

Title	Production and N-glycan engineering of Varlilumab in <i>Nicotiana benthamiana</i>
Author(s)	Nguyen, Kim Dua
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96024
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

Abstract of Thesis

Name (NGUYEN KIM DUA)	
Title	Production and <i>N</i> -glycan engineering of Varlilumab in <i>Nicotiana benthamiana</i> (ニコチアナ ベンサミアナにおけるバリルマブ生産と <i>N</i> 結合型糖鎖改変)
Abstract of Thesis	
Chapter 1: General introduction	
<p><i>Nicotiana benthamiana</i> has been selected as a host for production of recombinant proteins with many advantages, including the low cost of cultivation, scalability, having post-translational modifications, and no risk of contamination by animal pathogens. <i>N. benthamiana</i> plants grown in hydroponic system offer more benefits, because this system grows plants in nutrient conditions with controlled environment and free from soil-borne diseases which qualifies the current good manufacturing practice (cGMP) regulations. Hydroponic system was recently employed for transient production of two SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in <i>N. benthamiana</i> plants. Therefore, the merits of hydroponic-based <i>N. benthamiana</i> in producing recombinant proteins such as antibodies should be extensively investigated. However, plant-produced antibodies do not have β1,4-linked galactose (Gal) residues on their <i>N</i>-glycan profile due to their lack of β1,4-galactosyltransferase (GALT). The effect of β1,4-galactosylation in antibodies is particularly interesting, because the β1,4-Gal moiety reduces the conformational entropy of CH2, thus facilitating the binding of Fc domain to Fc receptors, such as FcγRIIIa. Therefore, introducing mammalian β1,4-GALT to plants is a necessary step to achieve β1,4-Gal residues. Varlilumab, a human IgG1 monoclonal antibody that targets CD27, was transiently produced in both soil-grown and hydroponic-grown <i>N. benthamiana</i> plants. The productivity, <i>N</i>-glycan compositions and efforts to obtain β1,4-galactosylated Varlilumab have been discussed in this study.</p>	
Chapter 2: Production of Varlilumab in <i>N. benthamiana</i>	
<p>To combine advantages of <i>Agrobacterium</i>-mediated transient expression and hydroponic cultivation systems, Varlilumab was transiently produced in this chapter. The highest antibody production was observed at 8 days post infiltration (dpi) (54 ± 4 μg/g of fresh weight), and co-expression with p19 increased the levels of accumulated antibodies by 3.2-fold (174 ± 5 μg/g of fresh weight) in soil-grown plants. Surprisingly, the expression of Varlilumab in hydroponic-based <i>N. benthamiana</i> reached 618 ± 50 μg/gram of fresh weight, 3.5-fold higher than the expression in soil-based <i>N. benthamiana</i> under cultivation conditions used in this study. Both soil- and hydroponic-derived Varlilumab showed human CD27-binding affinity similar to that of commercial Chinese hamster ovary (CHO)-derived Varlilumab. The <i>N</i>-glycan analysis of the soil-based and hydroponic-based Varlilumab revealed high levels of β1,2-xylosylated and α1,3-fucosylated <i>N</i>-glycan variants, accounting for 72.3 and 76.8% of the total profile, respectively. The GlcNAc2Man3XylFuc was also a predominant structure, accounting for 54.5 and 58.5% of the profile in soil- and hydroponic-based Varlilumab, respectively. The Lewis a (Le^a) structure was not observed in the un-modified setups of either soil- or hydroponic-grown <i>N. benthamiana</i> plants. The results indicated that both soil- and hydroponic-grown Varlilumab were successfully produced as functional antibodies in <i>N. benthamiana</i>.</p>	
Chapter 3: Co-expression of Varlilumab with β 1,4-GALT and β 1,3-GALT in <i>N. benthamiana</i>	
<p>Varlilumab produced in wild-type <i>N. benthamiana</i> lacked the terminal Gal residues in its <i>N</i>-glycan. To fine-tune recombinant antibodies produced in plant platforms, Varlilumab was co-expressed with murine β1,4-GALT to modify plant <i>N</i>-glycans with β1,4-linked Gal residue(s). Varlilumab co-</p>	

expressed with murine β 1,4-GALT in soil-grown *N. benthamiana* had 42.5% of *N*-glycans variants having Gal residues at the non-reducing terminus and 55.3% of that in hydroponic-grown *N. benthamiana* plants. However, all β 1,4-galactosylated *N*-glycans had single Gal residue and hybrid structure (GalM5) which was partially processed and aberrant. This result suggested that murine β 1,4-GALT might localize in the medial-Golgi of *N. benthamiana*. β 1,3-GALT participates in the formation of Lea structure in plants and its subcellular localization is predicted to be in the trans-Golgi compartments. Concomitantly, Varlilumab was also co-expressed with *Arabidopsis thaliana* β 1,3-GALT to improve galactosylation. *N*-glycan profile analysis of Varlilumab co-expressed with *A. thaliana* β 1,3-GALT demonstrated that there was an increased efficiency of galactosylation and an enhancement in the formation of Lea structure in plant-produced antibodies. This result suggested that *A. thaliana* β 1,3-GALT had an optimal localization in the trans-Golgi compartments of *N. benthamiana*. The co-expression of Varlilumab with each of GALTs successfully resulted in modification of *N*-glycan structures on the plant-produced Varlilumab.

Chapter 4: Improving β 1,4-galactosylation by chimeric β 1,4-GALTs

However, the reactions in the *N*-glycosylation pathway are carried out in a sequential and stepwise manner, which implies that one reaction might either be a precursor for the next one or prevent it from occurring. Modifying *N*-glycan of plant-produced antibodies with mammalian β 1,4-GALT expression may encounter difficulties due to potential interaction with the endogenous glycan processing enzymes and synthesize unusual and incompletely processed glycans. Therefore, the expression and targeting of heterologous β 1,4-GALT to the correct subcellular localization of the host is of utmost importance. Both murine β 1,4-GALT and *A. thaliana* β 1,3-GALT belong to type II transmembrane proteins which have a short cytoplasmic tail (C), a transmembrane domain (T), a stem (S), and a catalytic domain. The CTS region is responsible for targeting the enzyme to the correct compartments and sub-compartments in the Golgi apparatus. From the results in chapter 3, the activity of murine β 1,4-GALT in *N. benthamiana* can be improved by swapping the CTS domain with *A. thaliana* β 1,3-GALT. Therefore, five chimeric β 1,4-GALTs were constructed based on functional domains of β 1,3-GALT and co-expressed with Varlilumab and their activities were compared. The co-expression of Varlilumab with each of chimeric β 1,4-GALTs successfully resulted in modification of *N*-glycan structures on the plant-produced IgG. Co-expression of Varlilumab with chimeric constructs 1, 2 and 3 resulted in 4.4, 5.7 and 10.3% of bi-antennary β 1,4-galactosylated Varlilumab, respectively. Interestingly, chimeric constructs 4 and 5 containing galactoside binding domain of *A. thaliana* β 1,3-GALT did not show any β 1,4-galactosylated *N*-glycan structures in these co-expressions.

Chapter 5: Conclusions and perspectives

Plant-produced Varlilumab was successfully produced and purified as a functional IgG in hydroponic-grown *N. benthamiana* plants with rapid and high expression level of antibodies under cultivation conditions used in this study. For *N*-glycan engineering, the advantages of Agrobacterium-mediated transient expression system and using chimeric β 1,4-GALTs were combined to modify *N*-glycan profiles of Varlilumab. With this combination, plant-produced Varlilumab was not only rapidly produced with large amount of antibodies but also successfully obtained β 1,4-galactosylated *N*-glycans within 8 dpi. Among five chimeric β 1,4-GALTs, co-expression of Varlilumab with chimeric 3 was the most suitable for the production of Varlilumab with bi-antennary β 1,4-galactosylated *N*-glycans. Recombinant antibodies with β 1,4-galactosylated *N*-glycans are expected to have enhanced effector functions and improved therapeutic effects. Therefore, more detailed studies to validate the functions of Gal terminals in the structural and functional aspects of plant-produced antibodies are warranted. The results of this study highlight the feasibility of employing chimeric β 1,4-GALTs and transient expression for the production and *N*-glycan engineering of recombinant proteins which required β 1,4-Gal residues, such as antibodies.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (NGUYEN KIM DUA)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	大政 健

論文審査の結果の要旨

第 1 章 緒論

ニコチアナ・ベンタミアナ植物（以下、ベンサミアナ植物）は、低コストでの栽培、拡張性と翻訳後修飾が有り、動物病原体による汚染のリスクがないなど、多くの利点を持つため、組換えタンパク質の生産用の宿主として選択されている。水耕栽培システムで栽培されたベンサミアナ植物は、さらに多くの利点がある。このシステムは、現在の「医薬品の製造管理及び品質管理の基準（cGMP）」規制の対象となる、制御された環境を備えた栄養条件で植物を栽培し、土壌伝染性の植物を栽培できる。最近、ベンサミアナ植物で 2 種類の SARS-CoV-2 中和抗体を一過性生産するために水耕栽培システムが使用された。したがって、抗体などの組換えタンパク質の生産におけるベンサミアナ植物の水耕栽培によるメリットについて徹底的に調査する必要がある。しかし、植物には β 1,4-ガラクトース転移酵素(GALT)が欠如しているため、植物で生産される組換え糖タンパク質の N-結合型糖鎖には β 1,4-結合したガラクトース(Gal)残基がない。 β 1,4-Gal 部分は CH2 の立体構造エントロピーを減少させ、Fc γ RIIIa などの Fc 受容体への Fc ドメインの結合を促進するため、抗体における β 1,4-Gal 化の効果は特に興味深い。したがって、哺乳動物の β 1,4-GALT を植物に導入することは、 β 1,4-Gal 残基を得るために必要なステップである。

本論文では、CD27 を標的とするヒト IgG1 モノクローナル抗体であるバリルマブ(Varlilumab)を、土壌栽培および水耕栽培のベンサミアナ植物のそれぞれで一過的に生産させ、一過性発現による生産性、N-結合糖鎖組成、 β 1,4-Gal 化バリルマブを得るための取組みについて議論している。

第 2 章 ベンサミアナ植物におけるバリルマブの生産

アグロバクテリウムを介した一過性発現と水耕栽培システムの両方の利点を組み合わせるために、この章ではバリルマブを一過的に生産した。土壌栽培植物において、最高の抗体生産は浸潤後 8 日 (dpi) で観察でき ($54 \pm 4 \mu\text{g/g}$ 新鮮体重)、p19 との共発現により蓄積抗体レベルが 3.2 倍増加している ($174 \pm 5 \mu\text{g/g}$ 新鮮体重)。驚くべきことに、水耕栽培ベンサミアナ植物由来バリルマブの発現は $618 \pm 50 \mu\text{g/g}$ 新鮮体重に達し、土壌栽培ベンサミアナ植物における発現よりも 3.5 倍高い。土壌栽培および水耕栽培に由来するバリルマブは両方とも、市販のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 由来のバリルマブと同様のヒト CD27 結合親和性を示している。土壌栽培および水耕栽培のバリルマブの N-結合糖鎖分析により、それぞれの抗体には高レベルの β 1,2-キシロース (Xyl) および α 1,3-フコース (Fuc) が保持する N-結合糖鎖が付加されていることが明らかになり、それぞれ全体の 72.3% と 76.8% を占めている。GlcNAc2Man3XylFuc (GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; Man, マンノース) が主要な構造であり、土壌栽培および水耕栽培のバリルマブのプロファイルのそれぞれ 54.5% と 58.5% を占めている。ルイス a (Le^a) 構造は、土壌栽培または水耕栽培で栽培したベンサミアナ植物では観察されていない。結果は、土壌栽培と水耕栽培の両方のバリルマブがベンサミアナ植物において機能性抗体として生産できたことを示している。

第 3 章 ベンサミアナ植物におけるバリルマブと β 1,4-GALT and β 1,3-GALT の共発現

野生型ベンサミアナ植物で生産したバルリルマブは、そのN-結合糖鎖の末端 Gal 残基を欠いている。植物プラットフォームで生成される組換え抗体を微調整するために、バルリルマブをマウス $\beta 1, 4$ -GALT ($m\beta 1, 4$ -GALT) と共発現させてN-結合糖鎖を修飾し、植物で $\beta 1, 4$ 結合 Gal 残基を保持させている。土壌栽培のベンサミアナ植物で $m\beta 1, 4$ -GALT と共発現したバルリルマブは、非還元末端に Gal 残基を有する N-結合糖鎖変異体を 42.5%有し、水耕栽培のベンサミアナ植物では 55.3%を有している。しかし、同定された $\beta 1, 4$ -Gal 化 N-結合糖鎖は単一の Gal 残基と、部分的にプロセシングされた異常なハイブリッド構造 (GalGlcNAc3Man5) である。この結果は、 $m\beta 1, 4$ -GALT がベンサミアナ植物のメディアール - ゴルジに局在する可能性を示唆する。

$\beta 1, 3$ -GALT は植物の Le^a 構造の形成に関与しており、その細胞内局在はトランス - ゴルジ体にあると予測される。同時に、Gal 化を改善するため、バルリルマブもシロイヌナズナ $\beta 1, 3$ -GALT (At $\beta 1, 3$ -GALT) と共発現させている。シロイヌナズナ $\beta 1, 3$ -GALT と共発現させたバルリルマブの N-結合糖鎖分析により、植物生産抗体における Gal 化の効率が向上し、Le^a 構造形成が促進されることを示している。この結果は、At $\beta 1, 3$ -GALT が ベンサミアナ植物のトランス - ゴルジ体に最適に局在していることを示唆している。バルリルマブと各 GALT の共発現により、植物生産バルリルマブ上の N-結合糖鎖構造の修飾に成功している。

第4章 キメラ $\beta 1, 4$ -GALT による $\beta 1, 4$ -Gal 化の改善

N-結合糖鎖修飾経路の反応は連続的かつ段階的に行われ、これは、ある反応産物が次の反応の前駆体となるか、その反応の進行を妨げる可能性があることを意味している。哺乳類の $\beta 1, 4$ -GALT 発現を用いて植物が生成する抗体の N-結合糖鎖を修飾する場合、内在性糖鎖プロセシング酵素との潜在的な相互作用により、異常で不完全にプロセシングされた糖鎖が合成される可能性がある。したがって、異種 $\beta 1, 4$ -GALT を発現させ、宿主の細胞内局在を適切にした $\beta 1, 4$ -GALT を発現させることが重要である。

$m\beta 1, 4$ -GALT と At $\beta 1, 3$ -GALT は両方とも、短い細胞質尾部 (C)、膜貫通ドメイン (T)、ステム (S)、および触媒ドメインを有する II 型膜貫通タンパク質に属する。CTS 領域は、酵素をゴルジ体の正しい画分に局在化させる役割を果たす。第3章の結果から、ベンサミアナ植物における $m\beta 1, 4$ -GALT の活性は、CTS ドメインを At $\beta 1, 3$ -GALT と交換することによって改善が期待できる。したがって、 $\beta 1, 3$ -GALT の機能ドメインに基づき5つのキメラ $\beta 1, 4$ -GALT を構築し、バルリルマブと共発現させ、それらの活性を比較した。バルリルマブとキメラ $\beta 1, 4$ -GALT のそれぞれを共発現させた結果、植物生産 IgG 上の N-結合糖鎖構造が修飾されることに成功している。バルリルマブとキメラ構築物 1、2 および 3 との共発現により、それぞれ 4.4、5.7 および 10.3% の二分岐 $\beta 1, 4$ -Gal 化バルリルマブを得ている。興味深いことに、At $\beta 1, 3$ -GALT の Gal 結合ドメインを含むキメラ構築物 4 および 5 は、これらの共発現において $\beta 1, 4$ -Gal 化 N-結合糖鎖を保持していない。

第5章 本論文における総括と展開

植物生産バルリルマブは、制御された環境下で水耕栽培された ベンサミアナ植物において機能性抗体として生産および精製され、迅速かつ高レベルの抗体として発現できている。N-結合糖鎖エンジニアリングの場合、アグロバクテリウムを介した一過性発現システムとキメラ $\beta 1, 4$ -GALT の使用の利点を組み合わせていることで、Varlilumab の N-結合糖鎖プロファイルを改変している。この組み合わせにより、植物生産バルリルマブは大量の抗体を迅速に生産されただけでなく、8 dpi 以内に $\beta 1, 4$ -ガラクトシル化 N-結合糖鎖を取得することに成功している。5 つのキメラ $\beta 1, 4$ -GALT の中で、バルリルマブとキメラ 3 の共発現は、2 本鎖 $\beta 1, 4$ -ガラクトシル化 N-結合糖鎖を含むバルリルマブの生成に最適である。 $\beta 1, 4$ -ガラクトシル化 N-結合糖鎖を含む組換え抗体は、エフェクター機能を強化し、治療効果を向上させることが期待されている。したがって、植物生産抗体の構造的および機能的側面における Gal 末端の機能を検証するためのより詳細な研究が必要となる。この研究の結果は、抗体などの $\beta 1, 4$ -Gal 残基を必要とする組換えタンパク質の生産および N-結合糖鎖修飾改変にキメラ $\beta 1, 4$ -GALT および一過性発現を使用する必要性を強調しています。

以上のように、本論文は土壌および水耕で栽培したベンサミアナ植物で抗体バルリルマブを生産している。さらに、2 本鎖 Gal 付加型糖鎖を保持する抗体を生産するため、 $\beta 1, 4$ -GALT の膜貫通領域を改変し、ゴルジ体への局在性を調整することで糖鎖構造をエンジニアリングでき、Gal 付加型糖鎖含量が増加させた抗体生産に成功している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。