

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 :

氏 名 : 浪崎博史

論文題名 : ヒト IgG4 抗体の安定化に関する研究

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

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り、2018 年には米国または欧州において、12 の抗体医薬が承認されている。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。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。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。しかしながら、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ことが報告されている。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 (Fig.1)。

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

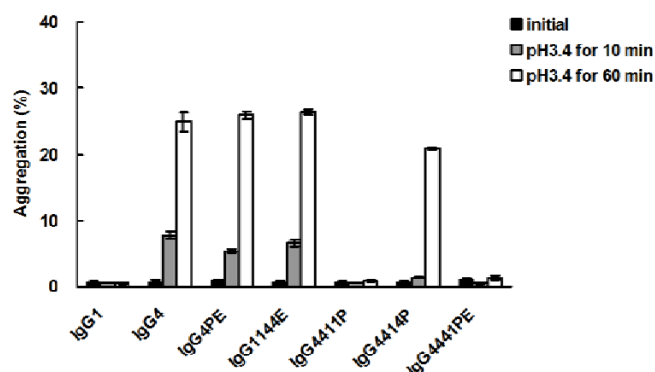


Fig.1 ヒトIgG1およびIgG4のドメインスワッピングによる低pHにおける凝集体形成の原因となるドメインの同定

(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 (Fig.2)。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。また、409 番目の位置のアミノ酸をリジン以外のアミノ酸に置換して、低 pH 誘導性の凝集体形成抑制効果について検討したところ、R409K と同等な抑制効果を示すアミノ酸置換を見出せなかった。

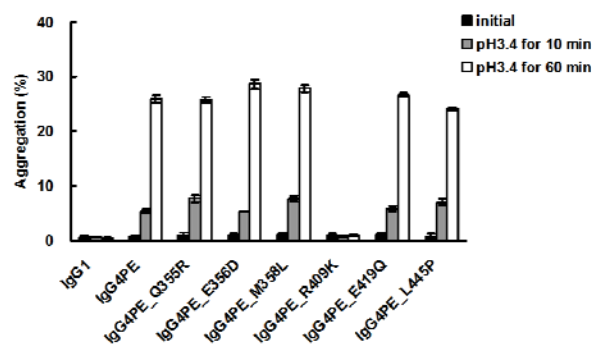


Fig. 2 ヒトIgG4のCH3ドメインにおける変異導入による低pHにおける凝集体形成の原因となるアミノ酸の同定

次に、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 (Table.1)。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。また、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

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

Table.1 示差走査熱量測定による熱力学的安定性の解析

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。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* 試験において、Fab Arm-Exchange を IgG1 と同等に抑制することが示された。最後に、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またはヒト Fc γ 受容体への結合および CDC 活性を解析した。R409K のアミノ酸置換は、抗体の抗原またはヒト Fc γ 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。