

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03228

研究課題名(和文) Understanding the efficacy of therapeutic antibodies through their interaction with cellular receptors.

研究課題名(英文) Understanding the efficacy of therapeutic antibodies through their interaction with cellular receptors.

研究代表者

CAAVEIRO Jose (CAAVEIRO, Jose)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：00536732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：IgG ファミリーの抗体とその細胞受容体間の相互作用の分子レベルでの理解を進めました。我々は、受容体との相互作用の強さに対する中央ヒンジ領域の突然変異の影響が予想よりも小さいことを説明しました(中央ヒンジはジスルフィド結合が位置する場所です)。しかし、結合界面のすぐ近くにある残基は大きな影響を及ぼしました。私たちの研究は、Abs の効力に大きな影響を与えることなく、ヒンジ領域での抗体の操作をサポートしています。さらに、腹筋の効力を向上させるために重要な貢献をしました。このアプローチを使用して、抗 HIV-1 Ab の効力を 500 倍以上改善しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

From a scientific point, we have advanced the basic knowledge of the interaction between antibodies and their cellular receptors. From a social point of view, the technology discovered herein improves the potency of antibodies and might save the lives of people suffering from infectious diseases.

研究成果の概要(英文)：We advanced the understanding of the interaction between antibodies of the IgG family and their cellular receptors at the molecular level. We have described the less-than expected effect of mutations in the middle hinge region to the strength of the interaction with receptors (the middle hinge is where the disulfide bond is located). However, residues in close proximity to the binding interface had a profound effect. Our studies support the engineering of antibodies in the hinge region without major effect in the potency of Abs.

Additionally, we made an important contribution to improve the potency of Abs. This process was patented and consist on (i) the introduction of a CYS residue in a strategic location and (2) chemical modification of the CYS residue by a yodo acetamide molecule of specific atomic structure. Using this approach we have improved the potency of anti-HIV-1 Abs by more than 500-fold.

研究分野：43040 Biophysics related

キーワード：Antibody Fc receptor hinge structure immunology glycosylation bnAbs HIV-1

1. 研究開始当初の背景

治療用抗体によってもたらされる現在進行中の革命は、不治の病を治療するための比類のない有効性の結果として、医療の状況を永遠に変えました。

2. 研究の目的

生物物理学および構造的技術を適用することにより、抗体の作用機序および受容体との相互作用の基本的基礎を進歩させます。

3. 研究の方法

当社では、組換えタンパク質技術を利用して、さまざまな抗体モダリティ、特に全長 IgG、Fab フラグメント、Fc フラグメント、さらには Fc の CH2 ドメインなどのより小さなフラグメントを生成しました。I および IIIA クラスの Fc 受容体も調製しました。これらの構築物の一部は大腸菌で調製され、*Pichia pastoris*、一部は哺乳類細胞 (特に抗体) で調製され、一部はグリカンの影響を比較できるように両方で調製されました。私たちは、X 線結晶構造解析、生物物理学/相互作用分析、生化学および細胞アッセイによる機能特性評価などの原子レベルの構造を探索するために高度な技術を採用しました。

4. 研究成果

抗体の最適化

抗体による膜に埋め込まれた抗原の認識に対する膜界面相互作用の寄与は、現時点では不明である。

このレポートは、エピトープの認識には直接関与しないが、膜に近い領域の化学修飾によるこのタイプの抗体の最適化を示しています。HIV-1 抗体 10E8 をモデルとして使用し、直鎖状および多環式合成芳香族化合物を選択した部位に導入します。分子動力学シミュレーションにより、これらの合成化合物と、HIV-1 糖タンパク質 Env のエピトープが位置するウイルス脂質膜との好ましい相互作用が予測されます。芳香族アセトアミドによる 10E8 の化学修飾は、ウイルス膜の密集した環境に部分的に埋もれているネイティブ抗原の生産的かつ特異的な認識を促進し、ウイルス感染をブロックするその能力の劇的な増加をもたらします。これらの観察は、膜近位エピトープを標的とする抗体の機能を最適化するための、部位選択的化學修飾による界面親和性の利用を裏付けています (図 1)。

芳香族化合物を使用した部位選択的化學修飾を利用して、生体膜またはその近くで作用する Ab だけでなく、他のタイプの Ab、さらにはさまざまな機能や治療プロファイルの他のクラスのタンパク質やペプチドを最適化するために利用できる可能性があると考えています。

自己反応性の軽減

HIV-1 に対する広範な中和抗体 (bnAb) は、多くの場合、自己反応性/多重反応性の存在と関連しており、この特性により治療薬としての使用が制限される可能性があります。HIV-1 の保存された膜近位外部領域 (MPER) を標的とする bnAb 4E10 は、世界中に循環している HIV-1 株全体でほぼ汎中和活性を示しますが、脂質膜との非特異的なオフターゲット相互作用を示します。重鎖の 3 番目の相補性決定領域 (CDRH3) ループの疎水性頂点は、ウイルスの中和に必須であり、この悪影響に決定的に寄与しています。ここでは、化學修飾によって 4E10 の CDRH3

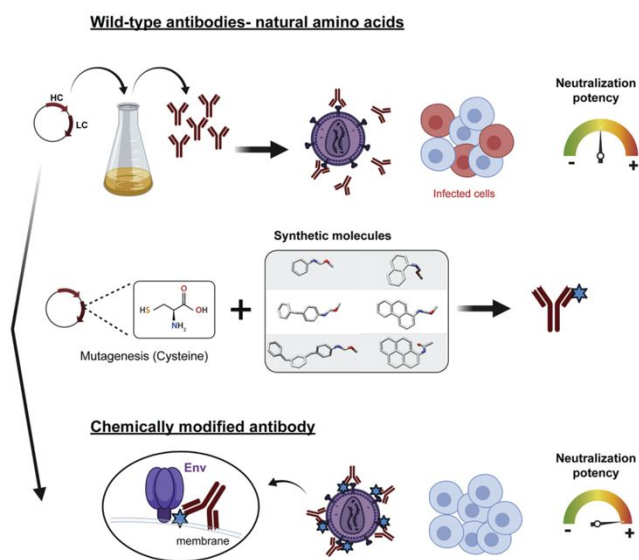


図 1. 側方化学修飾により、抗 HIV-1 抗体の効力が最大 700 倍増加します。Rujas et al (2020) より翻案。

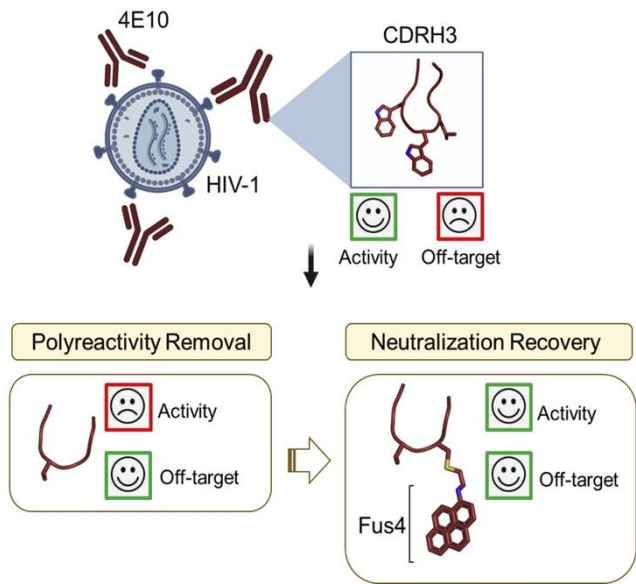


図 2. 自己反応性を低下させる戦略。Rujas et al (2021) より翻案。

の頂点にある芳香族/疎水性残基を単一の芳香族分子に置き換え、4E10 の中和能力と幅を維持しながら自己反応性が低下した変異体を生成しました。まとめると、我々の研究は、化学修飾による芳香族性の局所的蓄積が、抗 HIV-1 MPER bnAbs の CDRH3 によって引き起こされる悪影響を改善する経路を提供することを示唆しています。

私たちの研究は、4E10 の CDRH3 がベルクロのような締め付けシステムとして機能して、融合の進行と両立しない安定した Env 複合体を形成する可能性を示唆しており、CDRH3 の疎水性の化学工学が、細胞の認識を改善するための一般的な戦略として使用できる可能性を提唱している。膜に近いエピート。さらに、これらのデータは、界面疎水性を単一の位置に集中させることにより、非特異的な脂質相互作用を生じさせることなく疎水性を高める代替戦略を提供する。ただし、より強力な抗体の出現により 4E10 の臨床使用が制限されていること、およびこの方法の適用可能性を判

断するには、この戦略をより多くの抗体セットに適用する必要があることを認識しています。

CH2 ドメインの解析。

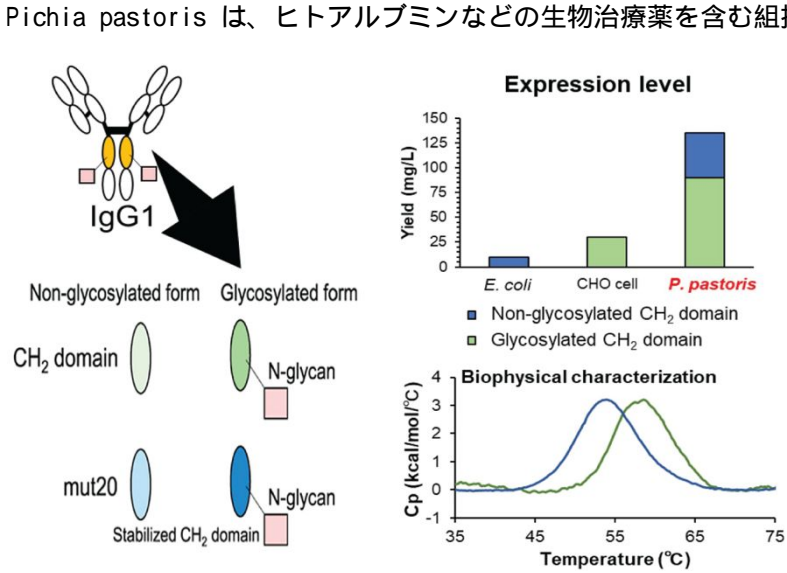


図 2. CH2 ドメインの解析。Oyama et al (2021) より翻案。

安価に生産するために使用される人気のある真核生物システムです。ヒト免疫グロブリン G (IgG) の CH2 ドメインは、新しい治療法を開発するための有望な足場です。CH2 ドメインの研究を加速するために、酵母 *P. pastoris* でヒト CH2 ドメイン (約 150 mg/l) およびヒト Fc (約 30 mg/l) を高発現する手順を確立しました。この手順により、主要なグリコシル化画分(約 70%)と非グリコシル化画分(約 30%)が同時に得られます。これらは高純度で容易に分離できます。どちらの形態の CH2 ドメインも本質的に同じ二次構造

を持っていますが、熱量測定から測定したところ、グリカンの存在により CH2 ドメインの熱安定性が約 5 増加しました。精製されたグリコシル化 CH2 ドメインは、マウスにおいてポリクローナル抗体を誘発し、CH2 ドメインだけでなく、組換えヒト Fc および市販の IgG1 抗体 Rituxan も認識しました。私たちは、宿主生物ピキア・パストリスにおいてグリコシル化および非グリコシル化 CH2 ドメインを調製することに成功しました。本明細書において、我々は、マウスにおいて CH2 ドメインのグリコシル化によりその凝集傾向と免疫原性の両方が減少することを検証し、凝集と免疫原性が関連していることを示唆した。さらに、本発明者らは、グリカンを含むまたは含まない安定化バージョンの CH2 ドメインを *P. パストリス* で作製し、それらの凝集傾向を評価した。我々は、安定化だけで CH2 ドメインの凝集が大幅に減少することを発見しました。さらに、グリコシル化と安定化の組み合わせにより、その凝集挙動は完全に抑制されました。タンパク質の凝集は免疫原性に関連しているため、タンパク質の凝集挙動を排除するためのグリコシル化と安定化の組み合わせは、有望な免疫グロブリン足場を生成するための有益な戦略となる可能性があります。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Rujas Edurne, Leaman Daniel P., Insausti Sara, Carravilla Pablo, Garc?a-Porras Miguel, Largo Eneko, Morillo Izaskun, S?nchez-Eugenia Rub?n, Zhang Lei, Cui Hong, Iloro Ibon, Elortza F?lix, Julien Jean-Philippe, Eggeling Christian, Zwick Michael B., Caaveiro Jose M.M., Nieva Jos? L.	4. 巻 24
2. 論文標題 Focal accumulation of aromaticity at the CDRH3 loop mitigates 4E10 polyreactivity without altering its HIV neutralization profile	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102987 ~ 102987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Oyama Kosuke, Ohkuri Takatoshi, Ochi Junta, Caaveiro Jose M.M., Ueda Tadashi	4. 巻 558
2. 論文標題 Abolition of aggregation of CH2 domain of human IgG1 when combining glycosylation and protein stabilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 114 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Rujas Edurne, various authors, Ojida Akio, Domene Carmen, Caaveiro Jose M.M., Nieva Jose L.	4. 巻 32
2. 論文標題 Affinity for the Interface Underpins Potency of Antibodies Operating In Membrane Environments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108037 ~ 108037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Oyama Kosuke, Ohkuri Takatoshi, Inoue Mao, Caaveiro Jose M M, Ueda Tadashi	4. 巻 170
2. 論文標題 High-level expression of human CH2 domain from the Fc region in Pichia pastoris and preparation of anti-CH2 antibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 289 ~ 297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yokoo Takanori, Tanabe Aki, Yoshida Yoko, Caaveiro Jose M.M., Nakakido Makoto, Ikeda Yoichiro, Fujimura Yoshihiro, Matsumoto Masaneori, Entzminger Kevin, Maruyama Toshiaki, Okumura C.J., Nangaku Masaomi, Tsumoto Kouhei	4. 巻 298
2. 論文標題 Antibody recognition of complement factor H reveals a flexible loop involved in atypical hemolytic uremic syndrome pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101962 ~ 101962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Insausti Sara, Garcia-Porrás Miguel, Torralba Johana, Morillo Izaskun, Ramos-Caballero Ander, de la Arada Igor, Apellaniz Beatriz, Caaveiro Jose M. M., Carravilla Pablo, Eggeling Christian, Rujas Edurne, Nieva Jose L.	4. 巻 23
2. 論文標題 Functional Delineation of a Protein-Membrane Interaction Hotspot Site on the HIV-1 Neutralizing Antibody 10E8	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10767 ~ 10767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Torralba Johana, de la Arada Igor, Partida-Hanon Angelica, Rujas Edurne, Arribas Madalen, Insausti Sara, Valotteau Claire, Valle Javier, Andreu David, Caaveiro Jose M. M., Jimenez Maria Angeles, Apellaniz Beatriz, Redondo-Morata Lorena, Nieva Jose L.	4. 巻 5
2. 論文標題 Molecular recognition of a membrane-anchored HIV-1 pan-neutralizing epitope	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04219-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kinoshita Seisho, Nakakido Makoto, Mori Chinatsu, Kuroda Daisuke, Caaveiro Jose M.M., Tsumoto Kouhei	4. 巻 31
2. 論文標題 Molecular basis for thermal stability and affinity in a VHH: Contribution of the framework region and its influence in the conformation of the CDR3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高橋 大輔 (Takahashi Daisuke) (70791523)	九州大学・薬学研究院・講師 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------