



Fc gamma receptors-Nivolumab 결합 분석

Introduction

Fc gamma receptor & Nivolumab

Fc gamma receptor (FcγR)는 immunoglobulin G (IgG)의 Fc region을 인식합니다. Fc gamma receptor는 크게 세종류로 나뉘며 FcγRI, FcγRII, FcγRIII 순으로 Fc region과 강한 결합을 갖습니다. 또한 각 receptor들은 여러 개의 subclasses로 분류될 수 있습니다.

Nivolumab은 PD-1과 결합하는 human monoclonal antibody (IgG4 isotype)로 면역항암제로써 사용되고 있습니다. 2014년 FDA의 승인을 이후로 전이성 흑색종, 폐암, 위암, 난소암 등의 치료에 사용되고 있습니다.

본 application note에서는 Nivolumab의 Fc region과 여러 Fc gamma receptor들의 결합을 SPR을 통해 관찰하고 결합력을 비교 분석하였습니다.

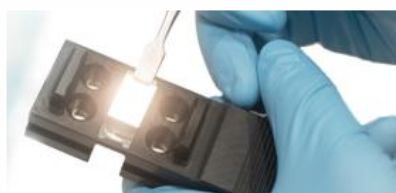
Materials and methods

Materials

- Instrument : iMSPR-ProX [CAT#INPX1000]
- Sensor chip : C-Dex100 [CAT#CDDH1100]
- Amine coupling kit [CAT#IMAM1000]
- Running buffer : PBS [CAT#RBPB1010-500]
- Ligand : FcγRI (CD64) / FcγRIIa (CD32a) / FcγRIIIa (CD16a) / FcRn
- Analyte : Nivolumab
- Regeneration solutions:
 - Glycine-HCl (pH 3.0) [CAT#RGGH1030]
 - 1M Ethanol-amine (pH 8.5) [CAT#IMBK1000]
 - PBS [CAT#RBPB1010-500]

Preparation

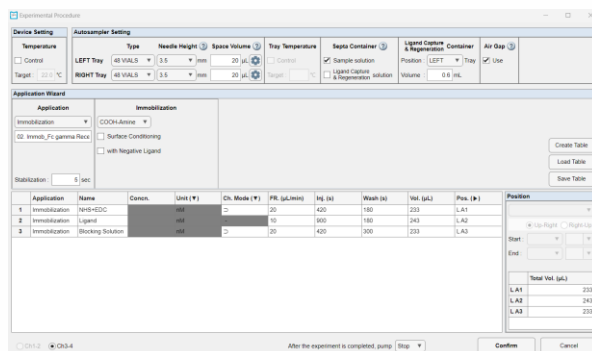
- iMSPR-ProX에 C-Dex100를 장착한 프리즘 홀더를 로딩하고 1X PBS를 연결한 후에 Prime을 진행한다.
- 50 mM NaOH를 20 μl/min로 1분씩 3회 주입하여 Precondition을 진행한다.



[Figure 1. 프리즘 홀더에 sensor chip 장착]

Immobilization: Amine coupling

- Continuous mode로 ligand channel, reference channel에 200 mM EDC와 100 mM NHS 혼합 용액을 20 μl/min로 7분 동안 주입하여 activation 한다.
- Individual mode로 ligand channel에 FcγR를 acetate buffer (pH 4.0)로 희석하여 30~50 μg/ml의 농도로 준비하여 10 μl/min으로 10~15분간 주입한다.
- 다시 continuous mode로 바꾸고 1M Ethanolamine-HCl을 20 μl/min으로 7분 동안 주입하여 남아 있는 COOH 작용기를 blocking한다.



[Figure 2. Ligand 고정화 experimental procedure]



Kinetic analysis

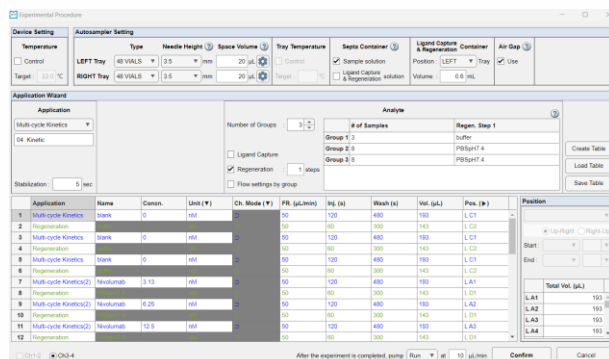
1. Nivolumab을 running buffer로 2배씩 연속 희석하여 Table 1의 농도와 같이 준비한다.
2. 준비된 Nivolumab 용액을 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 2분 간 주입하여 association을 관찰한다.
3. 주입이 끝난 후 running buffer가 흐르는 상태로 8분을 더 관찰하여 dissociation을 확인한다.
4. Dissociation 관찰이 끝난 후, Table 2와 같은 조건으로 regeneration한다.
5. Regeneration 이 끝난 후, 다음 농도의 nivolumab 용액에 대해 2~4번 과정을 반복 수행한다. [Figure 3]
6. 실험이 완료된 직후, 자동으로 평가된 kinetic 분석 결과를 확인한다. [Figure 4]

Ligand	Range of analyte conc.
Fc γ RI (CD64)	1.56 - 100 nM
Fc γ RIIa (CD32a)	7.8 - 500 nM
Fc γ RIIIa (CD16a)	15.6 - 1000 nM
FcRn	3.13 - 200 nM

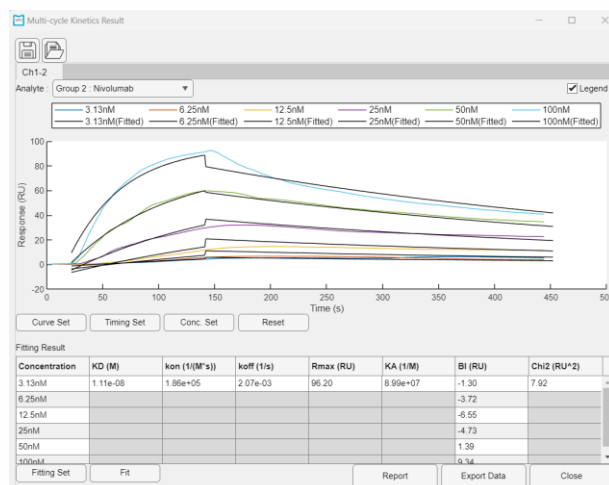
[Table 1. 리간드 별 Nivolumab의 kinetic 분석 농도 구간]

Ligand	Regeneration solution	Injection time/Wash time
Fc γ RI (CD64)	Glycine-HCl (pH 3.0)	1 min / 10 min
Fc γ RIIa (CD32a)	1M Ethanol-amine (pH 8.5)	1 min / 3 min
Fc γ RIIIa (CD16a)	1M Ethanol-amine (pH 8.5)	1 min / 3 min
FcRn	1X PBS (pH 7.4)	1 min / 3 min

[Table 2. 리간드 별 Regeneration 조건]



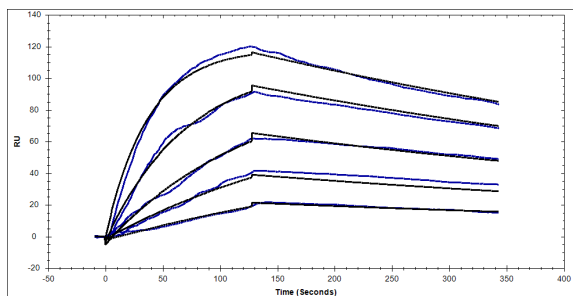
[Figure 3. kinetic 분석 experimental procedure]



[Figure 4. Kinetic evaluation 결과]

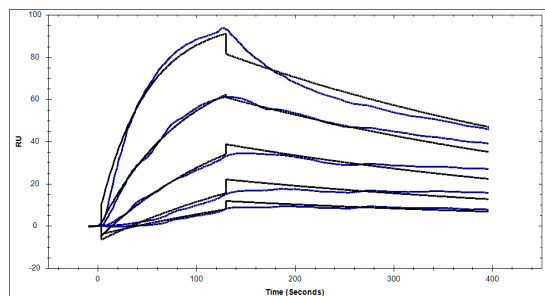


Results



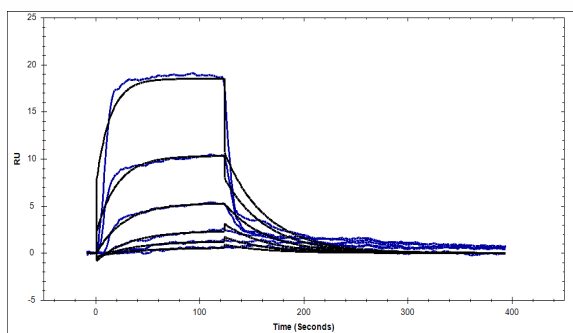
k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
1.02E+06	1.45E-03	1.43E-09

[Figure 5. FcγRI와 Nivolumab의 kinetic 분석결과]



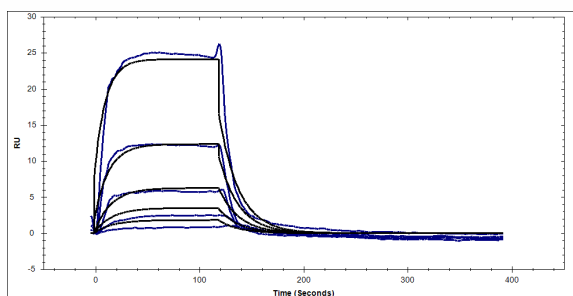
k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
1.86E+05	2.07E-03	1.11E-08

[Figure 8. FcγRIIa와 Nivolumab의 kinetic 분석결과]



k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
9.84E+04	2.51E-02	2.56E-07

[Figure 6. FcγRIIb와 Nivolumab의 kinetic 분석결과]



k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
4.23E+04	5.23E-02	1.24E-06

[Figure 7. FcγRIIIb와 Nivolumab의 kinetic 분석결과]

Conclusion

IgG4 isotype인 Nivolumab의 결합 친화도(K_D)를 비교했을 때, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII 순으로 강하게 나타났습니다. FcγR type에 따른 항체와의 결합 친화도의 차이를 iMSPR-ProX를 통해 검증할 수 있었습니다.

Fc gamma receptor는 다양한 면역질환을 치료하기 위한 타깃단백질로 활발한 연구가 진행되고 있습니다. SPR은 형광물질의 conjugation 없이 순수한 분자만의 결합을 실시간으로 확인할 수 있는 장점이 있습니다.

Reference

- Bournazos, Stylianos, Aaron Gupta, and Jeffrey V. Ravetch. "The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement." *Nature Reviews Immunology* 20.10 (2020): 633-643.
- Bruhns, Pierre, et al. "Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 113.16 (2009): 3716-3725.