Glycoforms of Human IgG in Health and Disease

健常時と病態におけるヒト IgG のグライコフォーム

Jefferis, Roy

Molecular Immunology at the University of Birmingham
Edgbaston, Birmingham B15 2TT, UK*Key Words: Antibody therapeutics, Glycosylation, IgG-Fc effector activities, IgG-Fc stability, Microcalorimetry*

Abstract

More than twenty recombinant antibody molecules are now licensed for treatment of a variety of cancers and chronic diseases. In addition there are, literally, hundreds in development and early phase clinical trials. Initially, the attraction of antibodies was their specificity for target antigens; however, it is now appreciated that the immune complexes formed trigger downstream biological activities that are critical to clinical success. It has been demonstrated that, although accounting for only 2–3% of antibody mass, glycosylation of the IgG-Fc is essential to the activation of such biologic mechanisms (effector functions). Additionally the precise structure of the attached oligosaccharide can determine protein conformation and stability and hence downstream biologic efficacy. Cellular engineering has been embraced to generate cell lines that synthesise selected homogeneous antibody glycoforms that may be optimal for a given disease indication. The advantage of being able to formulate therapeutic antibody preparations at high concentration might be aided by additional glycosylation within the IgG-Fab region. Novel production vehicles are also being developed that offer the possibility of lower production costs, with consequent lower cost of goods.

要 旨

今や 20 種類以上のリコンビナント抗体が、様々ながんや慢性疾患の治療用に認可されている。さらに、文字通り数百もの抗体が開発あるいは臨床の早期フェーズのさなかにある。当初、抗体の魅力は標的抗原への特異性にあった。しかし今や、免疫複合体の形成が臨床上の成否を決する下流の生物活性の引き金となることが広く認められている。そのような生物学的メカニズム（エフェクター機能）の活性化には、抗体の質量のわずか 2–3% にすぎない糖鎖による IgG-Fc の修飾が不可欠であることが示されている。さらに、Fc に結合している糖鎖の構造はタンパク質のコンフォメーションや安定性を決定し、それにより下流の生物学的な効力にも影響を及ぼし得るのである。ある疾患に対して最適となるような均一なグライコフォームの抗体を選択的に生産する細胞株を作り出すために細胞工学的な手法が取り入れてられてきている。治療抗体を高濃度に調製することには利点があるが、IgG-Fab 領域に新たな糖鎖修飾を行うことが、それを支援する技術となるかもしれない。また、生産コストを下げることによって低廉化をもたらし得る生産系も開発されつつある。

A. Introduction

The origin of my interest in the influence of glycosylation on the structure and functional activities of human immunoglobulin G (IgG) glycoproteins results from fortuitous collaborations with Professor Noriko Takahashi. Initial contact was made through Prof. Yoji Arata, then at the University of Tokyo, when I attended the Fifth International Congress of Immunology, held in Kyoto in 1983. I took advantage of the opportunity to contact Prof. Arata because of related interests, particularly his expertise in nuclear magnetic resonance (NMR) and the assignment of chemical shifts to individual histidine residues within the IgG-Fc. We agreed that I should submit some of our materials to his laboratory for further

A はじめに

私が、ヒト免疫グロブリン G (IgG) の構造と機能に対する糖鎖修飾の影響に興味を抱いたそもそものきっかけは高橋禮子教授と思いがけない共同研究を行ったことである。彼女との初めてのコンタクトは、1983 年に京都で行われた第 5 回免疫国際議会に参加した際に、当時東京大学の荒田洋治教授を通じて実現された。核磁気共鳴 (NMR) に造詣が深く IgG-Fc の個々のヒスチジン残基の化学シフトの帰属を行っていた荒田教授と私は興味に関連していたため、私は彼と接する好機に乗じたのだ。荒田教授のさらなる NMR 研究のために、私は彼の研究室に試料を送ることに同意した。私はまさにそれを実行したが、その後長いこと音沙汰がなかつ

NMR studies. I duly did so; however, there followed an extended period of “silence”. When a draft manuscript did arrive it reported oligosaccharide profiles for the proteins we had supplied but no NMR data. As a prelude to NMR structural studies the oligosaccharide profiles had been determined by Noriko Takahashi. This led to the first of 16 joint publications, dating from 1987–2007.

Following this first collaboration we agreed a programme of joint studies and I obtained funding to spend 6 weeks in Japan, mostly in the laboratory of Yoji Arata but also one week in Nagoya to gain experience of the analytical protocol that Noriko had developed. On my return we prepared a panel of monoclonal human IgG subclass proteins, isolated from the sera of patients with multiple myeloma, a cancer of plasma cells, for comparative oligosaccharide analysis. The data generated, the most complete available at that time, showed that whilst the oligosaccharides present were the same as for normal serum derived IgG the relative proportions of each was characteristic for each individual protein, i.e., each neoplastic clone of plasma cells (1). We experienced some difficulty in obtaining acceptance of our manuscript for publication and received persistent but essentially trivial criticisms; however, the eventual publication proved definitive and signaled the entry of my laboratory into the field of glycobiology.

B. Human IgG

The human immune system is comprised of cellular and humoral components; the latter being antibodies present in blood (one of the four humours of Greek medicine) and other body fluids. We now define five classes of antibody and within the IgG and IgA classes four and two subclasses, respectively. Collectively they constitute nine isotypes that are products of different germline genes. In humans the IgG antibody class predominates in blood and equilibrates with the extra-vascular space; an essential property to deliver appropriate pharmacokinetics and pharmacodynamics. Within a natural immune response the pathogen/IgG immune complexes that are formed have potential to activate a wide range of effector functions, resulting in the removal and destruction of the complex. The four subclasses of human IgG are defined and enumerated according to their relative concentrations in normal serum; thus, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 account for ~60%, 25%, 10% and 5%, respectively. Each IgG subclass exhibits a unique profile of effector functions when evaluated by *in vitro* assays (2–7). To date all recombinant monoclonal antibodies approved as therapeutics seek to exploit the structural and functional characteristics of the human IgG class.

た。論文の草稿が届いたとき、そこにはNMRデータは無く、かわりに私たちが送ったタンパク質の糖鎖プロファイリングが記載されていた。NMRによる構造研究の前奏として、糖鎖プロファイリングが高橋禮子によって行われていたのだった。これが、1987年から2007年にわたって公表された16報の共著論文の先駆けであった。

この最初の共同研究に引き続いて、私たちは一連の共同研究を遂行することに同意し、私は日本で6週間過ごすための研究費を獲得することができた。その大部分を荒田洋治研究室で過ごしたが、1週間は名古屋に赴き、禮子が開発した糖鎖分析のプロトコルを学ぶ経験を得た。帰国後、私たちは、糖鎖の比較分析のために、プラズマ細胞のがんである多発性骨髄腫の患者血清から単離したヒトモノクローナルIgGの一連のサブクラスを用意した。得られたデータはその当時としては最大限に完成されたものであり、健康人の血清由来のIgGと同じ糖鎖から構成されてこそいるものの、それらの割合は個々のタンパク質ごとに、言い換えれば形質細胞のがん性のクローンごとに固有のものであった。この論文の公表に対しては、本質的に取るに足りない批判を執拗に受け、なかなか受理されないという憂き目をみた。結局、最終的に公表された論文は世に認められ、私たちの研究室は糖鎖生物学の分野に仲間入りしたのであった。

B. ヒト IgG

ヒトの免疫システムは細胞性と体液性の成分から構成されている。後者は血液（ギリシアの医学の4つの体液のうちの1つ）及び他の体液中に存在する抗体にあたる。現在では抗体は5種類に大別されており、さらにIgGには4種類、IgAには2種類のサブクラスが存在する。つまり、抗体は異なる生殖系列遺伝子に担われている9種類のアイソタイプが存在することになる。ヒトではIgGが血液中の抗体の大部分を占めており、血管外部の体液と均衡を保っている。この特性は適切な薬物動態学的・薬物動力学的性質を担う送達を実現するうえで不可欠である。通常免疫応答において、病原体とIgGの間で形成された免疫複合体は広範なエフェクター機能を活性化する性質を潜在的に有しており、その結果としてそれらの複合体は除去・破壊される。ヒトIgGには4つのサブクラスが存在し、正常な血清中の相対的な濃度は、IgG1（～60%）、IgG2（～25%）、IgG3（～10%）、IgG4（～5%）の順である。*In vitro* アッセイに基づいて、それぞれのIgGのサブクラスはエフェクター機能に関して独特なプロファイル示すことが分かっている（2–7）。今日までに治療薬として認可されているリコンビナントモノクローナル抗体はいずれも、ヒトIgGクラスの構造的・機能的な特徴を活用しようとはかられ

Fig. 1. α -carbon backbone structure of the IgG molecule. Exposure to papain cleaves the hinge region to release Fab & Fc fragments

In its simplest form an individual IgG molecule is composed of two identical light chains and two identical heavy chains comprised of repeating structural motifs (homology regions). The tertiary structure of each homology region defines the immunoglobulin fold or domain (2-4). Domains of the light and heavy chains pair in covalent and non-covalent association to form three independent protein moieties connected thorough a flexible linker (the hinge region) (see Fig. 1). Two of these moieties, referred to as Fab regions, are of identical structure and each expresses a specific antigen-binding site; the third, the Fc, expresses interaction sites for ligands that activate clearance and transport mechanisms. These effector ligands include three structurally homologous cellular Fc receptor types (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII), the C1q component of complement and the neonatal Fc receptor (FcRn) (8-12); the latter determines the catabolic half-life, transport into extra-vascular space and passage across the placenta; the newborn human infant is not immuno-competent and is protected by maternal IgG antibody during the first 6-9 months of life. Activation of Fc receptors and the C1q component of complement initiate inflammatory cascades that combat and resolve episodes of infection. These activities are critically dependent on IgG-Fc N-linked glycosylation and, vary between different antibody glycoforms present in normal polyclonal IgG (13-15). By contrast binding to FcRn, and hence the catabolic half-life, is not dependent on antibody glycoform (3).

ている。

最も単純に表せば、IgG 分子は構造モチーフ（相同領域）の繰り返しからなる 2 本の同一な軽鎖と 2 本の同一な重鎖により構成されている。相同性のあるそれぞれの領域の 3 次構造は免疫グロブリンフォールドあるいはドメインをかたちづけている (2-4)。重鎖と軽鎖のドメインは共有結合および非共有結合による会合を通じて組み合わせられており、柔軟性のあるリンカー（ヒンジ領域）を介して連結された 3 つの独立したパーツを形成している（図 1 を参照）。Fab 領域と呼ばれる 2 つのパーツは同一の構造をしており、特異的な抗原結合を担っている。残る 1 つのパーツは Fc とよばれ、クリアランスや輸送の機構を活性化するリガンドとの相互作用部位を有している (8-12)。こうしたエフェクターリガンドの中には、類似した立体構造をもつ細胞の Fc レセプター（Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII）、補体成分 C1q、新生児の Fc レセプター（FcRn）などが含まれている。FcRn は、IgG の分解の半減期、血管外への輸送、胎盤の通過などに関与している。IgG が胎盤を通過するのは、新生児に免疫機能がなく、生後 6-9 カ月は母体由来の IgG 抗体によって保護されているためである。Fc レセプターと補体成分 C1q の活性化により、感染の発病を抑えるような炎症反応のカスケードが引き起こされる。これらの活性は IgG-Fc 上の N 型糖鎖に強く依存しており、通常のポリクローナル IgG の中に存在する異なるグライコフォームの間で変動がみられる (13-15)。逆に、FcRn の結合お

The IgG-Fc region is a homodimer comprised of covalent inter-heavy chain disulphide-bonded hinge regions and non-covalently paired C_H3 domains; the C_H2 domains are glycosylated through covalent attachment of an oligosaccharide at asparagine 297 (Asn-297). X-ray crystallographic analysis reveals a discreet structure for the oligosaccharide that forms multiple non-covalent interactions with the inner protein surface of the C_H2 domain (3,16,17). There is cumulative evidence that interaction sites on IgG-Fc for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and C1q effector ligands are comprised principally of the protein moiety, however, generation of the interaction sites for these ligands is dependent on IgG-Fc protein/oligosaccharide interactions. Thus, effector mechanisms mediated through FcγRI, FcγRII, FcγRIII and C1q are severely compromised or ablated for aglycosylated or deglycosylated forms of IgG (4,9-13).

C. Glycoform profiles of normal serum derived IgG, in health and disease

The oligosaccharides present in the IgG-Fc of normal polyclonal IgG, attached at Asn 297, are of the complex diantennary type and comprised of a core heptasaccharide with variable addition of fucose, galactose, bisecting N-acetylglucosamine and sialic acid; sialylation is modest with <10% of structures being monosialylated or disialylated (4,17-20). The relative yields and structure of the neutral oligosaccharides released from normal IgG-Fc are shown in Figs. 2 & 3, respectively. Each heavy chain may bear one of a total of 32 unique oligosaccharides and random pairing of heavy chain glycoforms could generate >500 glycoforms. Given the paucity of sialylation neutral oligosaccharides predominate but they alone allow for the generation of 128 unique glycoforms; the possible number of combinations (16×16) is divided by 2 to account for the symmetry of the molecule. A shorthand system of nomenclature for the oligosaccharides are G0 (zero galactose), G1 and G2 for oligosaccharides bearing one or two galactose residues, respectively, and G0F, G1F and G2F when fucose is present; when bisecting N-acetylglucosamine is present a B is added, e.g. G0B, G0BF etc. The glycoform of the whole molecule reflects the oligosaccharides present on each heavy chain and may be represented as (G0/G0), (G0/G0F), (G0F/G0F), (G0/G1), (G0F/G1) etc. It is important to emphasise that these data were obtained by analysis of total polyclonal IgG that may be comprised of the product of thousands of individual plasma cell clones. Therefore, it was important to determine whether this oligosaccharide profile is characteristic for each individual

よびそれによる IgG の分解半減期の遅延は、抗体の糖鎖構造に依存しない(3)。

IgG の Fc 領域は、ヒンジ領域における重鎖間ジスルフィド結合と C_H3 ドメイン同士の非共有結合によって形成されたホモ2量体である。C_H2 ドメインはアスパラギン 297 番 (Asn-297) に糖鎖が共有結合で連結することによって修飾されている。X線結晶構造解析により糖鎖の立体構造が明らかにされており、糖鎖が C_H2 領域間の内壁表面と多くの非共有結合により相互作用していることが示されている (3,16,17)。IgG-Fc 上における FcγRI, FcγRII, FcγRIII および補体成分 C1q の相互作用部位は、主にタンパク質部分で構成されているという報告が数多くなされているが、これらのリガンドの相互作用部位は IgG-Fc 上のタンパク質と糖鎖の相互作用に依存して構築されている。したがって、FcγRI, FcγRII, FcγRIII および補体成分 C1q が介するエフェクター機構は、IgG の糖鎖が失われると顕著に減弱または消失してしまう(4,9-13)。

C. 健常時および病態における血清由来 IgG の糖鎖プロファイル

ポリクローナル IgG の Fc 領域のアスパラギン 297 番に結合している糖鎖は通常、2 本鎖複合型糖鎖であり、5 糖からなるコア構造に、フコース、ガラクトース、バイセクティング N-アセチルグルコサミン、シアル酸などが結合していたりしていなかったりという多様な構造をしている。糖鎖の約 10% 未満がシアリル化されており、モノシアリル化、ダイシアリル化糖鎖として存在している(4,17-20)。健常人の IgG-Fc から遊離した中性糖鎖の相対量と構造をそれぞれ図 2 と図 3 に示す。各重鎖には合計 32 種類のとり得る糖鎖構造の 1 つが発現しており、重鎖の無作為な組み合わせにより IgG 分子として 500 種類を超えるグライコフォームが生み出されることになる。シアリル化の割合は少ないため、大部分が中性糖鎖と考えても、IgG として 128 種類のグライコフォームが存在する。これは中性糖鎖の組み合わせ (16×16) の数を、分子の対称性を考慮したうえで 2 で割った数である。糖鎖の略号として、ガラクトースを含まない糖鎖を G0、1 つ含むものを G1、2 つ含むものを G2 とし、さらにフコースが存在する場合、G0F, G1F, G2F と表す。またバイセクティング N-アセチルグルコサミンが結合している場合は B、を加えて G0B, G0BF などと表記する。IgG 分子全体としての糖鎖構造は、(G0/G0), (G0/G0F), (G0F/G0F), (G0/G1), (G0F/G1) というように各重鎖上の糖鎖を使って表すことができよう。こうしたデータは全ポリクローナル IgG の分析により得られたものであり、それらは莫大な種類のプラズマ細胞クローンの所産であるかもしれないということを強調したい。それゆえ、

Fig. 2. An HPLC profile of the neutral complex diantennary oligosaccharide structures released from normal human IgG-Fc.

Fig. 3. Neutral oligosaccharides present in normal serum IgG-Fc

antibody population present or whether it represents the aggregate of thousands of individual clones each bearing a unique array of oligosaccharides.

This question was resolved by analysis of a panel of monoclonal IgG proteins, isolated from the sera of patients with IgG multiple myeloma (1); a cancer in which

こうした糖鎖プロファイルがそれぞれの抗体集団の特徴を反映しているものであるのか、それともそれぞれユニークな一群の糖鎖構造を発現している多種類のクローンの総計を反映しているのかを決めることは重要である。

この疑問は、IgG 多発性骨髄腫（単一の IgG を産生する

a single IgG producing plasma cell becomes neoplastic and secretes a paraprotein. This study showed that each IgG paraprotein yielded an individual IgG-Fc oligosaccharide profile and wide variations in the content of fucose, bisecting N-acetylglucosamine and galactose were observed between paraproteins. In addition, subtle variations between the IgG subclasses were observed for the addition of galactose to $\alpha(1-3)$ or $\alpha(1-6)$ arms. There was a preference for addition to the $\alpha(1-6)$ arm for IgG1 and IgG4 and to the $\alpha(1-3)$ arm for IgG2; the arm preference for IgG3 paraproteins varied between allotype related sequences. These data suggest that a minor glycoform detected within normal polyclonal IgG-Fc may be the predominant glycoform present within a specific antibody population. This prediction appears to have been validated from analysis of glycopeptides released from IgG autoantibodies to platelet antigens (21).

The glycoform profile of normal polyclonal IgG is subject to variation with age, over the term of pregnancy and for a number of inflammatory conditions (4,17-20,22,23). The major change reported is the extent of galactosylation, usually reported as the % [G0 + G0F + G0BF] oligosaccharides released. Thus, the levels of [G0 + G0F + G0BF] reported for the elderly exceeds that reported for adults between 20 and 50 years of age (22). The level of [G0 + G0F + G0BF] decreases from the third trimester of pregnancy and increases again following parturition (23); it is tempting to associate the consequent increase in galactosylation with FcRn mediated passage of maternal IgG to the foetus, via the placenta and umbilical cord.

Increased levels of [G0 + G0F + G0BF] are reported in a number of inflammatory diseases that have an autoimmune component, e.g. rheumatoid arthritis, vasculitis, coeliac disease etc (24-27). The initial finding of increased agalactosyl oligosaccharides in IgG isolated from the sera of patients with rheumatoid arthritis led to a proposal that IgG molecules devoid of galactose on both heavy chains may constitute “altered self” and be the autoantigen that provokes the production of the autoantibody rheumatoid factor (24,25). Subsequent findings of elevated levels of agalactosylated IgG-Fc in other inflammatory diseases, not associated with the presence of rheumatoid factor, demonstrate that it does not equate to the aetiology of disease but may represent “acute phase reactants” that reflect inflammation and may contribute to an exacerbation of inflammation (26,27).

We have observed the most extreme examples of hypogalactosylation for IgG isolated from the sera of patients with Wegner’s granulomatosis or microscopic polyangiitis (26). These data were obtained for the total IgG-Fc oligosaccharides, not the autoantibodies, and sug-

プラズマ細胞が新生物化して異常タンパク質を分泌するようになったがん)の患者の血清から単離した一連のモノクローナル IgG の糖鎖分析を行うことで解決された(1)。この研究により、異常 IgG はそれぞれ異なる糖鎖発現パターンを示していることが明らかとなった。異常タンパクの中で、フコース、バイセクティングの N-アセチルグルコサミン、ガラクトースの割合が幅広く変化していた。さらに IgG サブクラスの間で、 $\alpha(1-3)$ または $\alpha(1-6)$ 枝に対するガラクトースの付加にわずかながら違いが見られた。IgG1 と IgG4 は (1-6) 枝に、IgG2 は (1-3) 枝にガラクトースが付加されている傾向が見られた。IgG3 に関しては、アロタイプに関連したアミノ酸配列によって、いずれの枝が優先されるかに違いが見られた。これにより、通常のポリクローナル IgG-Fc のプロファイルにおいて検出されるマイナーな糖鎖構造は、ある特別な抗体の集団の中では主要なものであり得るということが示唆された。この予想は血小板抗原に対する自己抗体から由来された糖ペプチドの分析によっても確認されている(21)。

健康人のポリクローナル IgG の糖鎖構造プロファイルは年齢、妊娠、多くの炎症疾患によって変化する(4,17-20,22,23)。最も大きく変化するのはガラクトシル化の度合いであり、通常は、遊離した糖鎖のうちの G0, G0F, G0BF の割合の合計 [G0 + G0F + G0BF] (%) で報告される。したがって、高齢者の [G0 + G0F + G0BF] レベルは、20~50 歳の成人について報告されている値を超えている(22)。妊娠第 3 期に入ると [G0 + G0F + G0BF] レベルは減少し、出産すると再び増加する(23)。こうなると、IgG のガラクトシル化が結果的に増大することと、FcRn が胎盤や臍帯を介して母親の IgG を胎児に移行することとの間に何か関連があると思わずにはいられない。

[G0 + G0F + G0BF] レベルが増加することは、慢性間接リウマチ、血管炎、セリアック病などの自己免疫性の因子を伴う多くの炎症性疾患について報告されている(24-27)。IgG の非ガラクトシル化糖鎖の増大は慢性間接リウマチ患者の血清から単離された IgG において初めて見出された。これにより、両重鎖からガラクトースが欠如した IgG は“変化した自己”を構成しており、それが自己抗原として自己抗体であるリウマチ因子の産生を促しているのかもしれないという仮説が導かれた(24,25)。その後、リウマチ因子の存在と無関係な他の炎症性疾患においても非ガラクトシル化した IgG-Fc の増大が見出された。このことは、ガラクトースのない IgG は病気の原因とは言えないが、炎症を反映し、その増悪に寄与するかもしれない“急性期の反応物”であるという可能性を示している(26,27)。

我々はこれまでに、低ガラクトシル化の最も極端な例と

gests that some “factor(s)” are acting to modulate the glycosylation machinery of the Golgi apparatus in a majority of plasma cells.

D. Glycoform profiles of recombinant IgG produced in non-human mammalian cells

The advent of monoclonal antibodies, produced initially by mouse hybridomas, *in vivo*, and subsequently as recombinant proteins in Chinese hamster ovary (CHO) or mouse NS0 and Sp2/0 cells, *in vitro*, led us, and others, to analyse their IgG-Fc glycoform profiles. In each case the dominant oligosaccharide present was G0F, with small amounts of G1F and G2F; also present were small quantities of non-fucosylated human type oligosaccharides (28). These cells do not add bisecting N-acetylglucosamine residues. Thus, the predominant glycoforms produced are similar to the hypogalactosylated forms reported for IgG-Fc isolated from the sera of patients with inflammatory autoimmune diseases. In the absence of galactose residues the terminal sugar is N-acetylglucosamine; a sugar residue that may be bound by the naturally occurring human lectins mannose binding ligand (MBL), present in blood, and the mannose receptor (MR), present on the surface of leucocytes and reticular endothelial cells (4). Binding to these lectins can result in activation of the complement cascade and/or internalisation, degradation, processing and possible antigen presentation. It should be emphasised that these lectins are pattern recognition receptors and may only be activated by specific arrays of the sugar residues. However, a recent example of clearance through the MR has been reported for the licensed IgG-Fc fusion protein Lenercept (29,30). The production cell lines may also add oligosaccharides not reported for human IgG and/or oligosaccharides not known to be present in any human glycoprotein.

The paucity of galactosylation and sialylation of IgG-Fc may reflect its intimate integration within the protein structure with consequent limited access to glycosyltransferases. The balance between structure and accessibility is graphically illustrated for a panel of IgG-Fcs in which amino acid residues contributing to contacts with the oligosaccharide were replaced, sequentially, by alanine (31). In each case replacement of a single contact residue resulted in the production of hypergalactosylated and highly sialylated glycoforms. This again demonstrated that hypogalactosylation and pauci-sialylation are not due to deficits in the processing machinery of the Golgi ap-

して、ウェゲナー肉芽腫症あるいは微小多発性血管炎の患者血清から単離した IgG を観察している (26)。これらのデータは、自己抗体ではなく、すべての IgG-Fc が発現している糖鎖について得られたもので、“何らかの因子”が、大部分のプラズマ細胞のゴルジ装置における糖鎖生合成マシナリーに変調作用を及ぼしていることを示唆している。

D. ヒト以外の哺乳細胞で産生したリコンビナント IgG の糖鎖構造プロファイル

モノクローナル抗体の出現に導かれて、私たちは、そして他のグループも、それらの IgG-Fc の糖鎖構造の解析を実施するようになった。モノクローナル抗体は当初はマウスのハイブリドーマにより *in vivo* で産生されたが、その後、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞やマウスの NS0 細胞あるいは Sp2/0 細胞によりリコンビナント体として作られるようになった。いずれの場合も、G0F が主な糖鎖であり、G1F および G2 糖鎖は少なかった。またフコース残基が結合していないヒト型の糖鎖も少なかった (28)。これらの細胞はバイセクティング N-アセチルグルコサミンの付加を行わない。このように、生産される主要な糖鎖は、炎症性の自己免疫疾患の患者血清から単離された IgG-Fc について報告された低ガラクトシル化型と類似していた。ガラクトース残基が欠如した糖鎖において糖鎖の末端には N-アセチルグルコサミン残基が位置することになる。N-アセチルグルコサミン残基は、血液中に存在する天然のヒトレクチンであるマンノース結合レクチン (MBL) や白血球や細網内皮細胞の表面に存在するマンノースレセプター (MR) に結合する可能性がある (4)。IgG がこれらのレクチンと結合すれば、補体カスケードの活性化や、内部移行・分解・修飾・抗原提示が引き起こされ得る。これらのレクチンはパターン認識レセプターであり、糖残基が特別な並び方をしている場合にのみ活性化させ得るはずである。ところが最近、MR を介したクリアランスを利用した例として、認可された IgG-Fc 融合タンパク質である Lenercept が報告されている (29,30)。その産生細胞株はヒト IgG において報告されていない糖鎖やヒトの糖タンパク質に存在が知られていない糖鎖をも付加してしまうかもしれない。

IgG-Fc のガラクトシル化やシアリル化が乏しいことは、その構造がタンパク質の立体構造の中で緊密に構築されている結果、糖転移酵素の接近が制限されることを反映しているのかもしれない。こうした構造の構築と接近しやすさのバランス関係は、糖鎖との接触に寄与するアミノ酸残基を順次アラニンに置き換えた一連の IgG-Fc によって図式的に示すことができた (31)。いずれの場合も、1 つの接触残基を置換することで、高ガラクトシル化と高度にシアリル化されたグライコ

paratus.

E. The impact of glycosylation on structure and stability

The profound impact of aglycosylation on effector functions suggests a similarly substantial impact on structure; however, numerous parameters investigated failed to reveal structural change. Assignment of the chemical shifts in NMR for the histidine residues of IgG-Fc offered a sensitive probe for structural change as these residues are distributed throughout the IgG-Fc. A comparison of the NMR spectra of glycosylated and aglycosylated IgG-Fc revealed an altered environment for histidine 268 only (32). This histidine residue is present in the C_{H2} domain and is proximal to the lower hinge region. Subsequent studies employing comprehensive alanine replacements also suggested the hinge proximal region of the C_{H2} domain to be involved in FcγR and C1q binding. Confirmation of these indirect assignments for the location of interaction site for FcγR binding was obtained with solution of the x-ray crystal structure of an FcγRⅢ/IgG-Fc complex (33).

The impact of glycoform on stability was determined by differential scanning micro-calorimetry (DSCM) of a panel of homogeneous glycoforms of IgG-Fc with progressive truncation of the oligosaccharide (34). Removal of terminal galactose residues did not impact on the melting temperature of either the C_{H2} or C_{H3} domains; however, subsequent removal of the N-acetylglucosamine and the two arm mannose residues, generating a glycoform bearing only the GlcNAc₂Man trisaccharide, resulted in lowering of the melting temperature of the C_{H2} domain but not the C_{H3} domain. The thermodynamic parameters describing C_{H2} thermal denaturation of all IgG-Fc glycoforms was consistent with a cooperative unfolding. By comparison the unfolding of the C_{H2} domain of deglycosylated IgG1-Fc was non-cooperative, involving at least one intermediate. It was proposed that this intermediate is a partially unfolded C_{H2} domain pair possessing hinge proximal disordered/unfolded loops that may account for the compromised functional activities of deglycosylated IgG and IgG-Fc (34,35).

The (GlcNAc)₂Man trisaccharide was thus shown to confer a degree of order/structural stability on the C_{H2} domain and the generation of lower hinge conformers compatible with FcγR and C1 binding and activation. These data are consistent with x-ray crystal data obtained for the same truncated IgG-Fc glycoforms that showed progressive increases in the temperature factors for the

フォームがもたらされた。このことはまた、IgG-Fcの低ガラクトシル化や乏しいシアリル化の原因が、ゴルジの装置の糖鎖プロセッシングマシーナリーの不全によるものではないことを示すものとなった。

E. 構造および安定性への糖鎖修飾の影響

糖鎖の欠損がエフェクター機能にもたらす重要な影響が大きいことを考えると、IgGの構造に対しても同じように甚大な影響が及んでいることが示唆される。しかしながら、これまで多くのパラメーターについて探査がなされたにもかかわらず、構造変化を明らかにすることはできなかった。ヒスチジン残基はIgG-Fc全体に分布していることから、それらのNMR化学シフトを帰属することにより、構造変化を鋭敏に捕えるプローブがもたらされた。ガラクトース残基の有無についてIgG-FcのNMRスペクトルを比較したところ、ヒスチジン268番目のみについて環境の違いが明らかになった。このヒスチジン残基はC_{H2}ドメインに存在し、ヒンジの下流部分に近接している。その後の広範なアラニン置換を用いた研究により、C_{H2}ドメインのヒンジに近接した領域がFcγRとC1qの結合部位に含まれることも示唆された。こうした間接的なやり方で定められたFcγRの相互作用部位の位置は、FcγRⅢ/IgG-Fc複合体の結晶構造が解かれることにより確認されることとなった(33)。

糖鎖構造が分子の安定性に及ぼす影響は、糖鎖を段階的に切除することによって得られた均一なグライコフォームからなる一連のIgG-Fcを用いた示差走査カロリメトリー(DSCM)を用いて明らかにされた(34)。末端のガラクトース残基を除去しても、C_{H2}とC_{H3}のいずれの変性温度にも変化を与えなかった。しかしながら引き続いてN-アセチルグルコサミン残基、両枝のマノース残基を取り除いたGlcNAc₂Manの3糖構造にすると、C_{H3}の変性温度は変化しないが、C_{H2}の変性温度が低下した。全てのIgG-Fcのグライコフォームにおいて、C_{H2}ドメインの熱変性を記述する熱力学的パラメーターは、協同的なアンフォールディングを示すことで一致していた。それに比して、糖鎖を除去したIgG-FcのC_{H2}ドメインのアンフォールディングは非協同的であり、すくなくとも中間体を1つ含んでいた。この中間体はヒンジ近傍に無秩序なループ構造をもった部分的に変性したC_{H2}ドメインペアにあたり、これらのループの構造が崩れていることが糖鎖を除去したIgGやIgG-Fcにおいて活性が損なわれていることの原因であるのかもしれない(34,35)。

このようにGlcNAc₂Manの3糖構造は、C_{H2}ドメインの構造的な安定性と秩序をもたらし、FcγRとC1の結合や活性化に適するヒンジ下流部分のコンフォメーションの形成に寄

C_H2 domain, as evidence of progressive structural disorder for the truncated glycoforms (16). Interestingly, in this study all attempt to obtain a crystal form of deglycosylated IgG-Fc failed. This may be indicative of the structural destabilisation that results from complete removal of oligosaccharides. Truncation of the sugar residues results in the mutual approach of C_H2 domains with the generation of a “closed” conformation; in contrast to the “open” conformation observed for the fully galactosylated IgG-Fc (16). A truncated glycoform bearing only a fucosylated primary GlcNAc was shown not to bind soluble recombinant FcγR III a and NMR studies indicated conformational alterations of the lower hinge region that contributes to FcγR binding sites (36).

The effectiveness of recombinant monoclonal antibody (rMAb) in oncology depends on sensitizing target cells for subsequent killing by the mechanisms of antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC), complement dependent cytotoxicity (CDC) and/or the induction of apoptosis. It is unequivocally established that ADCC and CDC are dependent on appropriate glycosylation of the rMAb (4,12–16) whilst induction of apoptosis may only require cross-linking of cell surface antigens. Glycosylation has been a focus of interest for the biopharmaceutical industry for the past several years and cell lines have been engineered in efforts to optimise antibody products for ADCC and CDC by the differential addition of fucose, galactose, bisecting N-acetylglucosamine and sialic acid. These studies have shown that the affinity of IgG-Fc for FcγR III a, expressed on natural killer (NK) cells, is significantly increased for IgG-Fc glycoforms lacking α(1–6) fucose residues, with a consequent dramatic increase in NK cell mediated ADCC (13–15).

F. Glycosylation of IgG-Fab

It is established that ~30% of polyclonal human IgG molecules bear N-linked oligosaccharides within the IgG-Fab region, in addition to the conserved glycosylation site at Asn 297 in the IgG-Fc (4,10,36–39). When present they are attached within the variable regions of the kappa (V_κ), lambda (V_λ) or heavy (V_H) chains; sometimes both. In the immunoglobulin sequence database ~20% of IgG variable regions have N-linked glycosylation consensus sequences (Asn-X-Thr/Ser; where X can be any amino acid except proline). Interestingly, these consensus sequences are mostly not germline encoded but result from somatic

変異していることが示された。これらのデータは、同じく切断された糖鎖構造を持つ一連の IgG-Fc が、糖鎖の短鎖化に伴って C_H2 ドメインの温度因子が構造の乱れの証左として増加していくという X 線結晶データとも矛盾していない(16)。興味深いことに、この研究では、糖鎖を除去した IgG-Fc の結晶は得られなかった。これは、糖鎖を完全に除去することにより、IgG-Fc の構造が不安定化することを意味しているのかもしれない。糖鎖を短鎖化することにより C_H2 ドメインは互いに接近し、“閉じた”コンフォメーションを形成する。このことは、完全にガラクトースが結合した IgG-Fc が“開いた”コンフォメーションを形成することと対照的である(16)。また、フコースと N-アセチルグルコサミンの 2 糖のみに糖鎖構造を短鎖化すると可溶性のリコンビナント FcγR III a に結合できなくなることが示されており、NMR 研究の結果、FcγR の結合部位であるヒンジ下流領域にコンフォメーション変化が引き起こされることが明らかとなっている(36)。

腫瘍学の分野におけるリコンビナントモノクローナル抗体の有効性は、標的細胞を感作し、それに引き続いて抗体依存性細胞障害 (ADCC)、補体依存性障害 (CDC)、アポトーシスの誘導という機構でそれらを殺傷することに依存している。アポトーシスの誘導には細胞表面の抗原の架橋のみがおそらく必要であるのに対して、ADCC と CDC はリコンビナントモノクローナル抗体の適切な糖鎖修飾に依存していることは異論を差し挟む余地が無い。過去数年間、糖鎖修飾はバイオ医薬品産業の興味の対象であり、細胞株のエンジニアリングによってフコース、ガラクトース、バイセクティング N-アセチルグルコサミン、シアル酸の付加を変化させ、生産物としての抗体の ADCC と CDC を最適化しようという努力がはられている。こうした研究により、ナチュラルキラー (NK) 細胞上に発現されている FcγR III a に対する IgG-Fc の親和性が、α1,6 フコース残基を欠落した IgG-Fc において有意に増大しており、その結果、NK 細胞を介した ADCC 活性が劇的に向上することが示されている(13–15)。

F. IgG-Fab の糖鎖修飾

ポリクローナルヒト IgG の約 30% は、Fc 上のアスパラギン 297 番に保存された糖鎖結合部位に加えて、Fab 領域に糖鎖を発現しているということが確立されている(4,10,36–39)。そうした糖鎖は、κ 鎖、λ 鎖、あるいは重鎖の変領域(それぞれ、V_κ, V_λ, V_H) の一方、ときには両方に結合している。免疫グロブリンの配列データベースによれば、IgG の可変領域の 20% には、N 型糖鎖結合のコンセンサス配列 (Asn-X-Thr/Ser, X はプロリン以外のアミノ酸) が存在している。興味深いことに、これらのコンセンサス配列は多くの場合、

mutation – suggestive of positive selection for improved antigen binding. Analysis of polyclonal human IgG-Fab reveals the presence of diantennary oligosaccharides that are extensively galactosylated and substantially sialylated, in contrast to the oligosaccharides released from IgG-Fc (4,10,36–39). This pattern was maintained for IgG-Fab prepared from hypogalactosylated IgG isolated from the sera of patients with Wegner's granulomatosis or microscopic polyangiitis (38). Thus, factors within the local environment of IgG producing plasma cells, *in vivo*, influence the efficacy of glyco-processing of IgG-Fc but not IgG-Fab during passage through the Golgi apparatus. The functional significance for IgG-Fab glycosylation of polyclonal IgG has not been fully evaluated but data emerging for monoclonal antibodies suggests that V κ , V λ or V H glycosylation can have a neutral, positive or negative influence on antigen binding (4,10).

It is generally observed that the oligosaccharide present in glycoproteins contributes to solubility and stability; the influence of glycosylation on the thermal stability of human IgG1-Fc was demonstrated in a DSMC study (16,34,35). It is possible that IgG-Fab glycosylation may similarly be beneficial, particularly when formulating IgG therapeutics at concentrations of 100–150 mg/ml. Such high concentration formulations allow the development of self-administration protocols and can reduce dosing intervals, resulting in reduced costs of treatment. Controlling glycoform fidelity at two sites offers a further challenge to the biopharmaceutical industry.

The licensed antibody therapeutic Erbitux (Cetuximab), bears an N-linked oligosaccharide at Asn 88 of the V H region; interestingly there is also a glycosylation motif at Asn 41 of the V L but it is not occupied (40). Analysis of the IgG-Fc and IgG-Fab oligosaccharides of Erbitux, produced from Sp2/0 cells, reveal highly significant differences in composition. Whilst the IgG-Fc oligosaccharides are typical, i.e. comprised predominantly of diantennary G0F oligosaccharides, the IgG-Fab oligosaccharides are extremely heterogeneous and include complex diantennary, triantennary and hybrid oligosaccharides; non-human oligosaccharides were also present, e.g. galactose in α (1–3) linkage to galactose and N-glycylneuraminic acid residues.

A recent study reported that of 76 patients treated with Erbitux 25 had hypersensitivity reactions to the drug and this was shown to be due to the presence of IgE anti-gal α (1–3) gal antibodies. Interestingly, environmental factors appeared to influence the development of IgE anti-gal α (1–3) gal responses and such antibodies were detected in pre-treatment samples from 17 of the patients (41). The incidence varied significantly between treatment centres and may be linked to differences in predominant infectious

生殖細胞にコードされたものではなく、体細胞変異の結果として生じたものである。このことは抗原結合性の向上により正の選択を受けたことを示唆している。ポリクローナルヒト IgG の Fab の分析の結果、そこに発現している糖鎖は、Fc から遊離した糖鎖とは異なり、高度にガラクトシル化され、実質的にシアリル化がされた 2 本鎖糖鎖であることが明らかとなっている (4,10,36–39)。この様式は、ウェゲナー肉芽腫症、微小多発性血管炎の患者血清から単離された低ガラクトシル化 IgG 由来の Fab においても保存されていた (38)。したがって、*in vivo* において IgG を産生するプラズマ細胞の局所的な環境因子は、ゴルジの装置を経由する移行過程において、IgG の Fab でなく Fc の糖鎖プロセッシングの効果にのみ影響を及ぼすということになる。ポリクローナル IgG の Fab 上の糖鎖修飾の機能上の意義は十分に明らかにされているわけではないが、モノクローナル抗体について得られたデータは、V κ 、V λ あるいは V H における糖鎖修飾が、抗原結合に対して正負いずれの影響も与え得る、あるいは影響しない場合もある、ということを示している (4,10)。

糖タンパク質の糖鎖は溶解性と安定性に寄与していることが一般的に認められている。ヒト IgG1-Fc の熱安定性に対する糖鎖修飾の影響は、DSMC による研究で実証された (16,34,35)。IgG-Fab に発現している糖鎖も同様な効果があるかもしれない。特に IgG 治療薬を 100–150 mg/ml といった濃度で製造する際にこのことは有用であろう。そのような高濃度の調合を行なうことができれば、自己投与プロトコルを開発することが可能となり、投薬間隔をあけることができる。これにより、結果的に治療のコストを減ずることになる。2 つの部位の糖鎖構造を厳密に制御することは、バイオ医薬品産業にとって更なる挑戦的課題である。

認可された治療抗体 Erbitux (Cetuximab) は V H 領域のアスパラギン 88 番に N 型糖鎖が結合している。面白いことに、V L 領域のアスパラギン 41 番にも糖鎖結合モチーフが存在するが、そこには糖鎖は結合していない (40)。Sp2/0 細胞により産生された Erbitux の Fc および Fab 部分の糖鎖の発現プロファイルは、著しく異なっていた。IgG-Fc 上の糖鎖は、主に 2 本鎖 G0F 糖鎖から構成されている典型的な発現パターンを示していたが、IgG-Fab 上の糖鎖のパターンは極端な不均一性を示しており、2 本鎖、3 本鎖の複合型糖鎖や混成型糖鎖から構成されていた。またガラクトースにガラクトースが α 1,3 結合した (α 1,3 ガラビオース) 構造や N-グリコシルノイラミン酸残基を有する糖鎖などのヒト型でない糖鎖も存在していた。

最近の研究では、Erbitux 投与された 76 人の患者中 25 人が薬に対して過敏症を示したことが報告されている。これ

agents present in local environments.

A detailed analysis of the glycoforms of a humanised IgG rMAb, also expressed in Sp2/0 cells, bearing oligosaccharides at Asn 56 of the V_H and Asn 297 reveals the expected IgG-Fc profile of predominantly GOF oligosaccharides; however, eleven oligosaccharides were released from the IgG-Fab, including diantennary and triantennary oligosaccharides bearing gal $\alpha(1-3)$ gal, N-glycylneuraminic acid and N-acetyl galactosamine residues (42). The consistent observation of higher levels of galactosylation and sialylation for IgG-Fab N-linked oligosaccharides, in comparison to IgG-Fc, is thought to reflect increased exposure and/or accessibility. In view of these experiences it would seem that the perceived virtues of the NS0 and Sp2/0 cells might best be pursued by engineering to inactivate the gal $\alpha(1-3)$ and N-glycylneuraminic acid transferases.

The double challenge to produce rMAbs having appropriately glycosylated IgG-Fc and IgG-Fab has led to some companies engineering out V_H or V_L glycosylation motifs when present in candidate rMAbs (43); however, present reports suggest that CHO cells can glycosylate V_H and/or V_L motifs in a similar manner to that observed for normal polyclonal IgG (44).

G. Conclusions and next generation antibody therapeutics

The dramatic increase in NK cell mediated ADCC reported for non-fucosylated Rituxan and Herceptin, *in vitro*, suggests that they may be similarly efficacious *in vivo* and offer significant clinical advantage (13-15). These fucosylated products are established in the clinic and are unlikely to be re-derivatised in the non-fucosylated form; however, new anti-CD20 and EGFR (epidermal growth factor receptor) are under development in the non-fucosylated format.

Initially the observed heterogeneity of IgG antibody glycoforms provided a challenge both for an understanding of its significance and for the manufacture of

は抗 $\alpha 1,3$ ガラビオース抗体である IgE の存在が原因であることが示されている。興味深いことに、抗 $\alpha 1,3$ ガラビオース IgE の応答に影響を与える環境因子が存在するらしく、そのような抗体は 17 人の患者からの治療前の試料にも検出されていた (41)。過敏症の発生率は治療センターの間で異なっており、このことは局所的な環境に存在する主要な感染病原体の違いに関係しているかもしれない。

Sp2/0 細胞により産生されたヒト化リコンビナントモノクローナル IgG の詳細な糖鎖構造解析により、V_H ドメインのアスパラギン 56 番とアスパラギン 297 番に糖鎖が付加しており、Fc の糖鎖構造は予想通り GOF が主要な成分であることが明らかとなった。しかしながら、Fab からは、 $\alpha 1,3$ ガラビオース、N-グリコシルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン残基が結合した 2, 3 本鎖構造を含む 11 種類の糖鎖が遊離された (42)。これと呼応して本抗体の Fab の N 型糖鎖は Fc の糖鎖と比べてガラクトシル化とシアリル化を高度にうけていることがみとめられたが、これは Fab の糖鎖は露出度が高く酵素の接近が起こりやすいことを反映していると考えられる。以上の点を踏まえると、これまでに認識されている NS0 細胞や Sp2/0 細胞の長所は、 $\alpha 1,3$ ガラクトース転移酵素や N-グリコシルノイラミン酸を転移する酵素を不活性化する改変を施すことによって一層磨かれるであろうと思われる。

Fc と Fab の両方が適切な糖鎖修飾をうけたリコンビナントモノクローナル IgG を生産することは二重のハードルとなるため、いくつかの会社では、候補となるリコンビナントモノクローナル抗体の V_H あるいは V_L ドメインに糖鎖結合モチーフがあった場合に、それらを改変して無くしてしまうようにしている (43)。しかしながら、目下の報告では、CHO 細胞が正常なポリクローナル IgG と同様な糖鎖構造で V_H, V_L ドメインのモチーフを修飾することが可能であることが示唆されている (44)。

G. 結論および次世代の抗体治療

フコシル残基が欠失した Rituxan および Herceptin の NK 細胞を介した ADCC 活性が *in vitro* で劇的に向上することが報告されており、そのことから、これらの抗体は生体内でも同様な効果を有し、臨床的に甚だ有益であると考えられている (13-15)。これらのフコシル化体は製品として臨床上でも確立されたものとなっており、非フコシル化体を作り直すというわけにはいきそうにない。しかしながら、新規な抗 CD20 抗体および抗 EGFR (上皮成長因子レセプター) 抗体は非フコシル化体としての開発が進んでいる。

IgG 抗体に見出された糖鎖構造の不均一性は、当初は、その意義を理解すること、そして天然の糖鎖構造を持つ抗体

natural antibody glycoform products. Significant progress has been made both in understanding of differential functional activities of IgG glycoforms and in applying cell and protein engineering to optimise the production of individual and/or homogeneous glycoforms. Importantly, rapid and sensitive analytical protocols have been developed that allow for the glycoform profile to be a criterion applied to clonal selection at an early stage in the development of antibodies for new targets.

I trust that Prof. Takahashi derives great satisfaction from seeing how her pioneering studies and their continuous development have contributed to glycoscience. It is a privilege for me to be invited to record my appreciation.

を作り出すことが大きな課題であった。その後の重要な進展により、IgGの糖鎖構造が異なる機能的活性を持つことに関する理解が進み、また、それぞれの糖鎖構造を発現したり、あるいは均一な糖鎖構造を有するIgGの生産を最適化するために細胞工学やタンパク質工学を応用することも進歩を遂げてきた。重要なことは、新しい標的に対する抗体の開発の初期段階におけるクローンの選択に際して基準となる糖鎖プロファイルを提供することができる迅速かつ敏感な分析プロトコルが開発されていることである。

最後に、ご自身の先駆的な研究とそのたゆまぬ発展が糖鎖科学に貢献したことに、高橋教授が大いに満足されていることを筆者は確信しています。ここに謝意を記すことができることを名誉に思います。

(名古屋市立大学大学院薬学研究科 加藤晃一訳)

References

1. Takahashi, N., Ishii, I., Ishihara, H., Mori, M., Tejima, S., Jefferis, R., Endo, S., and Arata, Y. (1987) *Biochemistry*, **26**, 1137–1144
2. Woof, J. M., and Burton, D. R. (2004) *Nat Rev Immunol.* **4**, 89–99.
3. Nezlin, R., and Ghetie, V. (2004) *Adv Immunol.* **82**, 155–215
4. Jefferis, R. (2007) *Expert Opin Biol Ther.* **7**, 1401–1413
5. Carter, P. J. (2006) *Nat Rev Immunol.* **6**, 343–357
6. Reichert, J. M., and Valge-Archer, V. E. (2007) *Nat Rev Drug Discov.* **6**, 349–356
7. Moutel, S., and Perez, F. (2008) *Biotechnol J.* **3**, 298–300
8. Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. (2008) *Nat Rev Immunol.* **8**, 34–47
9. van Sorge, N. M., van der Pol, W. L., and van de Winkel, J. G. (2003) *Tissue Antigens.* **61**, 189–202
10. Jefferis, R. (2005) *Biotechnology Progress.* **21**, 11–16
11. Sinclair, A. M., and Elliott, S. J. (2005) *Pharm Sci.* **94**, 626–1635
12. Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Mengm Y. G., Weikert, S. H., and Presta, L. G. (2002) *J. Biol Chem.* **277**, 26733–26740
13. Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., and Shitara, K. (2003) *J Biol Chem.* **278**, 3466–3473
14. Niwa, R., Natsumem, A., Ueharam, A., Wakitanim, M., Iidam, S., Uchidam, K., Satoh, M., and Shitara, K. (2005) *J Immunol Methods.* **306**, 151–60
15. Ferrara, C., Bruncker, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U., and Umana, P. (2006) *Biotechnol Bioeng.* **93**, 851–61
16. Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., and Sondermann, P. (2003) *J. Mol. Biol.* **325**, 979–989
17. Deisenhofer, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 2361–2370
18. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., and Dwek, R. A. (2007) *Annu Rev Immunol.* **25**, 21–50
19. Mizuochi, T., Taniguchi, T., Shimizu, A., and Kobata, A. (1982) *J. Immunol.* **129**, 2016–2020
20. Routier, F. H., Hounsell, E. F., Rudd, P. M., Takahashi, N., Bond, A., Hay, F. C., Alavi, A., Axford, J. S., and Jefferis, R. (1998) *J Immunol Methods* **213**, 13–30
21. Wuhler, M., Porcelijn, L., Kapur, R., Koeleman, C. A., Deelder, A. M., de Haas, M., and Vidarsson, G. (2008) *J Proteome Res* Oct 23. [Epub ahead of print]
22. Yamada, E., Tsukamoto, Y., Sasaki, R., Yagyu, K., and Takahashi, N. (1997) *Glycoconj J.* **14**, 401–405
23. Kibe, T., Fujimoto, S., Ishida, C., Togari, H., Wada, Y., Okada, S., Nakagawa, H., Tsukamoto, Y., Kawamura, Y., and Takahashi, N (1996) *Clin Biochem Nutr* **21**, 57–63
24. Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., Takeuchi, F., Nagano, Y., Miyamoto, T., and Kobata, A. (1985) *Nature.* **316**, 452–457
25. Axford, J. S., Cunnane, G., Fitzgerald, O., Bresnihan, B., and Frears, E. R. (2003) *J. Rheumatol.* **12**, 2540–2546
26. Holland, M., Takada, K., Okumoto, T., Takahashi, N., Kato, K., Adu, D., Ben-Smith, A., Harper, L., Savage, C. O. S., and Jefferis, R. (2002). *Clin. exp. Immunol.* **29**, 183–190
27. Cremata, J. A., Sorell, L., Montesino, R., Mata, M., Cabrera, G., Galvan, J. A., Garcia, G., Valdes, R., and Garrote, J. A. 2003 *Clin. Exp. Immunol.* **133**, 422–9
28. Lund, J., Takahashi, N., Nakagawa, H., Bentley, T., Hindley, S., Tyler, R., Goodall, M., and Jefferis, R. (1993) *Molec. Immunol.* **30**, 741–748

29. Jones, A. J., Papac, D. I., Chin, E. H., Keck, R., Baughman, S. A., Lin, Y. S., Kneer, J., and Battersby, J.E. (2007) *Glycobiology*. **17**, 529–40
30. Keck, R., Nayak, N., Lerner, L., Raju, S., Ma, S., Schreitmuller, T., Chamow, S., Moorhouse, K., Kotts, C., and Jones A. (2008) *Biologicals*. **36**, 49–60
31. Lund, J., Takahashi, N., Pound, J., Goodall, M., and Jefferis, R. (1996) *J.Immunol.* **157**, 4963–4969
32. Lund, J., Tanaka, T., Takahashi, N., Sarmay, G., Arata, Y. and Jefferis, R. (1990) *Mol. Immunol.* **27**, 1145–1154
33. Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000) *Nature*. **406** (6793), 267–73
34. Mimura, Y., Church, S., Ghirlando, R., Dong, S., Goodall, M., Lund, J., and Jefferis, R. (2000) *Molec Immunol.* **37**, 697–706
35. Mimura, Y., Sondermann, P., Ghirlando, R., Lund, J., Young, S. P., Goodall, M., and Jefferis, R. (2001). *J.Biol.Chem.* **276**, 45539–45547
36. Yamaguchi, Y., Nishimura, M., Nagano, M., Yagi, H., Sasakawa, H., Uchida, K., Shitara, K., and Kato, K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* **1760**, 693–700
37. Youings, A., Chang, S. C., Dwek, R. A., and Scragg, I. G. (1996) *Biochem J.* **314**, 621–630
38. Holland, M., Yagi, H., Takahashi, N., Kato, K., Savage, C. O. S., Goodall, D. M., and Jefferis, R. (2006) *Biochim Biophys Acta.* **1760**, 669–77
39. Mimura, Y., Ashton, P. R., Takahashi, N., Harvey, D. J., and Jefferis, R. (2007) *J Immunol Methods.* **326**, 116–126
40. Qian, J., Liu, T., Yang, L., Daus, A., Crowley, R., and Zhou, Q. (2007) *Anal.Biochem.* **364**, 8–18
41. Chung, C. H., Chung, C. H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q. T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B. A., Satinover, S. M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R. J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D. J., and Platts-Mills, T. A. (2008). *N Engl J Med.* **358**, 1109–1117
42. Huang, L., Biolosi, S., Bales, K. R., and Kuchibhotla, U. (2006). *Anal Biochem.* **349**, 197–207
43. Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E., and Shepard, H. M. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**, 4285–4289
44. Lim, A., Reed-Bogan, A., and Harmon, B. J. (2008) *Anal Biochem.* **375**, 163–172

Profile of the Authors

Royston Jefferis: Is Emeritus Professor of Molecular Immunology at the University of Birmingham. After completing the degrees of BSc and PhD in Chemistry he moved to the Medical School, Birmingham, and began studies on the structure and function of antibody molecules, in health and disease. These studies revealed the considerable structural and functional heterogeneity determined by variations in the carbohydrate component (glycoforms) of IgG antibodies. These findings emphasise the need to produce recombinant IgG antibody therapeutics having a human glycosylation profile. He has extensive contacts with the biopharmaceutical industry and is an elected Member of the Royal College of Physicians (MRCP) and Fellow of the Royal College of Pathologists (FRCPath), in consideration of published research.