 の定常領域を交換することによって、凝集体を形成する原因となっているアミノ酸の特定を行った。その結果、IgG4 における凝集体形成に関与するアミノ酸を同定し、さらにアミノ酸改変により IgG1 と同等に凝集体形成抑制を示す安定化 IgG4 を見出した。また、安定化 IgG4 は、本来の IgG4 の生物学的特性に大きな変化を与えないことを報告する。

## 2-3 材料および方法

### 細胞株

ヒト B リンパ腫の細胞株である Raji および Ramos 細胞は、American Type Culture Collection から入手した。細胞は、10%のウシ胎児血清 (Gibco) を添加した RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich) で培養した。HEK-293F 細胞は、Invitrogen から入手し、Freestyle 培地 (Invitrogen) で培養した。上記の細胞は、入手元が提供する培養方法に従って継代培養した。

### 抗体の構築、発現および精製

発現ベクター-N5KG1 (Biogen) に C2B8 の VH および VL コード領域 (VH : Genbank アクセッション番号 AR000013、VL : Genbank アクセッション番号 AR015962) を挿入することにより、抗 CD20 抗体の発現ベクターを構築した。抗 CD20 抗体の発現ベクターを HEK-293F 細胞にトランスフェクトし、プロテイン A 結合セファロースカラム (GE Healthcare) を用いて抗 CD20 抗体を培養上清から精製した。さらに、サブクラス置換、定常領域のドメイン置換およびアミノ酸の点変異を有した以下の発現ベクターを作製した。IgG4 および IgG4\_S228P\_L235E(IgG4PE)、IgG1144E、IgG4411P、IgG4414P、IgG4441PE、IgG4PE\_Q355R、IgG4PE\_E356D、IgG4PE\_M358L、IgG4PE\_R409K、IgG4PE\_E419Q、IgG4PE\_L445P、IgG4PE\_K370E (アルファベットはアミノ酸の一文字表記。数字は Kabat らによる EU インデックス [Kabat *et al.*, 1991] を示す)。IgG4PE は、ハーフ抗体形成を抑制するために 228 番目のセリンをプロリンに置換した変異 (S228P) および抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を減少させるために、235 番目のロイシンをグルタミン酸に置換した変異 (L235E) を有するヒト IgG4 改変体である [Labrijn *et al.*, 2008]。IgG1144E は、IgG1 と IgG4PE の定常領域のハイブリッド抗体であり、IgG1 の CH1-ヒンジ領域と IgG4PE の CH2-CH3 領域を有する。IgG4411P は、CH1-ヒンジ領域が IgG4PE であり、CH2-CH3 が IgG1 であるハイブリ

ッド抗体である。IgG4414P は、CH1-ヒンジ領域および CH3 が IgG4PE であり、CH2 が IgG1 であるハイブリッド抗体である。IgG4441PE はまた、CH1、ヒンジ領域および CH2 が IgG4PE であり、CH3 が IgG1 であるハイブリッド抗体である。IgG4PE\_Q355R は、CH3 の 355 番目のグルタミンをアルギニンに置換した IgG4PE の変異体である。他の IgG4PE 変異体は記載されるように CH3 ドメインにアミノ酸の変異を有する。

プロテイン A 結合セファロースカラムにより精製した抗体を、脱塩カラム、NAP25 カラム (GE Healthcare) を用いてダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) (Gibco) に置換した。

#### 低 pH ストレスアッセイ

抗体に pH 2.7 の 0.1 mmol / L クエン酸緩衝液を添加し pH 3.4 に調整し、37°C で 10 分間または 60 分間インキュベートし、pH 8.0 の 500 mmol / L リン酸緩衝液で中和した。

#### サイズ排除クロマトグラフィー (SEC ; Size-exclusion chromatography)

G3000SWXL カラム (7.8 mm 内径 30 cm、東ソー) を用いた SEC-HPLC (Shimadzu Corp.) により可溶性の凝集体および分解物の含量を分析した[Ishikawa *et al.*, 2010]。移動相には、20 mM のリン酸ナトリウム (pH 7.0) 、500 mM の NaCl を用いた。流速は 0.5 mL / 分、検出波長は 215 nm、分析時間 30 分とした。抗体の溶出位置と分子量マーカー (オリエンタル酵母工業株式会社) の溶出位置を比較することにより、抗体の単量体、凝集体および分解物のピークを同定した。凝集体および分解物の含有量は、ピーク面積に基づいて測定した。

## モデル構造の解析

Protein Data Bank (PDB) に登録されているヒト IgG4 の Fc 領域の結晶構造解析データファイル (PDB ID=4C54) を用いて CH3 ドメインの中で、IgG1 と IgG4 で異なるアミノ酸の位置を Molecular Operating Environment (Chemical Computing Group) を用いて解析した。また、溶媒露出面積は、Molecular Operating Environment (Chemical Computing Group) の MOE ASA\_Calculator プログラム (株式会社 モルシス) によって算出した。目的のアミノ酸残基の溶媒露出面積の割合は、構造上での溶媒露出面積を、グリシン-X-グリシン (X は目的のアミノ酸残基を表す) の溶媒露出面積で除することで算出した。

## 示差走査型蛍光測定 (Differential Scanning Fluorimetry ; DSF)

D-PBS に希釈された 0.5 mg/mL の抗体溶液に最終的に 1000 倍希釈となるように SYPRO®Orange (Invitrogen) を添加し、Multiplate®PCR plates Low 96-well White (Bio-Rad) に分注した。C1000™ Thermal cycler (Bio-Rad) を用いて測定した。温度は 20°C から 95°C の範囲で 0.5°C ずつ上昇させ、10 秒間保持した。励起波長、蛍光波長はそれぞれ 473 nm、570 nm を用いた。解析は CFX Manger (Bio-Rad) を用いた。

## 示差走査熱量測定 (Differential Scanning calorimetry ; DSC)

抗体のドメインの熱安定性を DSC を用いて評価した。D-PBS に希釈された 0.5 mg/mL の抗体溶液を MicroCal VP-キャピラリーDSC システム (Malvern Instruments) を用いて測定した。温度は 25°C から 100°C の範囲で 1°C/分のスキャン速度で行った。各熱変性ピークの T<sub>m</sub> 値は、比熱容量の極大値を与える温度とした。

## SDS-PAGE

タンパク質は、非還元条件下で、8%-16%勾配 SDS-PAGE ゲル (Invitrogen) に供した。クマシーブリリアントブルーで染色したバンドは、LAS4000mini (FUJIFILM) によって画像化した。

## ハーブ抗体の定量化

タンパク質は、Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent) によってハーブ抗体含有量を定量化した。High Sensitivity Protein 250 キット (Agilent) を用いて入手元が提供する方法に従って実施した。Agilent 2100 エキスパートソフトウェア (Agilent) によって解析した。

## 抗 CD20 抗体および抗 VLA4 抗体の変異体の作製

λ軽鎖を含む有する抗 CD20 抗体の発現ベクターを作製した。また、多発性硬化症治療剤の抗 very late antigen-4 (VLA4) 抗体であるナタリズマブ (米国特許第 5,840,299 号に記載) の変異体の発現ベクターを作製した。発現ベクター N5KG (Biogen) を用いた。抗体の構築、発現および精製の項目で示した同様な方法で抗体の発現および精製を行った。κ軽鎖およびλ軽鎖の両方を含む抗体を定量するために、軽鎖およびλ軽鎖の両方を含む抗 CD20 抗体を作製した。κ軽鎖を有する抗 CD20 抗体およびλ軽鎖を含む抗 CD20 抗体の発現ベクターをそれぞれ CHO-S 細胞 (Invitrogen) に同時にトランスフェクションを行い、培養上清からプロテイン A 結合セファロースレジン (GE Healthcare) を用いて抗体を精製した。さらに、強カチオン交換カラム (GE Healthcare) を用いてλ軽鎖を有する抗 CD20 抗体を精製した。

### ***In vitro* における Fab-Arm Exchange**

κ軽鎖およびλ軽鎖の両方を含む抗体を酵素結合免疫吸着法（Enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA）により測定した。1:1のモル比でκ軽鎖を含む抗 CD20 IgG1、IgG4、IgG4E\_K370E、IgG4E\_R409K、IgG4PE、IgG4PE\_K370E または IgG4PE\_R409K とλ軽鎖を含む抗 CD20 IgG4 を混合し、1 mM 還元型グルタチオンと共に 37°C で 12 時間インキュベートした。各抗体の最終濃度は 50 μg/mL とした。インキュベート後の抗体を氷で冷やした D-PBS で希釈した。ELISA プレートに炭酸塩 - 重炭酸緩衝液（Sigma-Aldrich）で希釈したヤギ抗ヒトκ抗体（Southern Biotec）を添加し、コーティングした。スーパーブロック（Thermo Fisher Scientific）でブロッキングした後、10% ブロックエースに希釈した抗体を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。0.05% Tween20 を含む PBS（洗浄バッファー）で洗浄した後、洗浄バッファーで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ F(ab')<sub>2</sub> 抗ヒトλ抗体（Southern Biotec）および基質として TMB +（Dako）を用いてκ軽鎖およびλ軽鎖の両方を含む抗体を検出した。0.5 mol/L の硫酸（富士フイルム和光純薬株式会社）で反応を停止させ、ARVO プレートリーダー（Perkin Elmer）で 450 nm およびリファレンス波長 570 nm の吸光度を測定した。

### ***In vivo* における Fab-Arm Exchange**

全ての動物実験は、協和発酵キリン株式会社の動物実験センター使用承認委員会の承認を受けたプロトコールに従って実施した。6 週齢の雌性 Balb / c ノードマウス（CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN）を用いた。マウスを 19~25°C および 30~70% の湿度で 12 時間の明暗サイクル下に保ち、実験前に水および餌に自由にアクセスさせた。κ鎖を含む抗 VLA4 IgG1、IgG4、IgG4PE または IgG4PE\_R409K およびラムダ軽鎖を含む抗 CD20 IgG4 をマウス 1 匹あたりそれぞれ 100 μg 静脈内投与し、抗体の投与の 10 日後に血液サンプルを収集し、抗体の検出に使用した。*In vitro*



における Fab-Arm Exchange の項目で示した同様な方法で、 $\kappa$ 軽鎖および $\lambda$ 鎖の両方を含む抗体を ELISA にて検出を行った。また、すべてのヒト抗体の測定には、サンドイッチ ELISA によりポリクローナルウサギ抗ヒト IgG (Dako) およびポリクローナルウサギ抗ヒト IgG/HRP (Dako) を用いて行った。

### 細胞表面の抗原に対する抗体結合性

細胞表面の抗原結合性は、フローサイトメトリー法によって行った。Raji 細胞 ( $5 \times 10^5$  細胞) を抗 CD20 抗体または抗 DNP (dinitrophenol) ヒト IgG4 対照抗体 (DNP\_IgG4) と 4°C で 50 分間インキュベートした。洗浄後、ヤギ抗ヒト IgG(H+L)-Alexa fluor 488 (Invitrogen) を用いて FACS canto II (Beckman coulter) により細胞表面に結合した抗 CD20 抗体を検出した。

### ヒスチジンタグ付加組換え可溶性ヒト Fc 受容体タンパク質の調製

shFcγRI、shFcγRIIa-131H、shFcγRIIb、shFcγRIIIa-158V、shFcγRIIIa-158F、shFcγRIIIb および neonatal Fc receptor (FcRn) は、発現ベクターを発現細胞で発現し、Ni-NTA レジンを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、それらの純度および分子量を SDS-PAGE により確認した [Niwa *et al.*, 2005]。

### 可溶性 FcγR に対する抗体結合性

可溶性 FcγR に対する抗体の結合活性を、ELISA によって測定した。ELISA プレートを炭酸 - 重炭酸塩緩衝液 (Sigma-Aldrich) に溶解した 5 μg/mL の抗ヒスチジン抗体 (Qiagen) でコーティングした。スーパーブロック (Thermo Fisher Scientific) でプレートをブロッキングした後、可溶性 FcγR を添加し、4°C で一晩インキュベートした。0.05% Tween20 を含有する PBS (洗浄緩衝液) で洗浄した後、10% ブロックエースで希釈した抗体添加し、室温で 2 時間インキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄

した後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト $\kappa$ 抗体 (Southern Biotech) および基質として TMB+ (Dako) を用いて結合した抗体を検出した。0.5 mol/l の硫酸 (富士フィルム和光純薬株式会社) で反応を停止させ、ARVO プレートリーダー (Perkin Elmer) で 450 nm およびリファレンス波長 570 nm の吸光度を測定した。

### 表面プラズモン共鳴法による抗体の FcRn 結合性

表面プラズモン共鳴法での抗体の FcRn 結合性評価は、Biacore T100 (GE Healthcare) を用いて行った。アミンカップリングキット (GE Healthcare) を用いて、入手元が提供する方法に従って抗ヒスチジン抗体 (Qiagen) を CM5 sensor chip (GE ヘルスケア) に固相化した。リガンドとしてヒスチジンタグ付加組換え可溶性ヒト FcRn を CM5 sensor chip に捕捉し、アナライトとして 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 2 倍希釈し、1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  までの各種抗体 (IgG1、IgG4、IgG4PE、IgG4PE\_R409K) を反応させた。Biacore T100 Evaluation software (GE Healthcare) を用いてセンサーグラムを得た。pH 7.4 条件下では、アナライト、リガンドのバッファーおよびランニング緩衝液は、HBS-EP+ (GE Healthcare) を用いた。また、pH 6.0 条件下では、HBS-EP+ を塩酸で pH 6.0 に調製し、アナライト、リガンドのバッファーおよびランニング緩衝液として用いた。リガンドの再生には、10 mM Glycine-HCl (pH 1.5) (GE ヘルスケア) を用いた。解離定数 (dissociation constant :  $K_D$ ) および最大結合量 ( $R_{\text{max}}$ ) は、Biacore T100 Evaluation software (GE Healthcare) の steady-state analysis によって算出した。

### CDC アッセイ

CDC アッセイは以前の報告に従って実施した [Natsume *et al.*, 2008]。RPMI-1640 培地に懸濁した標的細胞を 96 ウェルの平底プレートに播種し、様々な濃度の抗 CD20 抗体およびヒト血清 (Sigma-Aldrich) とともに 37°C で 2 時間インキュベートした。最終的な細胞数は  $5 \times 10^4$  とした。インキュベーション後、細胞増殖測定試薬 cellTiter-

Glo (Promega) を 15  $\mu$ L/ウェルで添加し、プレートをさらに 2 時間インキュベートした後に、ARVO プレートリーダー (Perkin Elmer) にて、450 nm およびリファレンス波長 650 nm の吸光度を測定し、生細胞を検出した。細胞傷害性は、以下の式で算出した。 $\%細胞傷害性 = 100 \times (E-S)/(M-S)$

**E** は実験ウェルの吸光度であり、**S** は抗体非存在下 (細胞を培地および補体でインキュベートしたもの) であり、**M** は標的細胞および抗体の非存在下で培地および補体のウェルの吸光度を示す。

## 2-4 結果

### 低 pH におけるヒト IgG4 の凝集体形成に関与するアミノ酸の同定

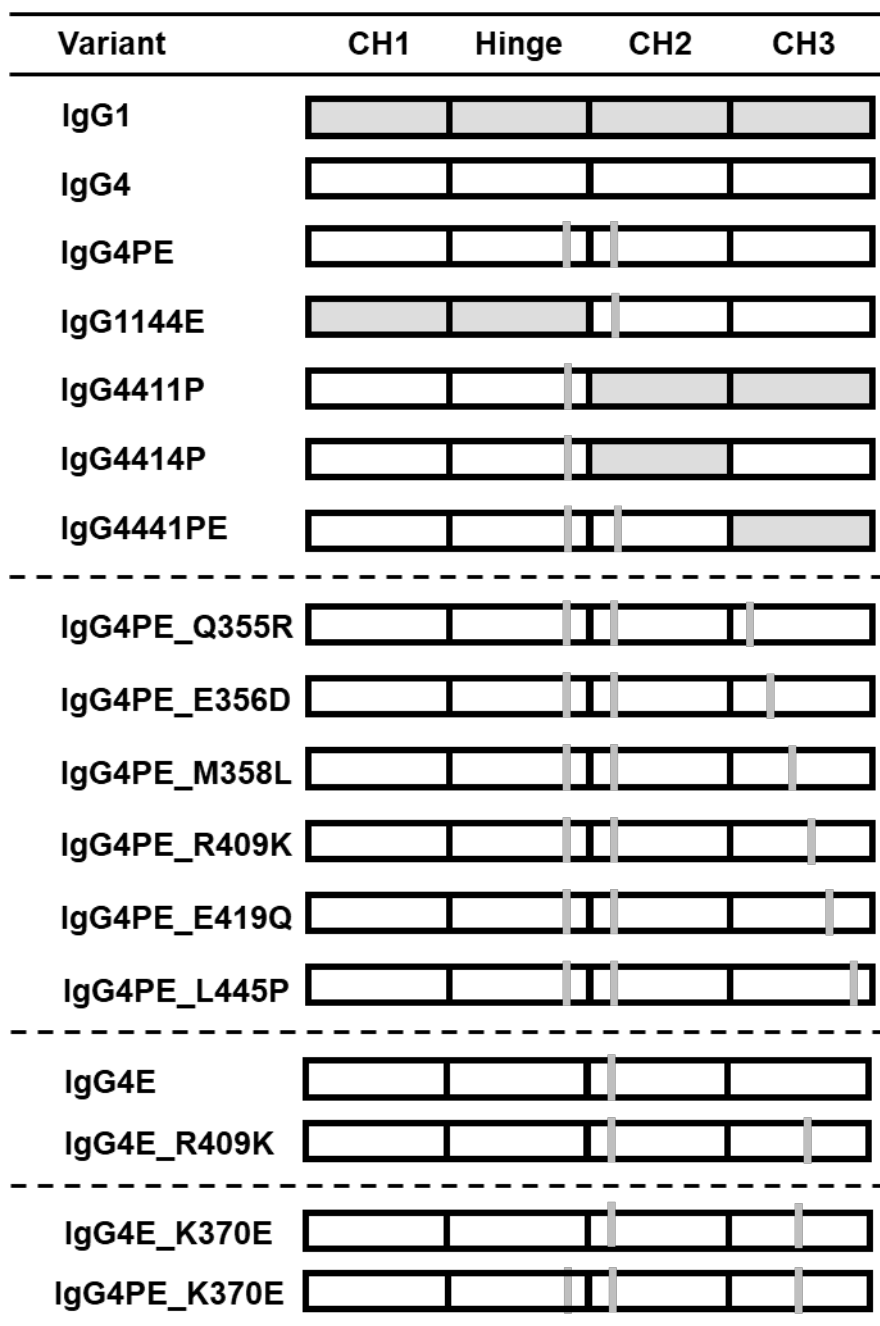
ヒト IgG4 における凝集体形成に関与する定常領域のドメインを同定するために、重鎖定常 (CH) 領域のサブクラス変換を行った (Fig. 2-1)。抗 CD20 抗体のハイブリッド定常領域 IgG1144E、IgG4411P、IgG4414P および IgG4441PE は、ヒト IgG1 および IgG4PE の組合せによって作製した。抗体は、pH 3.4 の条件で、37°C で 10 分間または 60 分間インキュベーションし、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって凝集体の含有量を測定した。すべての抗体において、インキュベーション前の凝集体含有量は 2% 未満であった (Fig. 2-2)。低 pH 条件において、IgG1 は凝集体含有率が低く、高い安定性を示した。対照的に、IgG4 および IgG4PE は凝集体の含有量は 20~30% と高値を示した。この低 pH 誘導性凝集体の含有量は、以前の報告と一致する [Liu *et al.*, 2016]。また、IgG1144E および IgG4414P 変異体は、低 pH 条件下における凝集体形成の抑制効果は認められなかった。注目すべきは、IgG1 の CH3 ドメインを含む IgG4411P および IgG4441PE は、IgG1 と同等な凝集体形成の抑制効果を示した。したがって、IgG4 における凝集体形成は、CH3 ドメインが関与していることが示唆された。

さらに、IgG4 の凝集体形成の原因となっているアミノ酸を同定するために、CH3 ドメインにおける IgG1 と IgG4 でアミノ酸配列を比較し (Fig. 2-3)、その配列中の異なる 6 アミノ酸残基の 355, 356, 358, 409, 419 および 445 番目 (数字は Kabat による EU インデックス) の改変体を構築した (Fig. 2-1)。これらの改変体の中、IgG4PE\_R409K が、低 pH 誘導性の凝集体形成を IgG1 と同等に抑制し、IgG4PE\_Q355R、IgG4PE\_E356D、IgG4PE\_M358L、IgG4PE\_E419Q および IgG4PE\_L445P は凝集体形成を抑制しなかった (Fig. 2-4)。IgG4PE\_R409K において、分解物の産生に影響は確認されなかった (Fig. 2-5)。また、可変領域が異なる抗 VLA4 抗体の IgG4PE\_R409K について検討したところ、凝集体形成の抑制効果が確認され

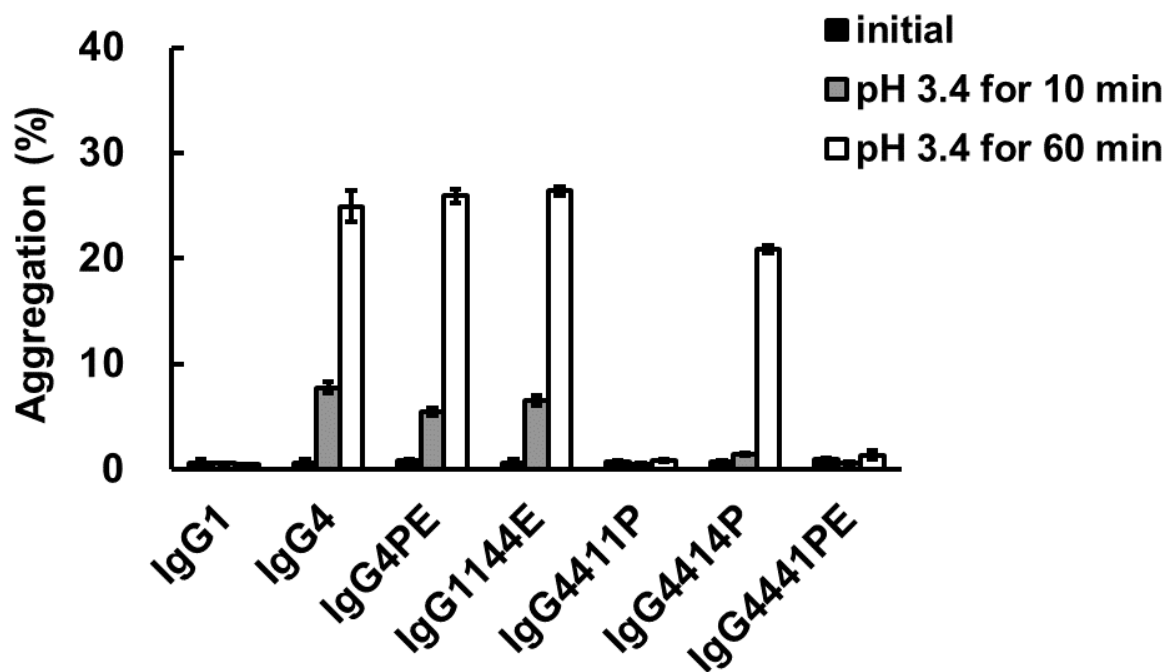
た (Fig. 2-6) 。また、 $\kappa$ 軽鎖ではなく、 $\lambda$ 軽鎖を有する IgG4PE\_R409K について検討したところ、凝集体形成の抑制効果が確認された (Fig. 2-7)

次に、IgG4PE の 409 番目をリジン以外のアミノ酸に置換し、その効果を調べた。その結果、R409K と同等の低 pH 誘導性凝集体形成を妨げるアミノ酸置換を見出せなかった。しかしながら、R409E、R409F、R409L、R409M、R409T、R409W および R409Y の改変体は、37°C で 60 分間、pH 3.4 での低 pH 誘導性凝集体形成を比較的抑制できることが示唆された (Fig. 2-8) 。

さらに、低 pH 誘導性の凝集体形成抑制効果が、S228P 変異を含まない R409K 単独変異のみで認められるかについて検討した。S228P 変異のない IgG4E\_R409K は、凝集体形成抑制効果を示し、S228P の組み合わせの影響は認められなかった。これまでの結果から、IgG4 の凝集体形成には、CH3 ドメインが関与していることが示唆されたため、CH3 の安定化変異として報告がある K370E 変異 [Labrijn *et al.*, 2011] が IgG4 の低 pH 誘導性凝集体形成を抑制するかについて検討した。その結果、IgG4PE\_K370E は、IgG4PE\_R409K 同様に pH 3.4、37°C で 60 分間の条件下で低 pH 誘導性凝集体形成を抑制することが示唆された (Fig. 2-10) 。



**Fig. 2-1** サブクラス、定常領域のドメイン置換およびアミノ酸点変異の抗体の模式図  
 灰色の四角をヒト IgG1、および白色の四角をヒト IgG4 に由来するドメインを表す。  
 灰色の棒は、アミノ酸の置換の位置を示す。すべての抗体は、抗 CD20 抗体の可変  
 領域および  $\kappa$  軽鎖の定常領域を有する。IgG4PE は、228 番目のセリンがプロリンに、  
 235 番目のロイシンがグルタミン酸に置換された改変体を示す。



**Fig. 2-2 ヒト IgG4 の低 pH における凝集体形成の原因となるアミノ酸の同定**

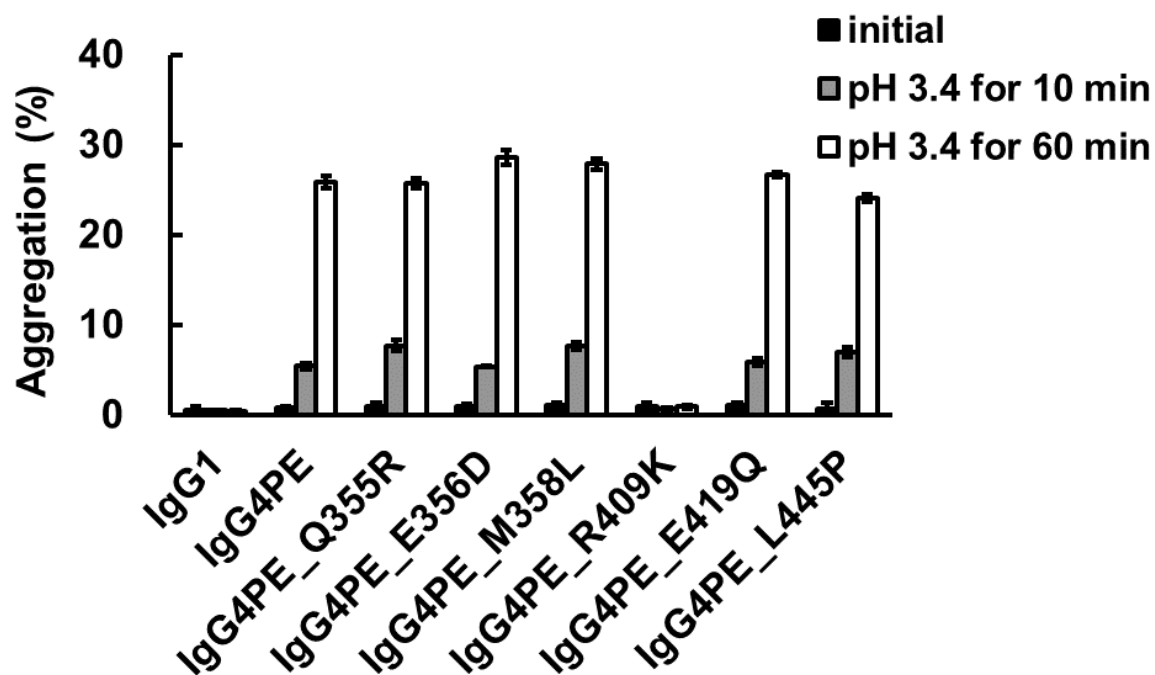
IgG1 と IgG4 の重鎖定常領域のドメイン交換による凝集体形成の原因となるドメインを同定するため、pH 3.4、37°C で 10 または 60 分間における凝集体含有率を SEC 分析により測定した。イニシャルを黒色、37°C pH 3.4、10 分間の条件を灰色、37°C pH 3.4、60 分間の条件を白色で示す。縦軸は凝集体含有量(%)を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。

**Fig. 2-3 ヒト IgG1 および IgG4 の CH3 ドメインのアミノ酸配列比較**

	CH3					
EU index	341	351	361	371	381	391
IgG1	GQPREPQVYT	LPPSR <u>DEL</u> TK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS
IgG4	GQPREPQVYT	LPPSQ <u>EEM</u> TK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS
EU index	401	411	421	431	441	
IgG1	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSV MHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK	
IgG4	DGSFFLYS <u>R</u> L	TVDKSRWQ <u>E</u> G	NVFSCSV MHE	ALHNHYTQKS	LSLS <u>L</u> GK	

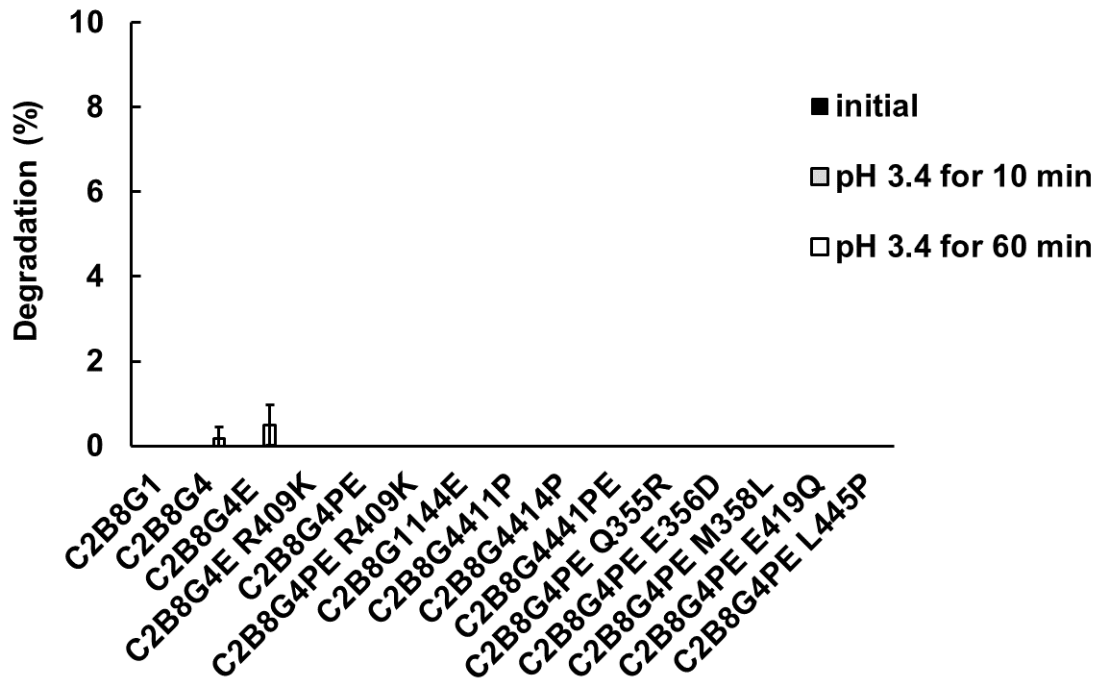
IgG1 および IgG4 の CH3 ドメインのアミノ酸配列は、それぞれ UniProtKB: P01857 (IGHG1\_HUMAN) , UniProtKB: P01861 (IGHG4\_HUMAN)を引用した。





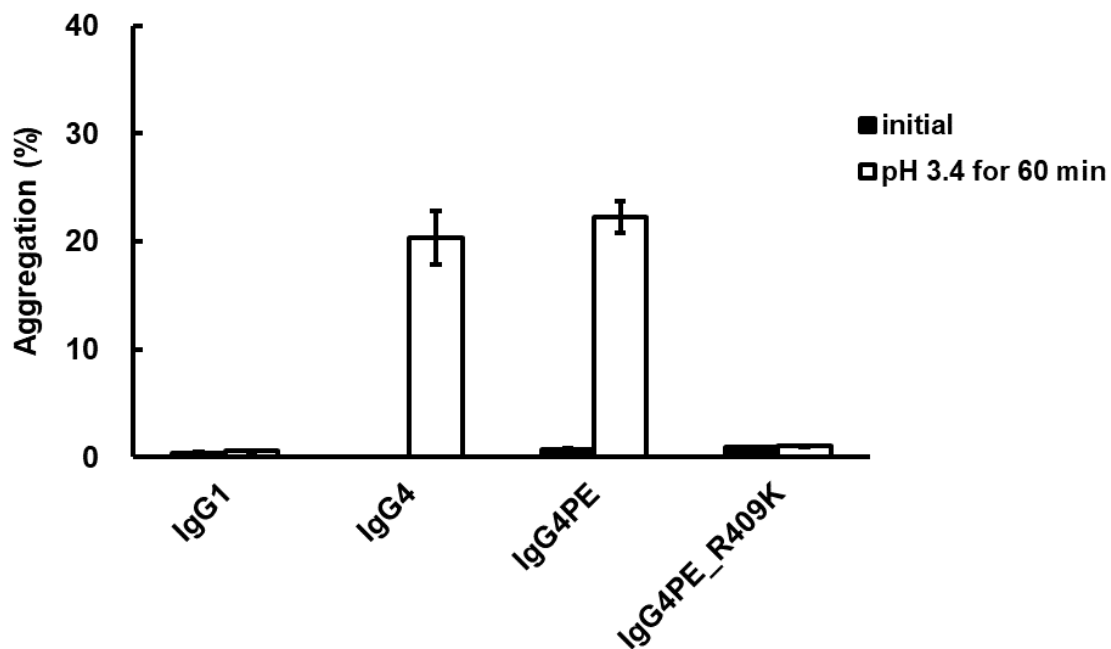
**Fig. 2-4** CH3 ドメインにおける低 pH 誘導性の凝集体形成の原因となるアミノ酸の同定

低 pH における CH3 ドメインの凝集体含有率を SEC 分析により測定した。イニシャルを黒色、37°C pH 3.4、10 分間の条件を灰色、37°C pH 3.4、60 分間の条件を白色で示す。縦軸は凝集体含有量(%)を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。

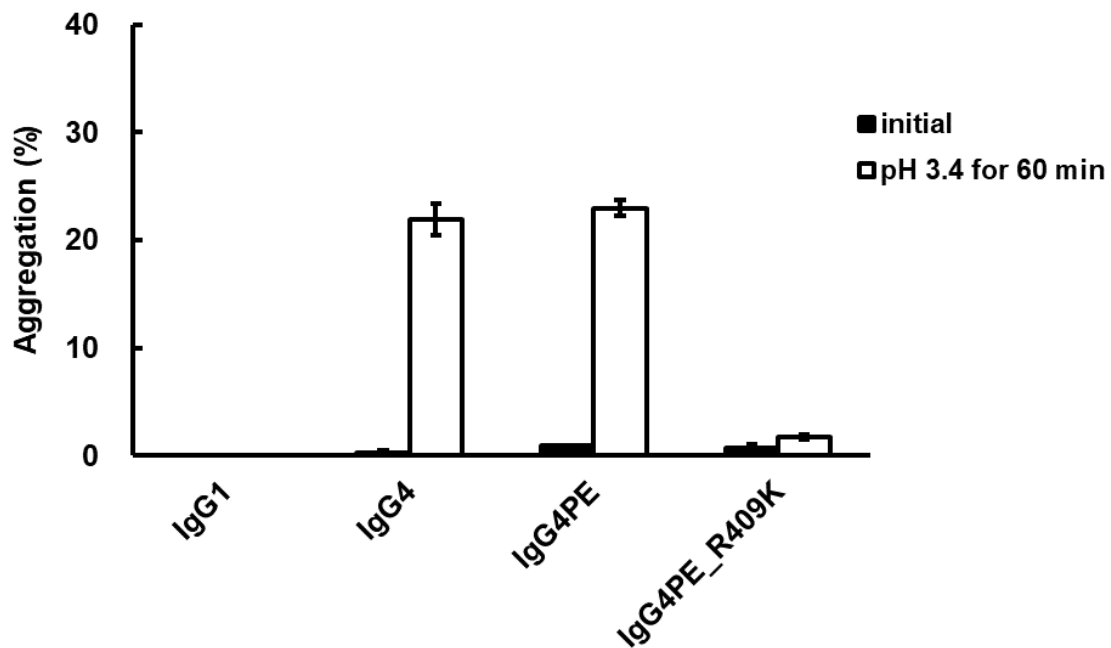


**Fig. 2-5** 低 pH 条件下における分解物産生の影響

低 pH における各変異体の分解物含有率を SEC 分析により測定した。イニシャルを黒色、37°C pH 3.4、10 分間の条件を灰色、37°C pH 3.4、60 分間の条件を白色で示す。縦軸は分化物含有量(%)を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。



**Fig. 2-6 抗 VLA4 抗体における R409K の低 pH 誘導性の凝集体形成におよぼす影響**  
 抗 VLA4 抗体における R409K の低 pH 誘導性凝集体形成を SEC により分析した。イニシャルのデータは黒色で示し、pH 3.4、37°C で 60 分間の条件を白色で示す。縦軸は凝集体含有量(%)を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。



**Fig. 2-7** λ軽鎖を含む抗 CD20 抗体における R409K 変異の低 pH 誘導性の凝集体形成におよぼす影響

λ軽鎖を有する IgG 変異体の低 pH 誘導性の凝集体を SEC により分析した。イニシャルのデータは黒色で示し、pH 3.4、37°C、60 分間の条件を白色で示す。縦軸は凝集体含有量(%)を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。

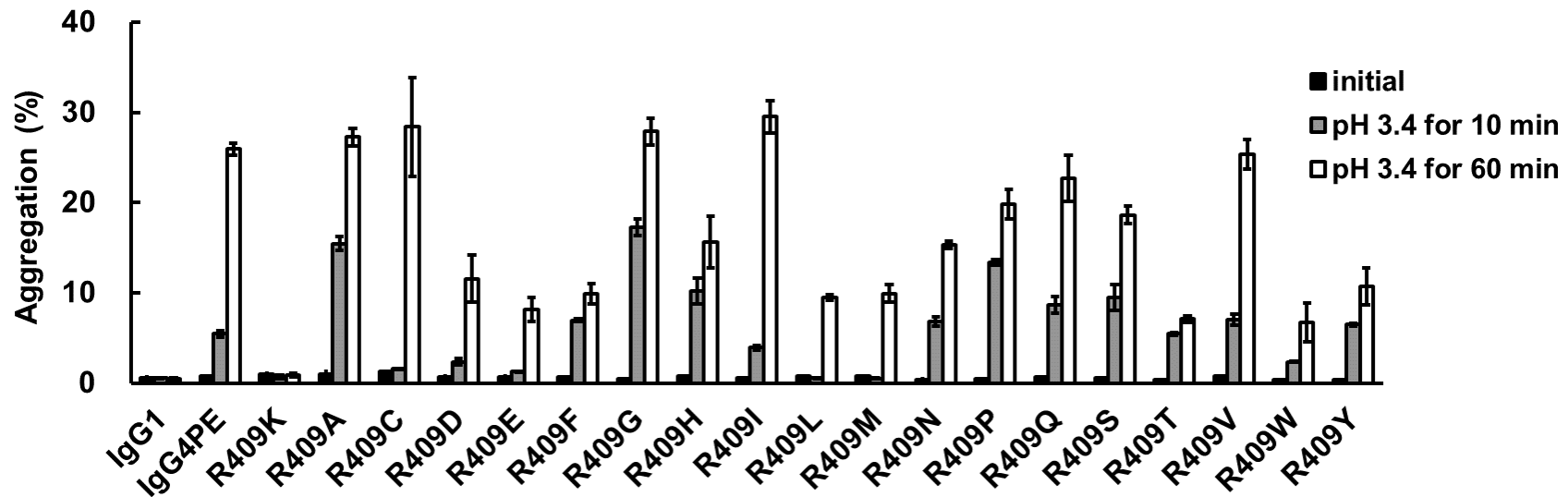
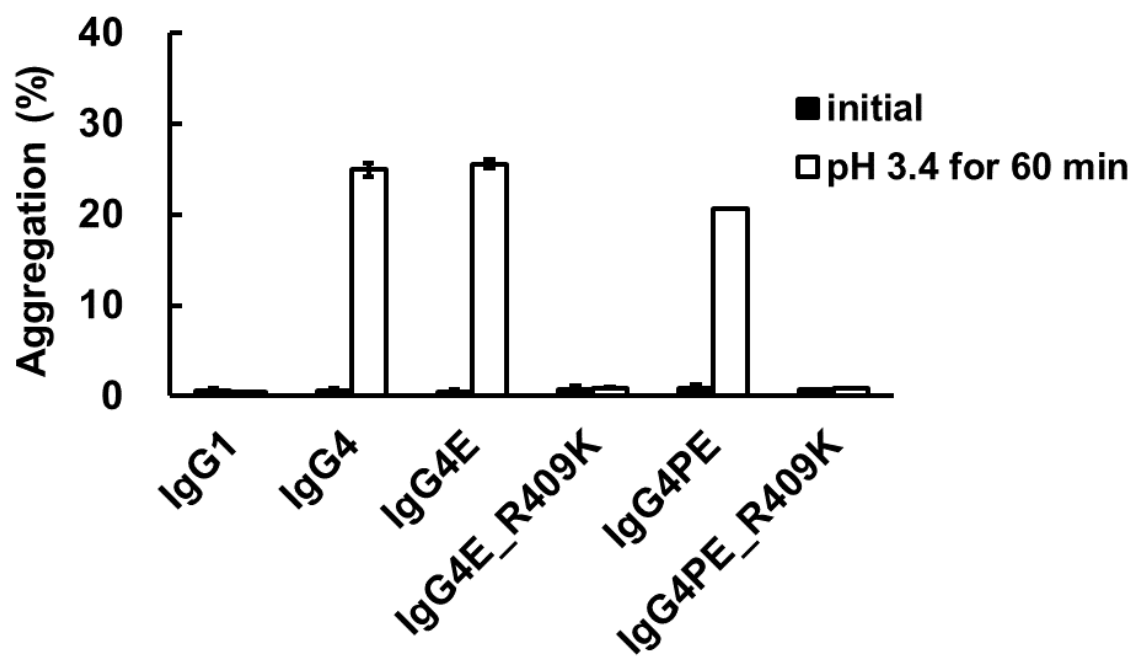


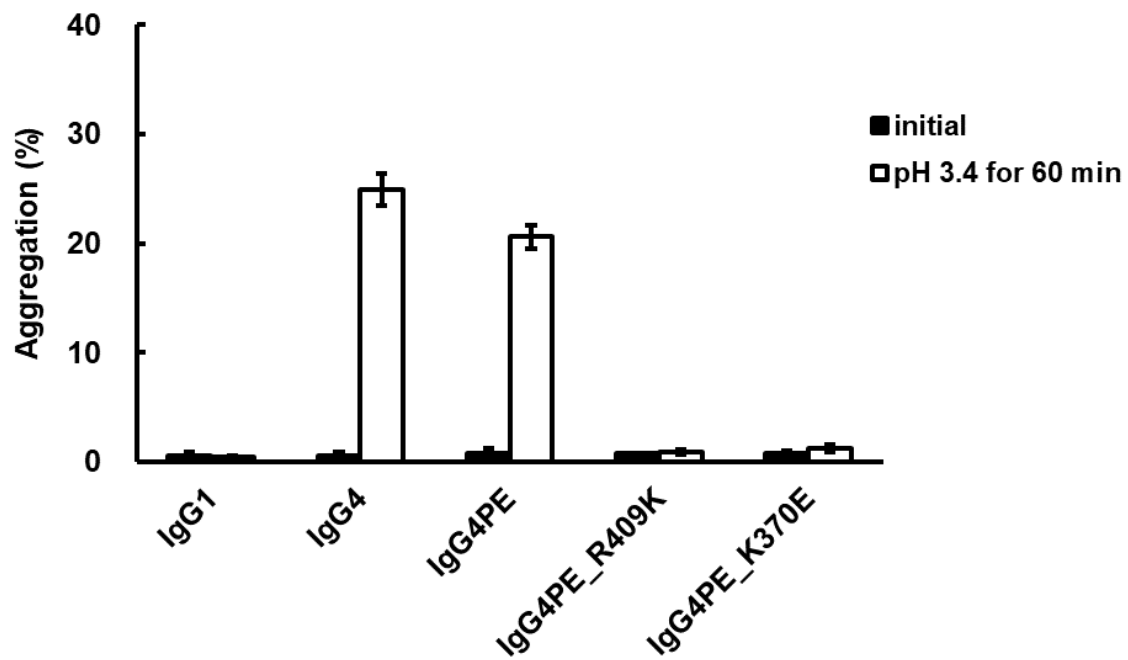
Fig. 2-8 低 pH 誘導性の凝集体形成におよぼす 409 番目のアミノ酸置換の影響

SEC 分析による凝集体含有率の測定。イニシャルを黒色、37°C pH 3.4、10 分間を灰色、37°C pH 3.4、60 分間の条件を白色で示す。縦軸は凝集体含有量(%)を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。



**Fig. 2-9** 低 pH 誘導性の凝集体形成におよぼす S228P の点変異の影響

S228P 点変異による低 pH 誘導性凝集体含有率を SEC 分析により測定した。縦軸は凝集体含有量(%)を示す。イニシャルを黒色、37°C pH3.4、60 分間の条件を白色で示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。



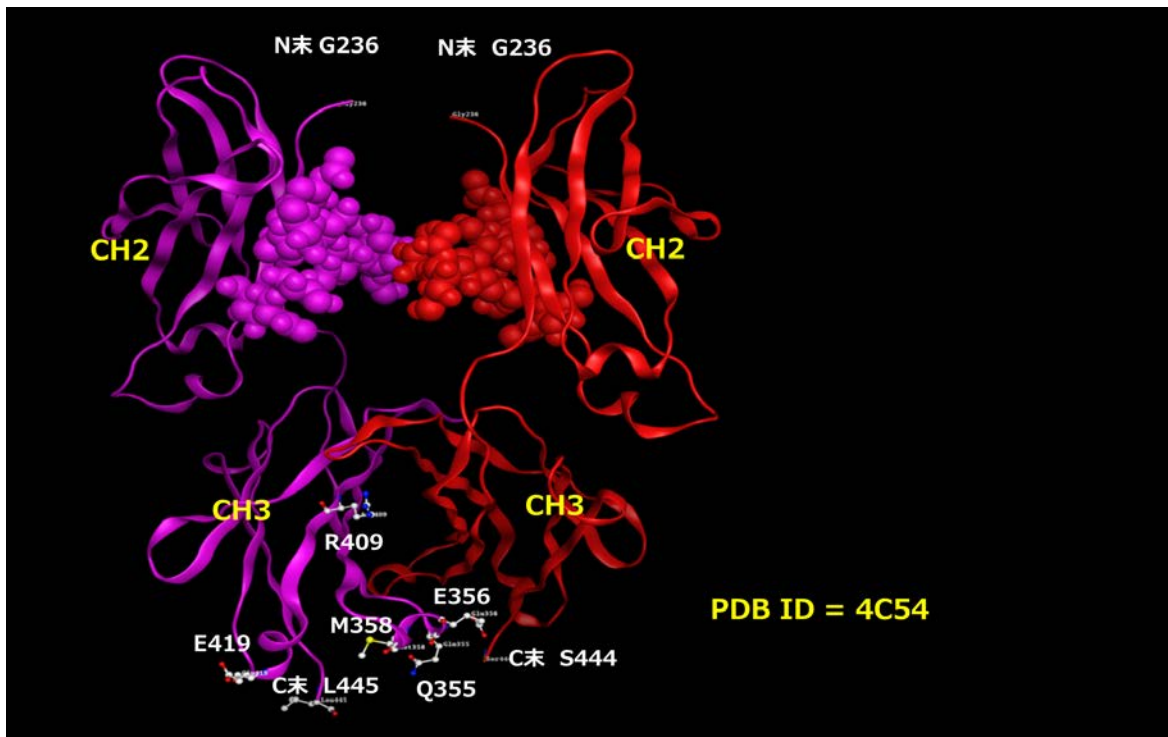
**Fig. 2-10** 低 pH 誘導性の凝集体形成におよぼす K370E の変異の影響

K370E の変異による低 pH 誘導性凝集体含有率を SEC 分析により測定した。縦軸は凝集体含有量(%)を示す。イニシャルを黒色、37°C pH 3.4、60 分間の条件を白色で示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。

## モデル構造の解析

CH3 ドメインにおける、IgG1 と IgG4 で異なる 6 つのアミノ酸の箇所 (355, 356, 358, 409, 419, 445 番目) について、IgG4 の Fc の構造 (PDB ID = 4C54) を用いて構造的な分析を行った。CH3-CH3 の相互作用面の位置にあるのは、409 番目のアルギニンのみであることが示された (Fig. 2-11)。また、6 つのアミノ酸が CH3-CH3 の相互作用面にあるかどうか定量的にそれぞれの側鎖の溶媒露出割合を算出したところ、355 番目のグルタミンで 94%、356 番目のグルタミン酸で 75%、358 番目のメチオニンで 12%、409 番目のアルギニンで 6%、419 番目のグルタミン酸で 73%、445 番目のロイシンで 100% であり、409 番目のアルギニンが露出割合が最も低いことが明らかとなった (Table 2-1)。一方で、358 番目のメチオニンは、溶媒露出割合が比較的低いものの、構造の位置関係から CH3-CH3 の相互作用面ではなく、側鎖が分子の内側に位置していることが示された。また、CH3-CH3 の相互作用面の近傍にある 356 番目周辺のアミノ酸と 409 番目周辺のアミノ酸の露出割合から定量的に相互作用面であるか解析した (Table 2-2)。409 番目周辺の 407 から 411 番目のアミノ酸の露出割合は 0~11% であり、相互作用面に位置することが示唆された。また、356 番目の周辺の 354 から 357 番目のアミノ酸露出割合は、354 および 357 番目は 0% であり、355 および 356 番目は 75% 以上ということから、356 番目は相互作用面の端に位置していることが示唆された。





**Fig. 2-12** モデル抗体における解析

IgG4Fc の CH3 における 355、356、358、409、419 および 445 番目の位置。ヒト IgG4 (PDB ID=4C54) をモデル抗体として解析した。炭素原子、窒素原子、酸素原子をそれぞれ白丸、青丸、赤丸で示す。

**Table 2-1. IgG4 の CH3 におけるアミノ酸の露出割合の分析**

EU index	Amino acid	側鎖の溶媒露出割合 (%)
355	Q	94
356	E	75
358	M	12
409	R	6
419	E	73
445	L	100

側鎖の露出面積は MOE ASA\_Calculator プログラムにより算出した

**Table 2-2. 356 および 409 番目の周辺のアミノ酸の露出割合の分析**

EU index	Amino acid	側鎖の溶媒露出割合 (%)
354	S	0
355	Q	94
356	E	75
357	E	0
407	Y	0
408	S	0
409	R	6
410	L	0
411	T	11

残基露出面積は MOE ASA\_Calculator プログラムにより算出した

## 熱力学的安定性

### DSF

抗体の低 pH 誘導性の凝集体形成が熱力学的安定性に影響を及ぼすかどうか、示差走査型蛍光測定 (DSF) を用いて各 IgG 変異体を分析した。DSF は、タンパク質の熱変性に伴う疎水面の露出に感受性の高い色素が結合し、蛍光強度を測定することでタンパク質の変性を経時的に観察することができる。全ての抗体において、2つの熱変性中点 (melting transition; Tm) 値を示し、それぞれ Tm1 および Tm2 として Table2-2 および Table2-3 にまとめた。IgG1、IgG4、IgG4PE およびドメイン改変体を用いて測定を行った (Table2-3)。IgG1 の Tm1 および Tm2 はそれぞれ 69°C、75.5°C に対して、IgG4 および IgG4PE の Tm1 および Tm2 はそれぞれ 64°C、63.5°C および 73.5°C、74°C であり、IgG1 は IgG4 と比較して、Tm1 および Tm2 は高い傾向を示した。IgG1 と IgG4 のドメイン交換改変体において、Tm1 は、IgG1144E、IgG4441PE で共に 63.5°C であることに対して、IgG4411P、IgG4414P でそれぞれ 68°C、68.75°C と高値を示した。CH2 が IgG1 であるドメイン改変体において、Tm1 が IgG4 と比較して高値を示すことが示唆された。この結果は、これまでの報告では、DSF の Tm1 と CH2 の熱安定性は相関関係にあるという報告と一致する [Goldberg *et al.*, 2011; Ito and Tsumoto, 2013]。また、IgG1 と IgG4 のドメイン交換改変体において、Tm2 は、IgG4411P、IgG4441PE で共に 74.5°C であることに対して、IgG4414P で 74°C と低値を示した。CH3 が IgG1 であるドメイン改変体において、Tm2 が IgG4 と比較して高値を示す傾向にはあるものの、CH3 が IgG4 である IgG1144E においても Tm2 は 74.5°C で IgG4 よりも高値であるため、明確な相関があるとは言えず、さらなる検討が必要である。次に、CH3 において IgG1 と IgG4 で異なるアミノ酸を IgG4 に置換した改変体を用いて測定を行った (Table2-4)。Tm1 は、IgG4PE、IgG4PE\_Q355R、IgG4PE\_E356D、IgG4PE\_M358L、IgG4PE\_R409K、IgG4PE\_E419Q、IgG4PE\_L445P の全てにおいて、63.5°C であった。また、Tm2 は、IgG4 改変体において、IgG4PE\_R409K が、74.5°C で

あるのに対して、その他の改変体は74℃であり、高値を示した。R409Kの改変により、熱安定性が向上することが示唆されたものの、変化量が大きくないため、さらなる解析が必要である。

**Table 2-3. DSF による IgG ドメイン交換改変体の Tm 値の分析**

Sample	Tm(°C)	
	Tm1	Tm2
IgG1	69 (69)	75.5 (75.5)
IgG4	64 (64)	73.5 (73.5)
IgG4PE	63.5 (63.5)	74 (74)
IgG1144E	63.5 (63.5)	74.5 (74.5)
IgG4411P	68 (68)	74.5 (74.5)
IgG4414P	69 (68.5)	74 (74)
IgG4441PE	63.5 (63.5)	74.5 (74.5)

2 回の測定の平均値を示す。

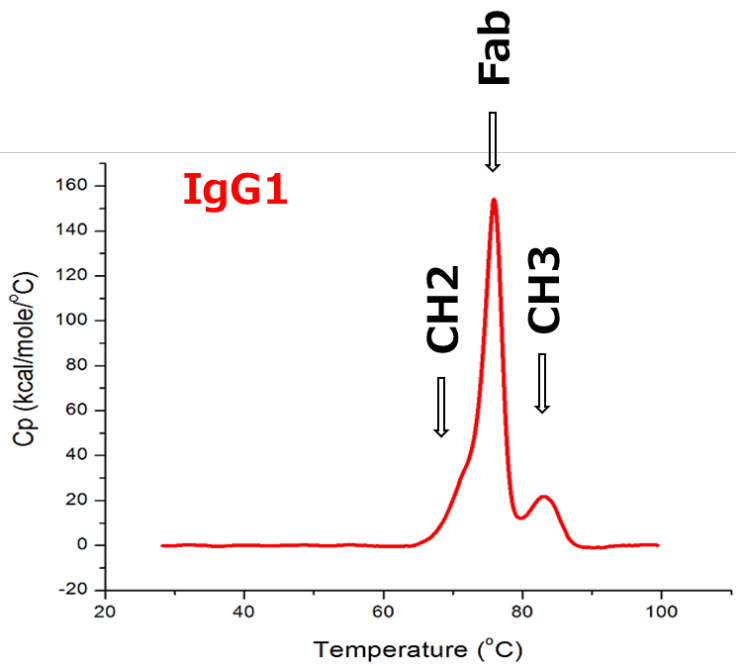
**Table 2-4. DSF による CH3 の点変異 IgG4 改変体の Tm 値の分析**

Sample	Tm(°C)	
	Tm1	Tm2
IgG1	69 (69)	75.5 (75.5)
IgG4PE	63.5 (63.5)	74 (74)
IgG4PE_Q355R	63.5 (63.5)	74 (74)
IgG4PE_E356D	63.5 (63.5)	74 (74)
IgG4PE_M358L	63.5 (63.5)	74 (74)
IgG4PE_R409K	63.5 (63.5)	74.5 (74.5)
IgG4PE_E419Q	63.5 (63.5)	74 (74)
IgG4PE_L445P	63.5 (63.5)	74 (74)

2 回の測定値を示す。カッコ内の数値は 2 回目の測定値を示す。

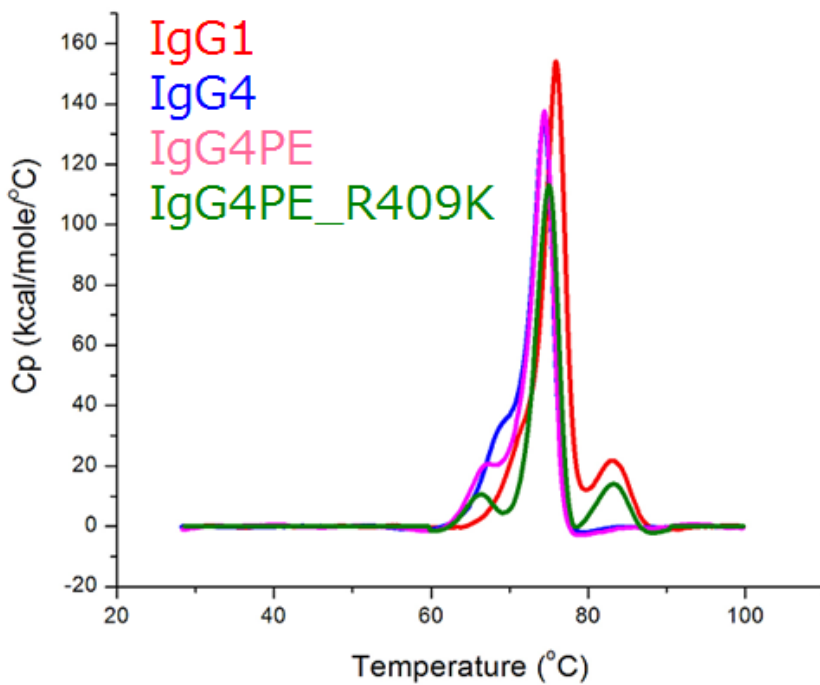
## DSC

IgG4 に R409K を導入することにより熱力学的安定性が変化するかどうか、示差走査熱量測定 (DSC) を用いて IgG 変異体 (IgG1、IgG4、IgG4PE および IgG4PE\_R409K) をさらに詳細に分析した。Fig. 2-13a に得られた IgG1 のセンサーグラムおよび CH2、Fab、CH3 のピークを示す。また、Fig. 2-13b に得られた IgG1、IgG4、IgG4PE および IgG4PE\_R409K のセンサーグラムを示す。Table 2-5 は、熱変性中点 (T<sub>m</sub>) 値を示した。IgG1 の場合、CH2、Fab および CH3 の T<sub>m</sub> 値はそれぞれ約 71.5、76.0 および 83.0°C であった。IgG4、IgG4PE および IgG4PE\_R409K については、CH2 の T<sub>m</sub> 値は IgG1 よりも低い温度にシフトした。IgG4 変異体における Fab の T<sub>m</sub> 値は、IgG1 よりもわずかに低い温度にシフトした。IgG4PE\_R409K の CH3 の T<sub>m</sub> 値は、83.2°C であり、IgG4 および IgG4PE よりも高い温度にシフトしており、IgG1 と同等な T<sub>m</sub> 値であることが判明した。



**Fig. 2-13a DSC による熱力学的安定性の解析**

IgG1 の DSC のチャートおよび CH2, Fab, CH3 のピークを示す。



**Fig. 2-13b DSC による熱力学的安定性の解析**

IgG1, IgG4, IgG4PE および IgG4PE\_R409K の DSC のチャートを示す。

**Table 2-5. DSC による IgG 変異体の Tm 値の分析**

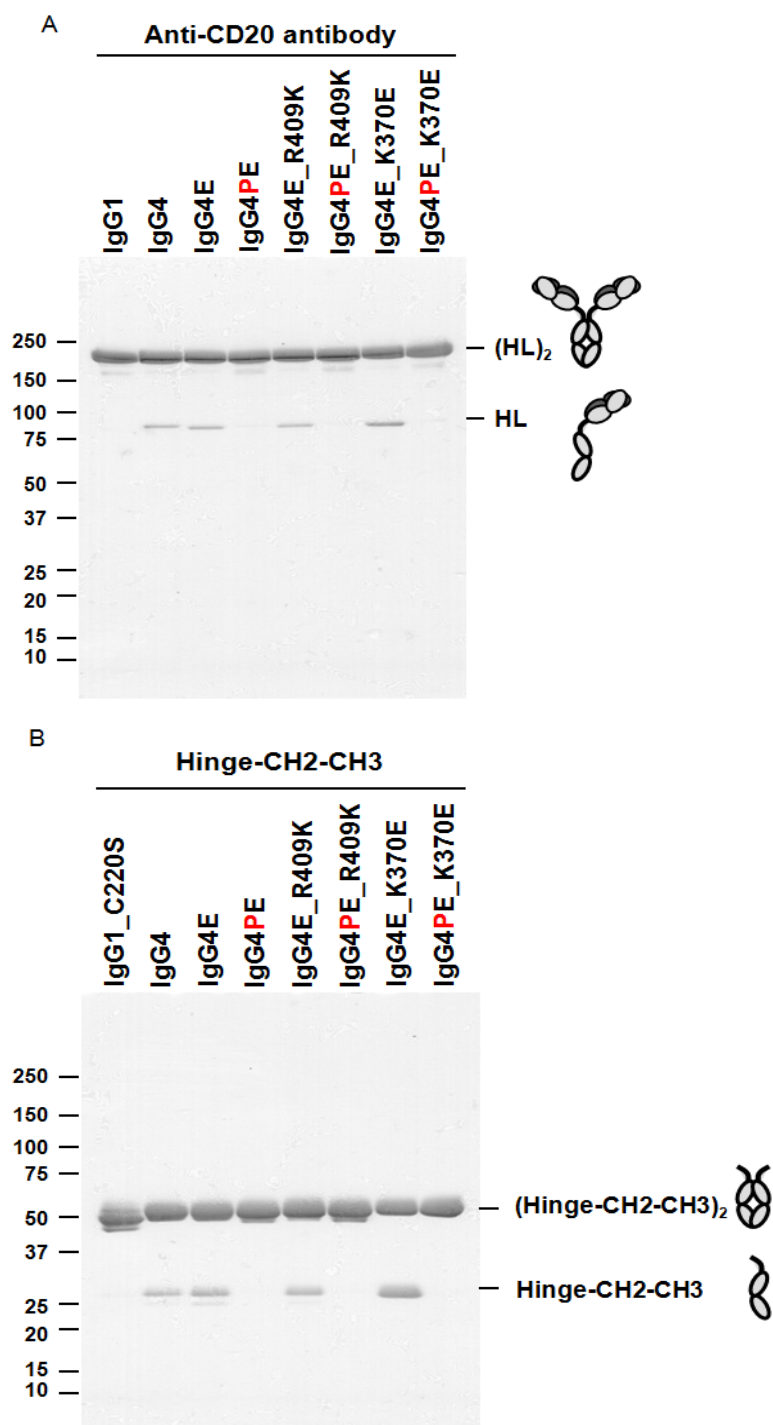
Sample	domain	Tm (°C)		
		CH2	Fab	CH3
IgG1		71.5	76.0	83.0
IgG4		69.8	74.3	N.D.
IgG4PE		67.2	74.4	N.D.
IgG4PE R409K		66.4	75.0	83.2

N.D.: not detected. Fab のピークと重なっており検出されなかった。



## ハーフ抗体の解析

非還元条件下における SDS-PAGE 分析において、野生型 IgG4 はインタクトな抗体に加え、一部ハーフ抗体を含むことが判明した。また、ハーフ抗体の産生は、L235E の点変異の有無に関わらず生じた (Fig. 2-14A; IgG4E)。さらに、IgG4 L235E に S228P 変異を導入することにより、ハーフ抗体の産生の抑制効果が認められた (Fig. 2-14A; IgG4PE)。一方で、IgG4 L235E に、R409K 変異または K370E 変異を導入してもハーフ抗体の産生の抑制効果は認められなかった (Fig. 2-14A; IgG4PE\_R409K, IgG4E\_K370E)。ハーフ抗体の形成に可変領域が影響しているかについて検討するため、軽鎖および可変領域 CH1 を除いた Hinge-CH2-CH3 タンパク質を用いて各アミノ酸置換の効果を評価した (Fig. 2-14B)。IgG の場合と同様に、L235E または R409K 置換を有する Hinge-CH2-CH3 はハーフ抗体の形成抑制効果は認められず、さらなる S228P を導入することによって、ハーフ抗体の形成は抑制された (Fig. 2-14B)。また、ハーフ抗体の定量化は、バイオアナライザを用いることができ [Vasilyeva E *et al.*, 2004]、抗体のハーフ抗体の定量化を行った。IgG1 のハーフ抗体は 0.18% であったが、野生型 IgG4 および IgG4 L235E はそれぞれ 4.27%、5.56% と顕著であった (Table.2-6; IgG1, IgG4, IgG4E)。S228P のヒンジ安定化のための変異である S228P を有する IgG4 改変体 IgG4PE、IgG4PE\_R409K または、IgG4PE\_K370E は、それぞれ、0.42%、0.55%、0.47% であり、ハーフ抗体の産生を抑制した (Table.2-6; IgG4PE、IgG4PE\_R409K、IgG4PE\_K370E)。また、SDS-PAGE 分析の結果同様、IgG4 L235E に、R409K 変異または K370E 変異を導入した IgG4E\_R409K および IgG4E\_K370E はそれぞれ 4.31%、12.99% であり、ハーフ抗体の産生抑制効果は認められなかった (Table.2-6; IgG4E\_R409K、IgG4E\_K370E)。



**Fig. 2-14** ハーフ抗体の解析

(A) IgG の SDS-PAGE 分析。(B) Hinge-CH2-CH3 変異体の SDS-PAGE 分析。

非還元条件下で 5  $\mu$ g の各タンパク質を 5~20% の勾配の SDS-PAGE に供した。

**Table 2-5. IgG 変異体のハーフ抗体の定量化**

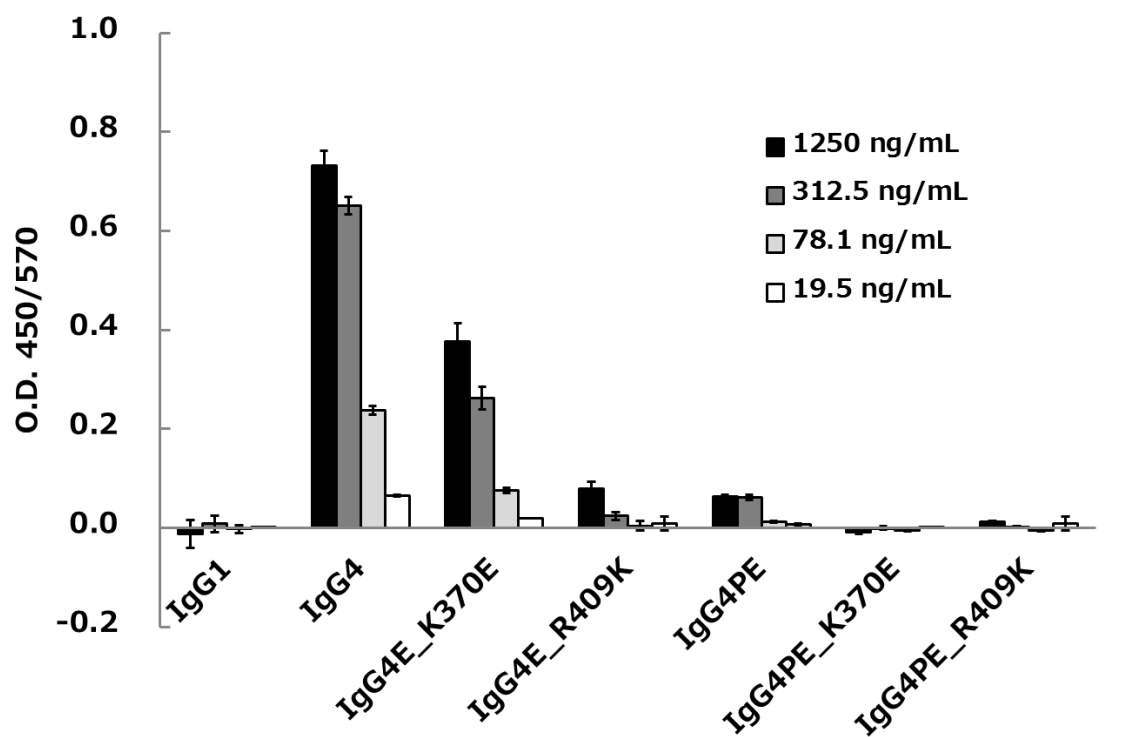
<b>Sample</b>	<b>Half-molecule (%)</b>
IgG1	0.18
IgG4	4.27
IgG4E	5.56
IgG4PE	0.55
IgG4E_R409K	4.31
IgG4PE_R409K	0.42
IgG4E_K370E	12.99
IgG4PE_K370E	0.47

バイオアナライザを用いて、定量した抗体のハーフ抗体の含量(%)の結果を示す。

### ***In vitro* および *in vivo* における Fab-Arm Exchange の評価**

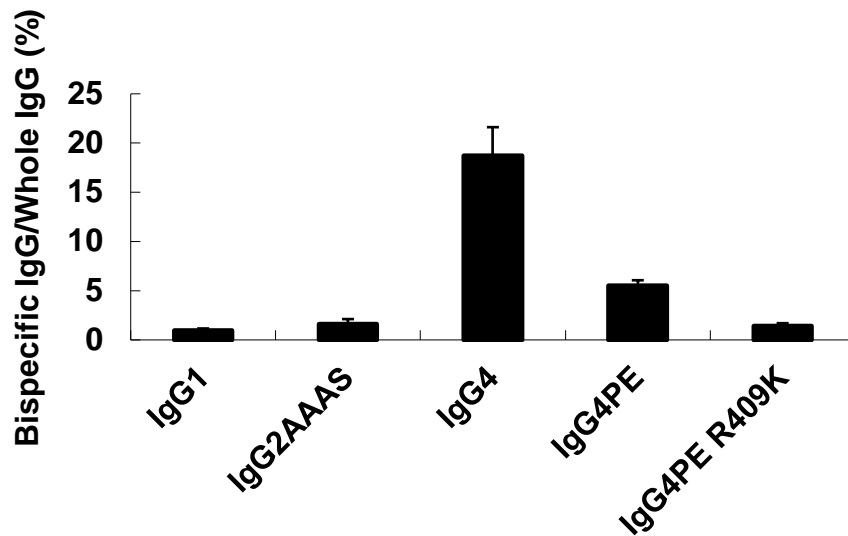
IgG4 の安定化体が Fab-Arm Exchange におよぼす影響について検討した。*In vitro* において、IgG4 は $\kappa$ 軽鎖および $\lambda$ 軽鎖を有する抗体が検出され Fab-Arm Exchange が確認されたが、IgG1 は、Fab-Arm Exchange を抑制した (Fig. 2-15)。また、IgG4 のヒンジ安定化 S228P は、Fab-Arm Exchange を抑制した。CH3 安定性の変異による Fab-Arm Exchange におよぼす影響を解析したところ、K370E 改変体は、部分的に Fab-Arm Exchange を抑制したが、R409K では劇的に抑制することが示唆された。さらに、ヒンジ安定化および CH3 安定化の組み合わせによって、IgG4PE K370E または、IgG4PE R409K は劇的に Fab-Arm Exchange を抑制することが示唆された。

ヒンジ安定性および CH3 安定性の組み合わせの効果を *in vivo* において検討した (Fig. 2-16)。*In vitro* の結果と同様に、IgG4 は、 $\kappa$ 軽鎖および $\lambda$ 軽鎖を有する抗体が検出され、Fab-Arm Exchange が確認されたが、IgG1 は Fab-Arm Exchange を抑制した。IgG4PE は劇的に Fab-Arm Exchange を抑制し、IgG4PE R409K は、相加的な抑制効果があることが示唆された。



**Fig. 2-15** *In vitro* における Fab-Arm Exchange におよぼす R409K 変異の影響

Fab-Arm exchange によって生じたκ軽鎖かつλ軽鎖を有する抗体を ELISA によって検出した。κ軽鎖を含む抗 CD20 IgG1、IgG4、IgG4PE、IgG4PE\_K370E または IgG4PE\_R409K およびλ軽鎖を含む抗 CD20 IgG4 の混合物を、1mM 還元グルタチオンとともに 37°C で 12 時間インキュベートした。κ軽鎖かつλ軽鎖を含む抗体を検出した。縦軸は、κ軽鎖かつλ軽鎖を含む抗体の量を表す吸光度を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。



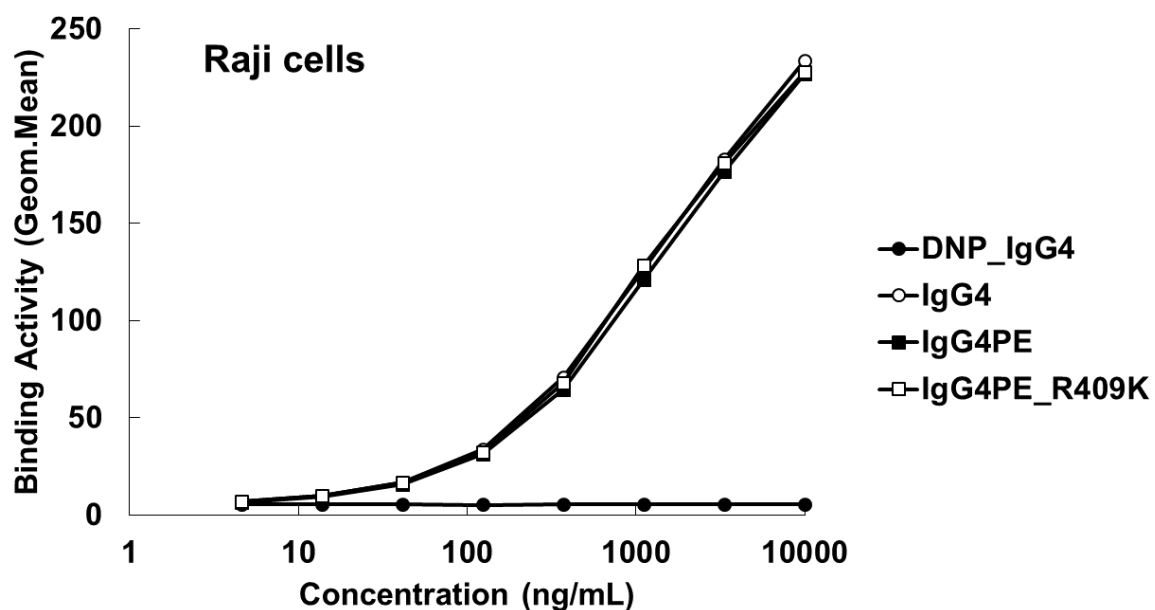
**Fig. 2-16** *in vivo* おける Fab-Arm Exchange におよぼす R409K 変異の影響

ヌードマウス (n=5) に、 $\kappa$ 軽鎖を含む抗 VLA4 IgG1、IgG2AAAS、IgG4、IgG4PE または IgG4PE\_R409K および $\lambda$ 軽鎖を含む抗 CD20 IgG4 の混合物を静脈内注射した。IgG2AAAS は、IgG2 変異体、V234A/G237A/P331S を意味する。血液サンプルを抗体投与の 10 日後に収集し、 $\kappa$ 軽鎖かつ $\lambda$ 軽鎖を含む抗体または全 IgG の検出に使用した。縦軸は、全 IgG における $\kappa$ 軽鎖かつ $\lambda$ 軽鎖を含む抗体の割合(%)を示す。図中のデータおよびエラーバーは、それぞれ平均および標準誤差を表す。

## 抗原、FcγR、FcRn への結合性および CDC 活性

IgG4 の R409K 変異が抗体の生物学的機能に影響を与えるかについて抗原への結合性を解析した。CD20 陽性 Raji 細胞を用いたフローサイトメトリー分析は、IgG4、IgG4PE、IgG4PE\_R409K が同様の CD20 結合活性を示すことを明らかにした (Fig. 2-17)。shFcγRI、shFcγRIIa、shFcγRIIb、shFcγRIIIa-158V、shFcγRIIIa-158F、shFcγRIIIbNA1 および shFcγRIIIbNA2 に対する抗 CD20 IgG 変異体の結合を ELISA によって測定した。以前の報告 [Labrijn *et al.*, 2008] と一致して、野生型 IgG4 は、shFcγRI に対して IgG1 よりも低い結合親和性を示し、IgG4PE については、顕著な親和性の減少が観察された。また IgG4PE はすべての FcγR に対して低い結合親和性を示し、FcγR への結合性は、IgG4PE と IgG4PE\_R409K で大きな差はなく、同等な結合性であることが判明した (Fig. 2-18)。また、R409K 変異が FcRn 結合に影響するかどうかを調べるために、表面プラズモン共鳴法を用いて評価した。測定されたセンサーグラムを Fig. 2-19 に示す。pH 6.0 における IgG4PE および IgG4PE\_R409K のレゾナンスユニット (Resonance Unit ; RU) の最大値を比較すると大きな差は認められなかった。また、定量的な解析を行うため、pH 6.0 における最大結合量および解離定数を算出した。最大結合量は、IgG4PE および IgG4PE\_R409K でそれぞれ、 $141.33 \pm 27.62$  RU、 $140.27 \pm 13.43$  RU で同等であることが判明した (Table2-7)。さらに、解離定数は、IgG4PE および IgG4PE\_R409K でそれぞれ、 $3.03 \pm 0.05 \times 10^{-7}$  M、 $3.11 \pm 0.07 \times 10^{-7}$  M で同等であることが判明した (Table2-7)。

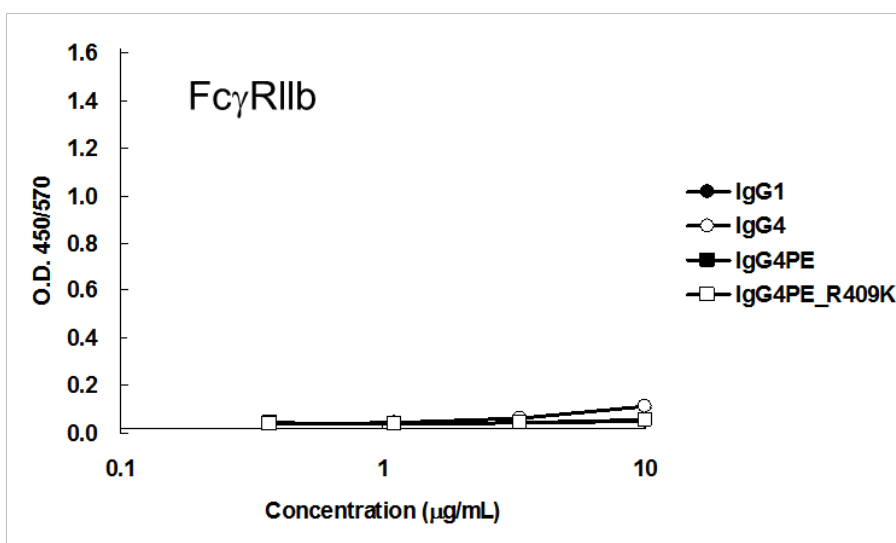
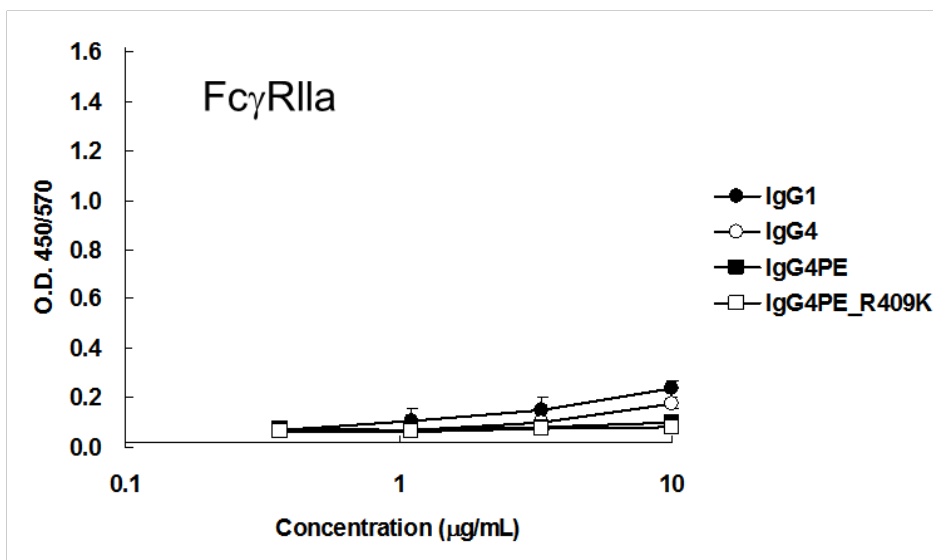
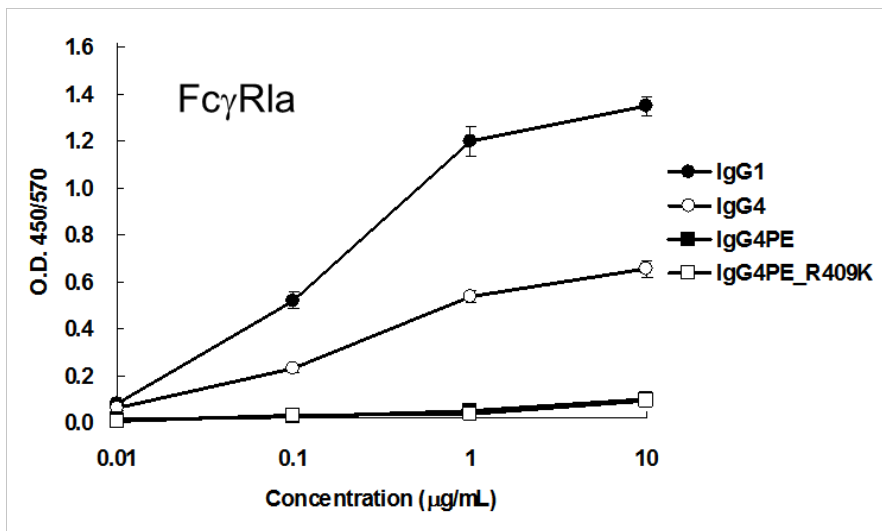
R409K 変異が CDC 活性に影響するかどうかを調べるために、ヒト血清を用いて評価した。IgG4 は、IgG1 と比較すると CDC 活性が低く、これは以前の報告 [Labrijn *et al.*, 2008] と一致していた。IgG4PE\_R409K は、野生型 IgG4 または IgG4PE と同等な低い CDC 活性であることが判明した (Fig. 2-20)。

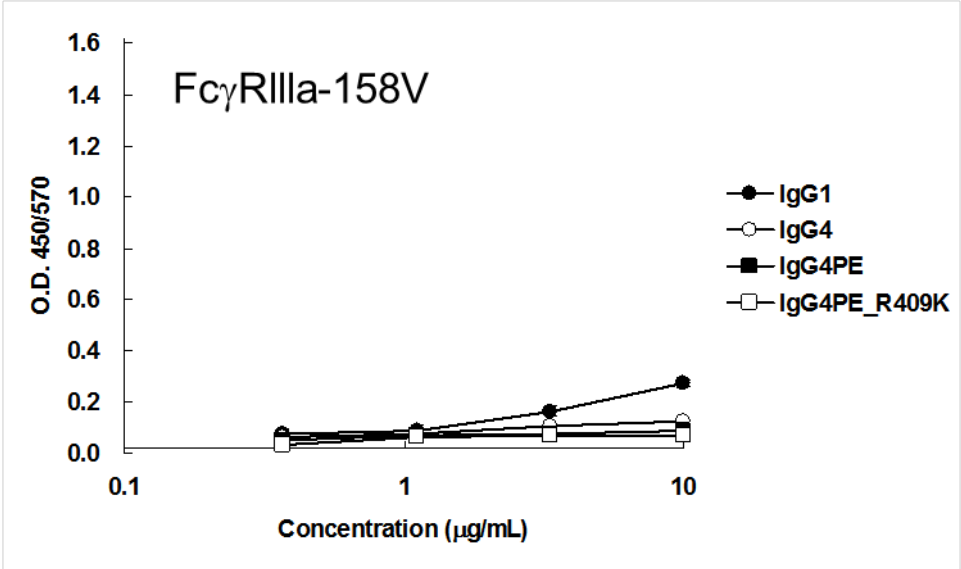
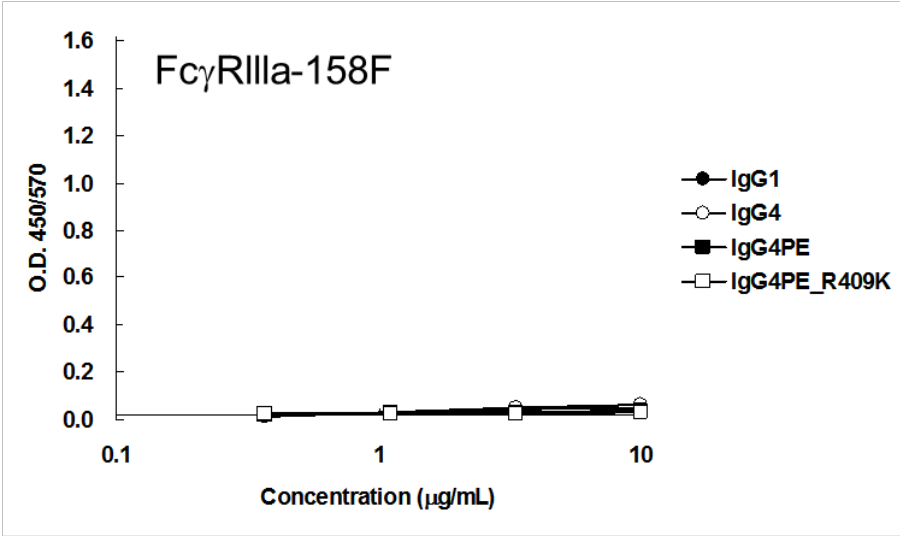


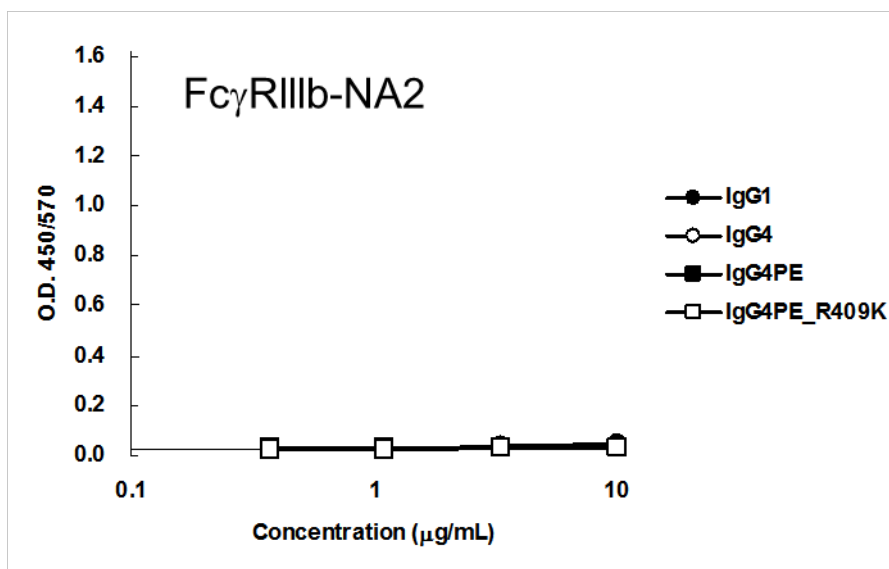
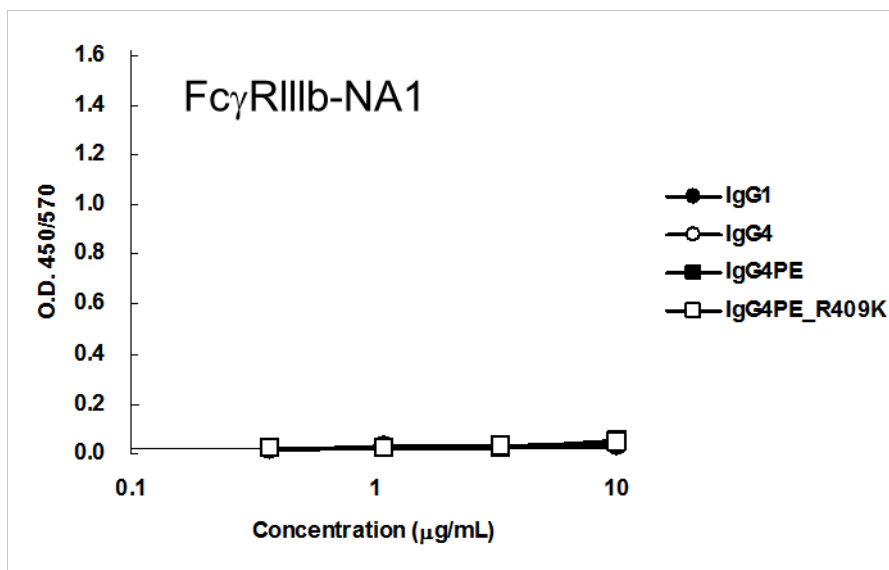
**Fig. 2-17** 抗原への結合性に及ぼす R409K 変異の影響

Raji 細胞に結合性を示す IgG4 変異体をフローサイトメトリーで測定した。細胞は、抗体と反応させ、Alexa fluor 488 標識の二次抗体で検出した。IgG4 を白丸、IgG4PE を黒四角、IgG4PE R409K を白四角またはアイソタイプ対照 IgG を黒丸で示す。縦軸は細胞結合性を表す Geom.Mean を示す。横軸は細胞と反応させた抗体濃度(ng/mL)を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。





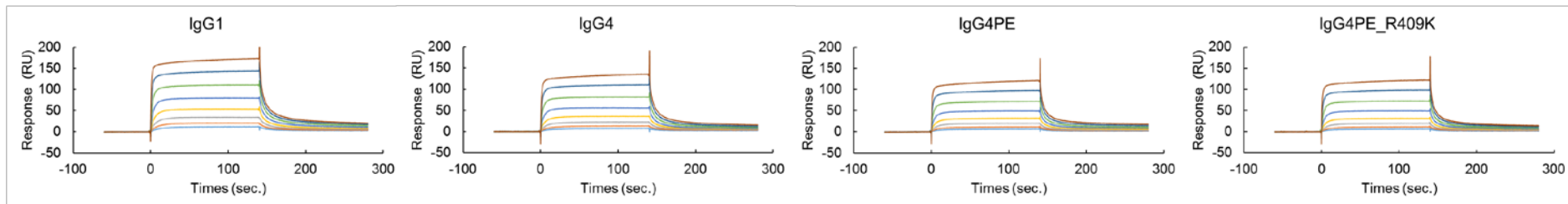




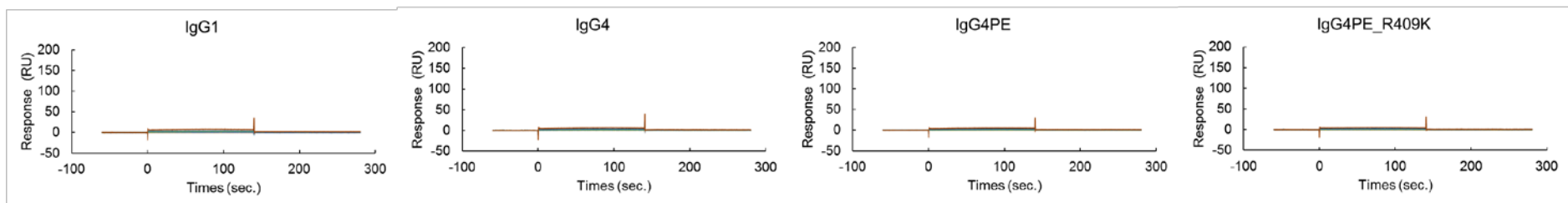
**Fig. 2-18 FcγR への結合性に及ぼす R409K 変異の影響**

ヒト FcR 結合性に対する IgG4 変異体の ELISA アッセイ。各 FcγR を抗ヒスチジン抗体を用いて 96 ウェルイムノプレート上にコーティングし、示された濃度の抗体を添加し、インキュベートし、ペルオキシダーゼ標識二次抗体で検出した。IgG1 を黒丸、IgG4 を白丸、IgG4PE を黒四角または IgG4PE\_R409K を白四角で示す。縦軸は FcγR 結合性を表す吸光度を示す。横軸は細胞と反応させた抗体濃度(μg/mL)を示す。データは、n=3 で実施した実験の平均±標準偏差として示す。

### HumanFcRn (pH 6.0)



### HumanFcRn (pH 7.4)



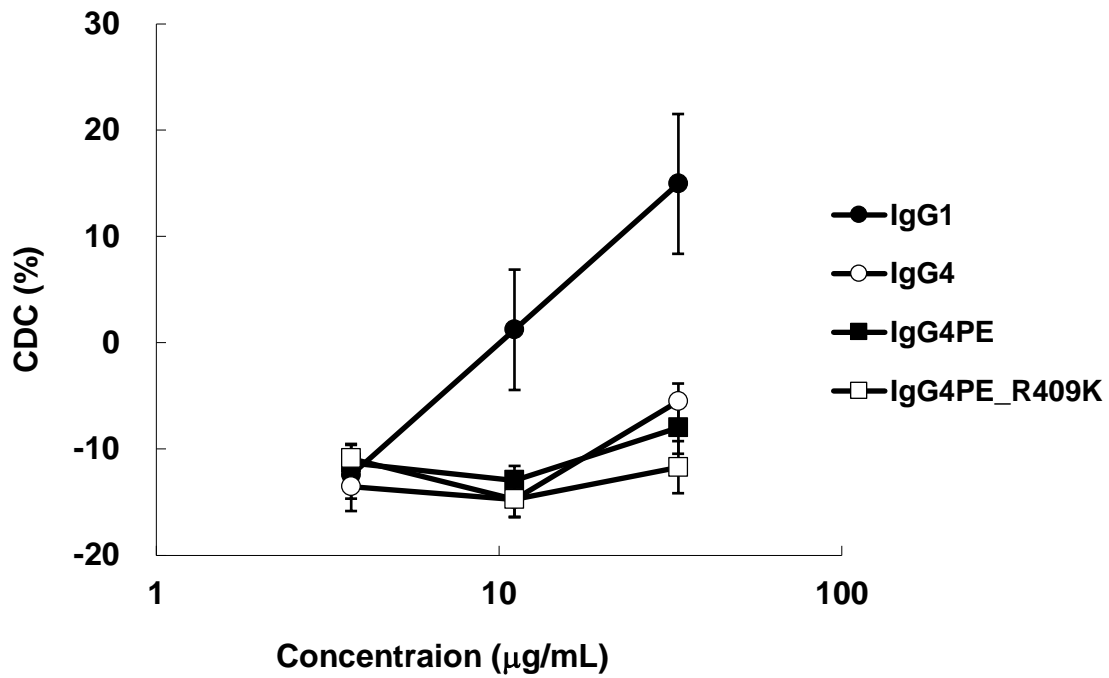
**Fig. 2-19 FcRn への結合性に及ぼす R409K 変異の影響**

抗ヒスチジン抗体をセンサーチップ上に固相化し、センサーチップ上でヒスチジンタグ融合組換え可溶性ヒト FcRn をリガンドとして捕捉し、アナライトとして各濃度の抗体（グラフ中底部より 1.25、2.5、5、10、20、40、80、160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を反応させることにより、表面プラズモン共鳴法により測定されたセンサーグラムを示す。縦軸はセンサーチップ上の質量変化を表す Resonance Units を示す。横軸は、アナライト添加時を 0 秒とした時間 (sec) を示した。0 秒から 150 秒までの間は結合相、150 秒から 300 秒までは解離相となる。また、バッファー条件として pH 6.0 または pH 7.4 で実施した。

**Table 2-7. FcRn (pH 6.0)への結合アフィニティー**

<b>Sample</b>	<b>Rmax (RU)</b>	<b>K<sub>D</sub> (x 10<sup>-7</sup> M)</b>
IgG1	190.97 ± 15.30	2.31 ± 0.06
IgG4	160 ± 31.93	2.97 ± 0.08
IgG4PE	141.33 ± 27.62	3.03 ± 0.05
IgG4PE_R409K	140.27 ± 13.43	3.11 ± 0.07

各抗体の FcRn (pH 6.0)の結合アフィニティーは表面プラズモン共鳴法により測定されたセンサーグラムより解析した。Rmax は最大結合量、K<sub>D</sub> は解離定数を示す。データは、3回で実施した実験の平均±標準偏差として示す。



**Fig. 2-20 CDC 活性に及ぼす R409K 変異の影響**

Raji 細胞に対する IgG4 変異体の CDC 活性。2 時間のインキュベーション後、細胞傷害性は、セルタイターGro を用いて測定した。縦軸は、標的細胞の非存在下のウェルを 100%としたときの、各サンプルでの標的細胞が傷害された割合 (%) を細胞傷害活性として示した。図中には、平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。試験は n = 3 で実施した。

## 2-5 考察

IgG4 は、低エフェクター機能のため、アゴニスト、アンタゴニストまたは中和の抗体医薬フォーマットとして理想的であるが、低 pH 条件下で凝集体を形成しやすいという特徴を有する。抗体の凝集体は、免疫原性、輸注反応および補体活性化などの安全性および有効性に影響をおよぼす懸念があり、従って抗体医薬の臨床適用のためには、抗体の凝集体をできるだけ除去する必要がある。理想的には、製造プロセスにおいて、凝集体が形成されない安定性を有した IgG4 が求められる。本研究において、低 pH 処理による凝集体の形成が抑制できる IgG4 改変体を見出すことに成功した。

IgG1 においては、低 pH 誘導性の凝集体形成を抑制することから、IgG1 と IgG4 の定常領域のキメラ抗体を作製することによって、凝集体形成に関するドメインまたはアミノ酸が同定できると考えた。IgG4 の CH3 を IgG1 に置換した IgG4441 が凝集体形成の抑制効果を示すことを見出し、IgG4 における凝集体形成は CH3 が原因であることが示唆された。この結果は、CH3 が酸性条件下での凝集体形成において最も重要な役割を果たすという報告と一致する [Yageta *et al.*, 2015]。一方、疎水性パッチは凝集体形成の原因の 1 つであり、インシリコの解析により予測できるという報告がある [Chennamsetty *et al.*, 2009a; Chennamsetty *et al.*, 2009b]。IgG4 の CH2 ドメインの 253 番目のイソロイシン付近は疎水性パッチを形成しているが、IgG1 または IgG2 と比較してより疎水性であることが報告されている [Skamris *et al.*, 2016]。しかしながら、本研究では、CH2 ドメインを IgG1 で置換した IgG4414 は低 pH 誘導性の凝集体形成に対する抑制効果は認められず、CH2 ドメインは重要ではないことを見出された。これは、酸条件下による CH3 ドメインの構造的変化によって、分子表面ではなく、分子間の疎水面の露出によって凝集体形成が促進されていると考察される。

CH3 ドメインにおける IgG1 および IgG4 のアミノ酸配列で異なる 6 アミノ酸残基 (Eu index の 355, 356, 358, 409, 419 および 445 番目) の中で、Fc と Fc の相互作用面は、409 番目のみであることから、IgG4 の 409 番目のアミノ酸が CH3 同士の相互作用に参与し、凝集体形成に関係していると予想した [Chennamsetty *et al.*, 2009b]。予想通り、IgG4 の 409 番目のアルギニンを IgG1 型のリジンに変換することによって、凝集体形成の抑制効果が示された。その他の 5 つのアミノ酸は比較的分子表面に位置し、また、凝集しやすいモチーフを含まないことから、今回の結果に矛盾はない [Chennamsetty *et al.*, 2009a]。Davies らは、IgG1 と IgG4 の Fc の結晶構造を解析したところ、IgG4 では一方の重鎖の 399 番目のアスパラギン酸と他方の重鎖の 409 番目のアルギニンが静電相互作用を形成しているが、同じ位置にある IgG1 の 399 番目のアスパラギン酸と 409 番目のリジンの相互作用より距離が遠いことが示されている [Davies *et al.*, 2013; Davies *et al.*, 2014]。さらに、彼らは 409 番目のアルギニンが 390 番目のアスパラギンと他方の重鎖の 399 番目のアスパラギン酸、370 番目のリジンで水を介して形成される水素結合のネットワークが破壊され、IgG4 CH3 における Fc-Fc 相互作用が IgG1 よりも弱いことを示している [Davies *et al.*, 2013; Davies *et al.*, 2014]。したがって、IgG4 の R409K 変異体は、Fc-Fc 相互作用を強めることにより、低 pH 条件による CH3 の構造的変化を抑制し、疎水面の露出を減少させることにより凝集体形成を抑制することが示唆された。また、安定性の指標として、DSF および DSC によって熱安定性評価を行ったところ、DSF において、IgG4PE\_R409K は、IgG4PE\_Q355R、IgG4PE\_E356D、IgG4PE\_M358L、IgG4PE\_E419Q、IgG4PE\_L445P と比較して Tm2 値が高いことが示唆され、さらに DSC において、IgG4PE\_R409K は、CH3 ドメインの安定性を向上させており、これまでの結果を支持している。また、これまでに、IgG1 と比較して、IgG4PE は、CH3 の熱安定性が低い傾向にあることが報告されており [Ito and Tsumoto, 2013]、今回の結果と矛盾がない。



IgG4 の Fc-Fc 相互作用は、409 番目の位置のアミノ酸の電荷およびかさ高さが重要であると予想した。IgG4 の 409 番目を他のアミノ酸に置換したところ、R409E、R409F、R409L、R409M、R409T、R409W および R409Y のような改変体で酸誘導性の凝集体形成をある程度抑制することを見出したが、IgG1 や IgG4PE\_R409K のように劇的に抑制することはできなかつた。これは、R409K とは異なり、それらの改変体はアミノ酸の性質上、疎水性相互作用によって Fc-Fc 相互作用を強化させていることによるものだと予想される。Rose らのインシリコ解析によると、409 番目の位置は、アスパラギン酸を除くすべてのアミノ酸が二量体を形成するために適切であり、その中でもメチオニンおよびトリプトファンがその傾向が強いことが報告されている [Rose *et al.*, 2011]。今回、R409M および R409W の改変体が凝集体形成抑制効果を示したのは、疎水性による CH3-CH3 相互作用の強化によるものであると推察される。また、彼らは、R409K の改変体が試験された全ての変異体の中で最も二量体となりやすいことを示しており、本研究結果と矛盾がない。CH3-CH3 相互作用を強化する改変体として、IgG4 における 370 番目の位置のアミノ酸改変がより強力であることから [Rose *et al.*, 2011]、CH3-CH3 相互作用が IgG4PE\_K370E の改変体による低 pH 誘導性の凝集体形成抑制効果に重要であることが強く示唆された。また、可変領域が異なる抗体クローンおよび重鎖鎖において R409K 改変体の凝集体抑制効果が確認され、可変領域ではなく重鎖鎖定常領域が影響するという報告 [Arosio *et al.*, 2013] と矛盾はなかつた。

IgG2 において、409 番目の位置はリジンにもかかわらず、IgG2 は酸性条件下で凝集体を形成する傾向がある。IgG2 の構造は、IgG1 と比較して明確に異なる動的な CH2-CH3 相互作用があり [Teplyakov *et al.*, 2013]、低 pH 誘導性の IgG2 の凝集体形成は中和時に部分的に可逆的であるが、IgG4 は不可逆的である [Skamris *et al.*, 2016]。したがって、409 番目がリジンであっても、凝集体の形成メカニズムは、各サブクラ

スで異なっているという仮説と矛盾がない。さらに、IgG3 においても、409 番目の位置はリジンにもかかわらず、IgG3 は酸性条件下で凝集体を形成する傾向があり、最近、IgG3 の N392K および M397V の改変体によって、酸性条件下の凝集体形成を抑制するという報告がある [Saito *et al.*, 2019]。しかしながら、本研究では、低 pH の限られた処理時間でのみ分析しており、今後、R409K 変異体の潜在的な治療抗体としての有効性を理解するために、さまざまなストレス条件下または長期安定性試験も実施する必要がある。

次に、IgG4 のヒンジ安定性と CH3 の相互作用向上の組み合わせによって、Fab-Arm Exchnage を相加的に抑制すると予想した。SDS-PAGE の結果では、ハーフ抗体産生抑制効果は、S228P のヒンジ安定化または CH3 相互作用向上によって異なっており、また、低 pH 誘導性の凝集体形成抑制効果は、S228P では認められないことより、2 つの安定化は、相加的に作用すると予想された。S228P および R409K 単独または、S228P と R409K の組み合わせで Fab-Arm Exchnage を抑制できていることが示唆されたが、K370E 単独では部分的な抑制効果であり、S228P と K370E の組み合わせにより相加的に抑制されることが示唆された。しかしながら、*in vitro* における還元型グルタチオンの濃度といった条件は、生理的な環境を必ずしも反映しておらず、濃度によって Fab-Arm Exchange の割合が変化するため [Rispen *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015; van der Neut Kolfshoten *et al.*, 2007]、今後、さらなる検証が必要である。

アミノ酸改変による抗体の生物学的性質の変化は、抗体医薬の開発における有効性および安全性に影響をおよぼす可能性があるが、R409K の改変は、少なくとも抗原結合性およびエフェクター機能等の生物学的性質に影響を及ぼさないことが判明した。また、R409K の置換による FcR 結合特性にも有意な変化は観察されなかった。FcR の CH2 ドメインが主要な FcγR 結合部位であることが知られており [Duncan *et*

*al.*, 1988; Gessner *et al.*, 1998; Vidarsson *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018]、CH3 における R409K のアミノ酸改変によっては FcγR 結合に関わる構造的な変化を与えないことが示唆された。ヒト IgG4 は低親和性 FcγR への結合により低いエフェクター機能を示し、IgG4 は FcγRI への IgG1 および IgG3 と同等に結合するため [Chenoweth *et al.*, 2015]、IgG4 の抗体医薬は、クロスリンク効果によるエフェクター活性を避けるため、235 番目のロイシンをグルタミン酸に置換することによって FcγR 結合能を減少させることができる [Newman *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2000]。R409K による Fc-Fc 相互作用の増強は、L235E の改変による FcγR 低結合効果に影響を与えず、抗体医薬として問題はあまりないと考えられる。しかしながら、今回の研究は、ELISA に基づく親和性のみを分析しており、R409K 変異体の可能性を完全に理解するために、さらなる FcγR の結合性に関する研究および分析が必要である。

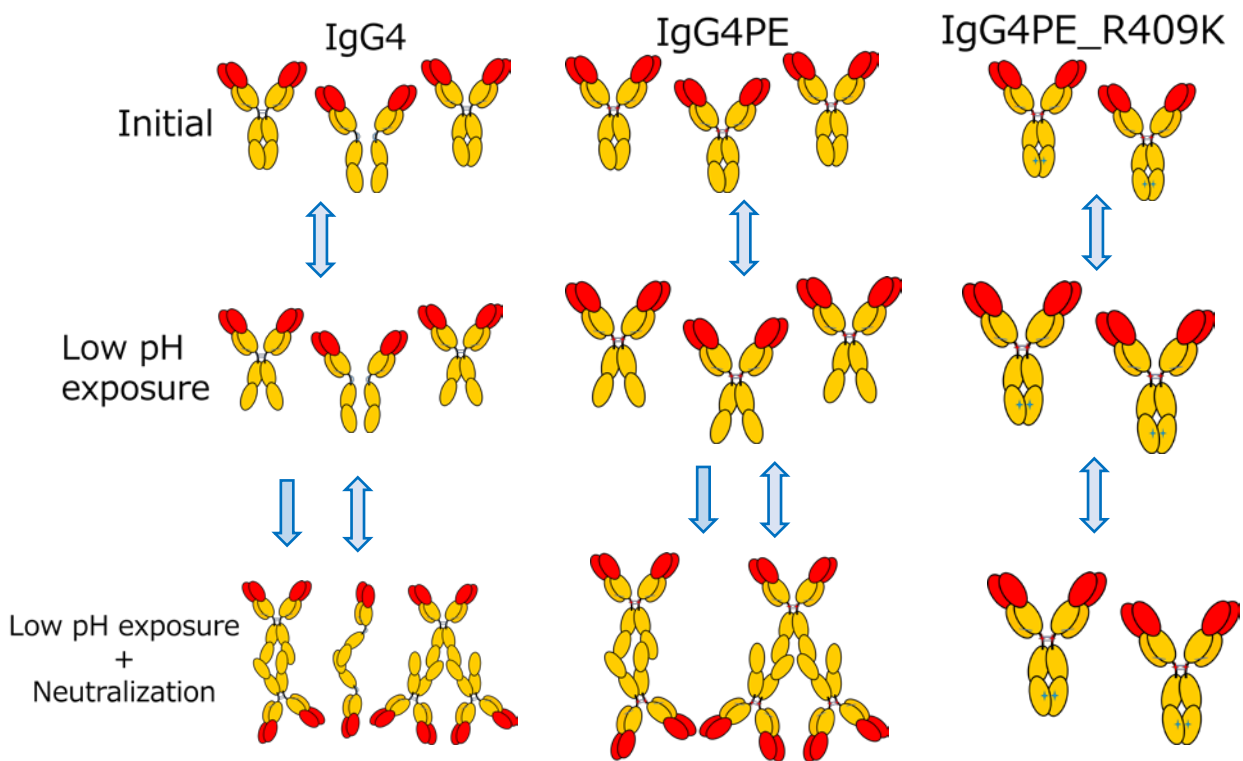
また、抗体の半減期に関与する FcRn 結合性は、R409K 変異導入により大きな変化は観察されなかった。ヒト Fc と FcRn の複合体の結晶構造から、IgG の 251 番目のロイシン、252 番目のメチオニン、253 番目のイソロイシン、309 番目のロイシン、310 番目のヒスチジン、311 番目のグルタミン、314 番目のロイシンまたは 434 番目のアスパラギンが FcRn 結合に重要なことが報告されており [Oganessian *et al.*, 2014]、CH3 における R409K のアミノ酸改変によっては FcγR 結合に関わる構造的な変化を与えないことが示唆された。

CDC 活性に関しては、そもそも IgG4 は、C1q への結合性が低いため、補体活性がほとんどないことが知られており、また、C1q の IgG の結合領域は CH2 の 235、265、270、322、329 および 331 番目のアミノ酸であるため、CH3 の R409K 改変体は影響がないと予想された [Brekke *et al.*, 1994; Idusogie *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 1995; Tao *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 1994]。一方で、IgG1 の CH3 の 397 番目のバリンを IgG3 型のメチオニンに置換した IgG1 と IgG3 のキメラ抗体で、CDC 活性を増強させることが報告された [Natsume *et al.*, 2008]。この増強強化のメカニズムは、

CH3 相互作用を弱め、CH3 の柔軟性を増加させることによって、C1q 結合に変化を与えることが示唆されている [Rispen *et al.*, 2014]。しかしながら、IgG4 の R409K は反対に、CH3 相互作用を強め、CH3 の柔軟性をなくすため、CDC 活性に影響をおよぼさないという結果に矛盾はないと考えられる。

今日、アンタゴニスト、アゴニストまたは中和抗体の適切なフォーマットとしてエフェクター機能を失くした IgG スキャフォールドの報告がされており [Labrijn *et al.*, 2008]、抗体医薬の開発可能性の一つとして、安定性を考慮することが重要であると考えられている。最近の報告において、IgG1 ベースで、N297G または L234A、L235A、P329G 変異体がエフェクター機能をなく、かつ、安定であることが示されている [Jacobsen *et al.*, 2017; Lo *et al.*, 2017]。IgG1 の低エフェクター機能の改変体は選択肢になるが、サブクラスによってアゴニストまたはアンタゴニスト活性が異なる可能性があるため、抗体の機能に適したサブクラスを選択する必要がある、すべての抗体に適応できるわけではないと考えられる [Kai *et al.*, 2008; Grujic *et al.*, 2017; Könitzer *et al.*, 2015]。また、IgG1 は、低 pH 条件下において分解物が増加することやラジカル誘導性のヒンジ切断といった安定性に関する報告もあり、さらなる検討が必要である [Ito and Tsumoto, 2013; Kamerzell *et al.*, 2011; Yan and Boyd, 2011; Yan *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2009; Yates *et al.*, 2010]。R409K 変異を有する治療用 IgG4 抗体は未だ承認されていないが、ヒト IgG4 アロタイプの 1 つは R409K が存在し [Brusco *et al.*, 1998]、また、ヒトにおいて IgG4 関連疾患を含む特定の疾患で R409K 変異が疾患の原因であるという報告はない [Ahmad *et al.*, 2014]。これは、R409K 変異体がヒトにおいて安全であることを示唆しているが、R409K 変異体の可能性を完全に理解するためにさらなる非臨床試験が必要である。

安定化 IgG4 の凝集体形成抑制効果のメカニズムについて、これまでの結果および報告から Fig. 2-21 にまとめた。野生型 IgG4 は、通常、インタクト抗体とハーフ抗体の形態で存在し、低 pH 条件下では、CH3 の構造変化に伴い、CH3-CH3 相互作用面が露出し、インタクト抗体またはハーフ抗体が CH3 の疎水面を介した凝集体が形成される。一部、不可逆的に凝集体が形成されることが考えられる。また、ヒンジ安定化体である IgG4PE は、通常、インタクト抗体の形態で存在し、低 pH 条件下では、IgG4 同様にインタクト抗体同士が CH3 の疎水面を介した凝集体が形成される。IgG4PE\_R409K は、通常、インタクト抗体であり、CH3-CH3 の非共有結合の相互作用により、Fc 部分がパッキングされている。低 pH 条件下において、構造変化による CH3 相互作用面の露出がなく、CH3 を介した抗体同士の凝集体の形成が抑制されることが考えられる。



**Fig. 2-21 安定化 IgG4 の凝集体形成抑制効果のメカニズム**

**IgG4** ; 通常、IgG4 はインタクト抗体とハーフ抗体の形態として存在する。低 pH 条件下では、CH3 の構造変化に伴い、CH3-CH3 相互作用面が露出し、インタクト抗体またはハーフ抗体が CH3 の疎水面を介した凝集体が形成される。

**IgG4PE** ; 通常、IgG4PE はインタクト抗体の形態で存在し、低 pH 条件下では、IgG4 同様にインタクト抗体同士が CH3 の疎水面を介した凝集体が形成される。

**IgG4PE\_R409K** ; 通常、IgG4PE\_R409K はインタクト抗体であり、CH3-CH3 の非共有結合の相互作用により、Fc 部分がパッキングされている。低 pH 条件下において、構造変化による CH3 相互作用面の露出がなく、CH3 を介した抗体同士の凝集体の形成が抑制される。

本研究は、ヒト IgG4 における低 pH 誘導性の凝集体抑制のためのタンパク質工学による R409K 変異の生物学的重要性を実証した。さらに、IgG4PE R409K の抗原、FcγR の結合性および CDC 活性を含む生物物理学的プロファイルは、現在の治療用抗体の低エフェクター機能のためのフォーマットである IgG4PE と類似していた。本研究結果は、抗体の安定化に関する新しい情報を提供し、より改善された安定性を有する治療用抗体の設計および工学のための新しい手がかりを提供している。

## 2 – 6 引用文献

- Ahmad M, Mahajan VS, Mattoo H, Stone JH, Pillai S. Individuals with IgG4-related disease do not have an increased frequency of the K409 variant of IgG4 that compromises Fab-arm exchange. *J Rheumatol.* 2014; 41(1): 185-7.
- Arosio P, Rima S, Morbidelli M. Aggregation mechanism of an IgG2 and two IgG1 monoclonal antibodies at low pH: from oligomers to larger aggregates. *Pharm Res.* 2013; 30(3): 641-54.
- Brekke OH, Michaelsen TE, Aase A, Sandin RH, Sandlie I. Human IgG isotype-specific amino acid residues affecting complement-mediated cell lysis and phagocytosis. *Eur J Immunol.* 1994; 24(10): 2542-7.
- Brusco A, Saviozzi S, Cinque F, DeMarchi M, Boccazzi C, de Lange G, et al. Molecular characterization of immunoglobulin G4 gene isoallotypes. *Eur J Immunogenet.* 1998; 25(5): 349-55.
- Chennamsetty N, Helk B, Voynov V, Kayser V, Trout BL. Aggregation-prone motifs in human immunoglobulin G. *J Mol Biol.* 2009; 391(2): 404-13.
- Chennamsetty N, Voynov V, Kayser V, Helk B, Trout BL. Design of therapeutic proteins with enhanced stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(29): 11937-42.
- Chenoweth AM, Trist HM, Tan PS, Wines BD, Hogarth PM. The high-affinity receptor for IgG, FcγRI, of humans and non-human primates. *Immunol Rev.* 2015; 268(1): 175-91.
- Davies AM, Rispens T, den Bleker TH, McDonnell JM, Gould HJ, Aalberse RC, et al. Crystal structure of the human IgG4 C(H)3 dimer reveals the role of Arg409 in the mechanism of Fab-arm exchange. *Mol Immunol.* 2013; 54(1): 1-7.
- Davies AM, Rispens T, Ooijevaar-de Heer P, Gould HJ, Jefferis R, Aalberse RC, et al. Structural determinants of unique properties of human IgG4-Fc. *J Mol Biol.* 2014; 426(3): 630-44.
- Duncan AR, Woof JM, Partridge LJ, Burton DR, Winter G. Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG. *Nature.* 1988; 332(6164): 563-4.
- Ejima D, Tsumoto K, Fukada H, Yumioka R, Nagase K, Arakawa T, Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins.* 2007;



66(4): 954-62.

Elgundi Z, Reslan M, Cruz E, Sifniotis V, Kayser V. The state-of-play and future of antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017; 122: 2-19.

Food and Drug Administration. Guidance for industry: immunogenicity assessment for therapeutic protein products. 2014.

<https://www.bioagilytix.com/wp-content/uploads/2016/02/FDA-draft-guideline-on-immunogenicity-2013.pdf>

Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol.* 1998; 76(6): 231-48.

Goldberg DS, Bishop SM, Shah AU, Sathish HA. Formulation development of therapeutic monoclonal antibodies using high-throughput fluorescence and static light scattering techniques: role of conformational and colloidal stability. *J Pharm Sci.* 2011; 100(4): 1306-15.

Grujic O, Stevens J, Chou RY, Weiszmann JV, Sekirov L, Thomson C, et al. Impact of antibody subclass and disulfide isoform differences on the biological activity of CD200R and  $\beta$ klotho agonist antibodies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 486(4): 985-91.

Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, et al. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* 2000; 164(8): 4178-84.

Ishikawa T, Ito T, Endo R, Nakagawa K, Sawa E, Wakamatsu K. Influence of pH on heat-induced aggregation and degradation of therapeutic monoclonal antibodies. *Biol Pharm Bull.* 2010; 33(8): 1413-7.

Ito T, Tsumoto K. Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress. *Protein Sci.* 2013; 22(11): 1542-51.

Jacobsen FW, Stevenson R, Li C, Salimi-Moosavi H, Liu L, Wen J, et al. Engineering an IgG scaffold lacking effector function with optimized developability. *J Biol Chem.* 2017; 292(5): 1865-75.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Foeller C, Gottesman KS. Sequence of proteins of immunological interest. U.S. Public Health Services, National Institutes of Health, 1991

Bethesda MD.

Kai M, Motoki K, Yoshida H, Emuta C, Chisaka Y, Tsuruhata K, et al. Switching constant domains enhances agonist activities of antibodies to a thrombopoietin receptor. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(2): 209-11.

Kamerzell TJ, Li M, Arora S, Ji JA, Wang YJ. The relative rate of immunoglobulin gamma 1 fragmentation. *J Pharm Sci.* 2011; 100(4): 1341-9.

Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs.* 2019; 11(2): 219-38.

Könitzer JD, Sieron A, Wacker A, Enenkel B. Reformatting Rituximab into Human IgG2 and IgG4 Isotypes Dramatically Improves Apoptosis Induction In Vitro. *PLoS One.* 2015; 10(12)

Labrijn AF, Aalberse RC, Schuurman J. When binding is enough: nonactivating antibody formats. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20(4): 479-85.

Labrijn AF, Buijsse AO, van den Bremer ET, Verwilligen AY, Bleeker WK, Thorpe SJ, et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol.* 2009; 27(8): 767-71.

Labrijn AF, Rispens T, Meesters J, Rose RJ, den Bleker TH, Loverix S, et al. Species-specific determinants in the IgG CH3 domain enable Fab-arm exchange by affecting the noncovalent CH3-CH3 interaction strength. *J Immunol.* 2011; 187(6): 3238-46.

Liu B, Guo H, Xu J, Qin T, Xu L, Zhang J, et al. Acid-induced aggregation propensity of nivolumab is dependent on the Fc. *MAbs.* 2016; 8(6): 1107-17.

Lo M, Kim HS, Tong RK, Bainbridge TW, Vernes JM, Zhang Y, et al. Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice. *J Biol Chem.* 2017; 292(9): 3900-8.

Mazzer AR, Perraud X, Halley J, O'Hara J, Bracewell DG. Protein A chromatography increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation hold. *J Chromatogr A.* 2015; 1415: 83-90.

Morgan A, Jones ND, Nesbitt AM, Chaplin L, Bodmer MW, Emtage JS. The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology.* 1995; 86(2): 319-24.

Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Narhi LO, et al. Immunogenicity

of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci.* 2016; 105(2): 417-30.

Natsume A, In M, Takamura H, Nakagawa T, Shimizu Y, Kitajima K, et al. Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Res.* 2008; 68(10): 3863-72.

Natsume A, Niwa R, Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther.* 2009; 21(3): 7-16.

Newman R, Hariharan K, Reff M, Anderson DR, Braslawsky G, Santoro D, et al. Modification of the Fc region of a primatized IgG antibody to human CD4 retains its ability to modulate CD4 receptors but does not deplete CD4(+) T cells in chimpanzees. *Clin Immunol.* 2001; 98(2): 164-74.

Niwa R, Natsume A, Uehara A, Wakitani M, Iida S, Uchida K, et al. IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *J Immunol Methods.* 2005; 306(1-2): 151-60.

Oganesyan V, Damschroder MM, Cook KE, Li Q, Gao C, Wu H. *J Biol Chem.* 2014; 289(11): 7812-24.

Poiron C, Wu Y, Ginestoux C, Ehrenmann F, Patrice D, Lefranc M-P. IMGT/mAb-DB: the IMGT database for therapeutic monoclonal antibodies. *JOBIM* 2010;13.

<http://www.imgt.org/mAb-DB/doc>

Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, et al. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol.* 2000; 164(4): 1925-33.

Rispens T, Davies AM, Ooijevaar-de Heer P, Absalah S, Bende O, Sutton BJ, et al. Dynamics of inter-heavy chain interactions in human immunoglobulin G (IgG) subclasses studied by kinetic Fab arm exchange. *J Biol Chem.* 2014; 289(9): 6098-109.

Rose RJ, Labrijn AF, van den Bremer ET, Loverix S, Lasters I, van Berkel PH, et al. Quantitative analysis of the interaction strength and dynamics of human IgG4 half molecules by native mass spectrometry. *Structure.* 2011; 19(9): 1274-82.

Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* 2006; 8(3): E501-7.

Saito S, Namisaki H, Hiraishi K, Takahashi N, Iida S. A stable engineered human IgG3 antibody with decreased aggregation during antibody expression and low pH stress. *Protein Sci.* 2019; 28(5): 900-9.

Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering, *Nat Biotechnol.* 2007; 25(12): 1369-72.

Schuurman J, Perdok GJ, Gorter AD, Aalberse RC. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol Immunol.* 2001; 38(1): 1-8.

Sheridan C. Immuno-oncology moves beyond PD-1. *Nat Biotechnol.* 2015; 33(7): 673-5.

Silva JP, Vetterlein O, Jose J, Peters S, Kirby H. The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation. *J Biol Chem.* 2015; 290(9): 5462-9.

Skamris T, Tian X, Thorolfsson M, Karkov HS, Rasmussen HB, Langkilde AE, et al. Monoclonal Antibodies Follow Distinct Aggregation Pathways During Production-Relevant Acidic Incubation and Neutralization. *Pharm Res.* 2016; 33(3): 716-28.

Tao MH, Smith RI, Morrison SL. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J Exp Med.* 1993; 178(2): 661-7.

Teplyakov A, Zhao Y, Malia TJ, Obmolova G, Gilliland GL. IgG2 Fc structure and the dynamic features of the IgG CH2-CH3 interface. *Mol Immunol.* 2013; 56(1-2): 131-9.

Tian X, Langkilde AE, Thorolfsson M, Rasmussen HB, Vestergaard B. Small-angle x-ray scattering screening complements conventional biophysical analysis: comparative structural and biophysical analysis of monoclonal antibodies IgG1, IgG2, and IgG4. *J Pharm Sci.* 2014; 103(6): 1701-10.

van der Neut Kofschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martínez-Martínez P, Vermeulen E, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science.* 2007; 317(5844): 1554-7

Vasilyeva E, Woodard J, Taylor FR, Kretschmer M, Fajardo H, Lyubarskaya Y, et al. Development of a chip-based capillary gel electrophoresis method for quantification of a half-antibody in immunoglobulin G4 samples. *Electrophoresis.* 2004; 25(21-22): 3890-6.

Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector

functions. *Front Immunol.* 2014; 5: 520.

Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT, Huang H, Feingersh D, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(9): 846-56.

Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell.* 2018; 9(1): 63-73.

Xu Y, Oomen R, Klein MH. Residue at position 331 in the IgG1 and IgG4 CH2 domains contributes to their differential ability to bind and activate complement. *J Biol Chem.* 1994; 269(5): 3469-74.

Yageta S, Lauer TM, Trout BL, Honda S. Conformational and Colloidal Stabilities of Isolated Constant Domains of Human Immunoglobulin G and Their Impact on Antibody Aggregation under Acidic Conditions. *Mol Pharm.* 2015; 12(5): 1443-55.

Yan B, Boyd D, Kaschak T, Tsukuda J, Shen A, Lin Y, et al. Engineering upper hinge improves stability and effector function of a human IgG1. *J Biol Chem.* 2012; 287(8): 5891-7.

Yan B, Boyd D. Breaking the light and heavy chain linkage of human immunoglobulin G1 (IgG1) by radical reactions. *J Biol Chem.* 2011; 286(28): 24674-84.

Yan B, Yates Z, Balland A, Kleemann GR. Human IgG1 hinge fragmentation as the result of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated radical cleavage. *J Biol Chem.* 2009; 284(51): 35390-402.

Yang X, Wang F, Zhang Y, Wang L, Antonenko S, et al. Comprehensive Analysis of the Therapeutic IgG4 Antibody Pembrolizumab: Hinge Modification Blocks Half Molecule Exchange In Vitro and In Vivo. *J Pharm Sci.* 2015; 104(12): 4002-14.

Yates Z, Gunasekaran K, Zhou H, Hu Z, Liu Z, Ketchum RR, et al. Histidine residue mediates radical-induced hinge cleavage of human IgG1. *J Biol Chem.* 2010; 285(24): 18662-71.

投稿論文

Hiroshi Namisaki, Seiji Saito, Keiko Hiraishi, Tomoko Haba, Yoshitaka Tanaka, Hideaki Yoshida, Shigeru Iida and Nobuaki Takahashi

R409K mutation prevents acid-induced aggregation of human IgG4.

PLoS ONE 2019, *in preparation*

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、多大なるご指導を賜りました、九州大学大学院 薬学  
研究院 臨床薬学部門 細胞生物薬学 田中 嘉孝 教授に深く感謝いたします。

本論文を執筆するにあたり、大変有益なご助言とご教示を賜りました、九州大学大  
学院 薬学研究院 山田 健一 教授、阿部 義人 准教授、石井 祐次 准教授に心  
より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、協和発酵キリン株式会社の方々にご指導、ご助言いた  
だきました。本研究ならびに日頃よりご指導いただきました 高橋 信明 マネージャ  
ーに厚く感謝いたします。

本論文を執筆するにあたり、多大なるご助言を賜りました、飯田 茂 研究所長に心  
より感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、実験の実施ならびに数多くのご助言を頂きました斎藤 誠嗣  
主任研究員、吉田 英明 主任研究員、木村 要 主任研究員、平石 敬子 研究員、巾  
朋子 研究員、橋詰由美子 研究員、久保田愛 研究員をはじめ皆様に感謝申し上げま  
す。

最後に、これまで温かく見守り支援してくれた両親ならびに、日々陰ながら支えて  
くれ、ときに励ましてくれた家族に深く感謝いたします。