

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

臨床薬学部門 細胞生物薬学分野 (学籍番号) 3PS16001N (氏名) 浪崎博史

【序論】

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、補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性、抗体依存性細胞傷害 (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、CDC または ADCC 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。2018 までに米国また欧州において、ナタリズマブ、ペンプロリズマブ、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。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 [Ejima *et al.*, 2007]。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。

【方法】

モデル抗体として、抗 CD20 抗体のサブクラス置換、定常領域のドメイン置換およびアミノ酸の点変異の以下の改変体を作製した。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。凝集体の形成抑制の評価は、抗体を pH 3.4 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にて、可溶性の凝集体の含量を分析することによって行った。また、モデル構造の解析は、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 を用いて解析した。さらに、抗体の改変体の熱安定性は示差走査熱量測定(DSC)を用いて行った。また、IgG4 は、生体内において、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おり [van der Neut Kolfshoten *et al.*, 2007]、改変体の *in vitro* および *in vivo* における Fab-arm exchange に及ぼす影響を検討した。6 週齢の雌性 Balb / c ノードマウスに κ 鎖または λ 鎖を有する改変体をそれぞれ 100 μ g 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、 κ および λ 鎖の両方を有する抗体の検出を行った。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 受容体への結合および CDC 活性を解析した。

【結果】

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 (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。

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 の構造を用いて構造的な分析を行ったところ、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。また、6 つのアミノ酸が CH3-CH3 の相互作用面にあ

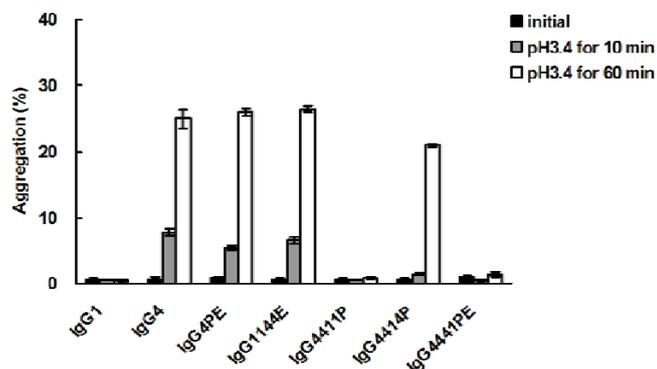


Fig. 1 ヒトIgG1およびIgG4のドメインスワッピングによる低pHにおける凝集体形成の原因となるドメインの同定

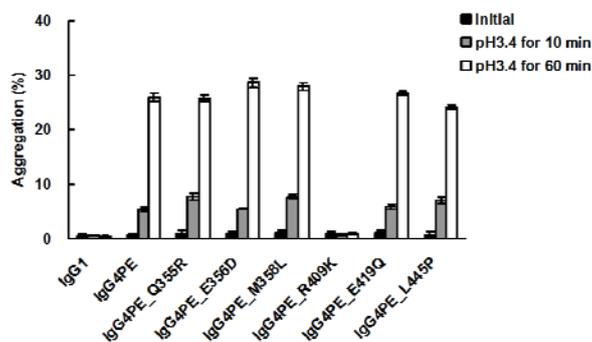


Fig. 2 ヒトIgG4のCH3ドメインにおける変異導入による低pHにおける凝集体形成の原因となるアミノ酸の同定

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、409 番目のアルギニンで 6%であり、6 つのアミノ酸の中では、露出割合が最も低いことが明らかとなった。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)。

Sample	domain	Tm (°C)		
		CH2	Fab	CH3
IgG1		71.5	76.0	83.8
IgG4		69.8	74.3	N.D.
IgG4PE		67.2	74.4	N.D.
IgG4PE R409K		66.4	75.0	83.2

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、

Table.1 示差走査熱量測定による熱力学的安定性の解析

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 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 のアミノ酸置換は、抗体の抗原またはヒト Fc 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。

【考察】

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]。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 同士の相互作用に関与し、凝集体形成に関係していると考えられた。IgG1 と IgG4 の Fc の結晶構造の解析の報告から、IgG4 では 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。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考えられる。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、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]。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考えられる。

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、FcR 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。

【引用文献】

Davies AM, Rispiens 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, Rispiens 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.

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.

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.

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.

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

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.