

FcRn Columns

文献リスト



Schlothauer T. et al. (2013) Analytical FcRn affinity chromatography for functional characterization of monoclonal antibodies.

MAbs; 5(4):576-86. doi: 10.4161/mabs.24981. Epub 2013 May 29.

新生児性Fc受容体 (FcRn) は、生体内 (in vivo) におけるIgG抗体の代謝運命において重要な役割を果たしています。試験管内 (in vitro) でのFcRnとIgGの相互作用解析は、生体内での薬物動態 (PK) に影響を及ぼし得る治療用IgGの構造および機能的完全性 (インテグリティ) に関する知見を提供します。本研究では、IgGとFcRn間の生理的相互作用メカニズムを高度に再現した条件に基づく、標準化されたpHグラジエントFcRnアフィニティ液体クロマトグラフィー法を開発しました。本手法は、FcRnへの親和性の違いに基づいて、IgGの分子アイソフォーム、分解物、および改変分子の分離を可能にします。ヒトFcRnをカラムに固定化し、pH 5.5から8.8への線形 (リニア) pHグラジエントを適用しました。さまざまなモノクローナルIgG調製物 (酸化体や凝集種など) の特性評価において、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法との比較のもとFcRnクロマトグラフィーを用いました。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23765230/>

Stracke J. et al. (2014) A novel approach to investigate the effect of methionine oxidation on pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies.

MAbs; 6(5):1229-42. doi: 10.4161/mabs.29601. Epub 2014 Oct 30

製造および保管期間中において、治療用抗体の化学的・構造的完全性 (インテグリティ) を維持することは、医薬品開発における主要な課題です。Fc領域のメチオニン残基である Met252 および Met428 の酸化は高頻度で観察され、高レベルで存在すると FcRn に対する親和性の低下および血漿中からの消失 (クリアランス) の加速を引き起こします。酸化は両方の部位で同時に発生するため、薬物動態 (PK) 特性の付随的な変化に対するそれぞれの残基の個別の寄与については明確に説明されていませんでした。本研究では、新規の pH グラジエント FcRn アフィニティクロマトグラフィー手法を適用し、FcRn 結合特性に基づいて酸化型 IgG1 調製物から 3 つの抗体酸化変異体を分離・単離しました。物理化学的特性解析により、これら 3 つの酸化変異体は主に IgG 1 分子あたりの oxMet252 (酸化型 Met252) の数 (0、1、または 2 個) において異なっており、oxMet428 の含有量には有意な差がないことが判明しました。

oxMet252 含有量の増加に対応して、in vitro における FcRn 親和性の段階的な低下、ならびにヒト FcRn トランスジェニックマウスにおける消失の加速および消失半減期 (terminal half-life) の短縮が観察されました。抗体 1 分子あたり単一の Met252 のみが酸化された場合、未修飾の IgG と比較して薬物動態 (PK) に有意な影響は見られませんでした。重要なことに、両方の重鎖 (HC) の Met252 が酸化された分子のみが、有意に速く消失を示しました。対照的に、Met428 の酸化は PK に対して明確な悪影響を及ぼさず、むしろ FcRn 結合のわずかな改善と消失の遅延をもたらしました。しかし、この軽微な効果は、Met252 酸化の優位な (ドミナントな) 影響によって打ち消されると考えられました。IgG 酸化変異体を機能的にクロマトグラフィー分離し、続いて物理化学的および生物学的特性解析を行うというこの新しいアプローチは、比較的高レベルの Met252 および Met428 酸化を含む抗体調製物において PK 特性が変化しない現象に対し、実験的裏付けのある最初の説明を提供しました。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25517308/>

Jensen P.F. et al. (2015) Investigating the interaction between the neonatal Fc receptor and monoclonal antibody variants by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*; 14(1):148-61. doi: 10.1074/mcp.M114.042044. Epub 2014 Nov 6.

新生児性Fc受容体 (FcRn) による免疫グロブリンのリサイクルは、血漿中における抗体濃度の維持に極めて重要であり、内因性および遺伝子組み換えモノクローナル抗体の長い半減期を担っています。治療的な観点から、抗体の薬物動態 (PK) を最適化し、最終的に有効性と安全性を向上させるために、IgGとFcRnの相互作用を理解し制御することに大きな関心が寄せられています。本研究では、IgG-FcRn複合体の両パートナーにおいて結合により変動する領域を特定するため、水素/重水素交換質量分析法 (HDX-MS) および標的化電子移動解離 (ETD) を用いて、完全長ヒトIgG1とヒトFcRnの相互作用を解析しました。複合体形成に伴い、抗体Fc領域およびFcRnの複数の領域において重水素交換からの保護 (構造の安定化) が観察され、これは過去に行われたFcフラグメントとFcRnの複合体の結晶構造解析結果と良好な一致を示しました。興味深いことに、IgGのFab領域における複数の領域においても、重水素の取り込みが低下することが見出されました。

我々の知見は、Fab領域内に未だ知られていないFcRn相互作用部位が存在するか、あるいはFcRn結合に伴いIgGのFc領域とFab領域の間に構造的な運動 (コンフォメーションの連関) が存在することを示唆しています。さらに、IgG-FcRn相互作用の構造応答におけるIgG糖鎖の役割についても調査しました。抗体糖鎖の除去 (脱糖鎖) により、Fc領域におけるFcRn結合部位の柔軟性が増大しました。その結果、脱糖鎖IgGに対するFcRn結合では、野生型の糖鎖付加IgGで観察されたような構造の安定化は誘発されませんでした。我々の研究結果は、IgG-FcRn相互作用に関する新たな分子レベルの知見を提供するものであり、溶液中における大型タンパク質複合体の立体構造とダイナミクスに関する詳細な情報を提供することで、構造プロテオミクスを進展させるHDX-MSの有用性を実証しています。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25378534/>

Schoch A. et al. (2015) Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics.

Proc Natl Acad Sci U S A; 112(19):5997-6002. doi: 10.1073/pnas.1408766112. Epub 2015 Apr 27

本研究では、IgG抗体の可変領域フラグメント (Fv) が新生児性Fc受容体 (FcRn) への結合、およびFcRn依存的な薬物動態 (PK) に及ぼす影響を調査しました。FcRnはIgGの恒常性維持 (体内バランスの保全) において重要な役割を果たしており、結晶化可能領域フラグメント (Fc) における特異的な分子改変がFcRn依存のPKに影響を与えることが知られています。抗原結合性フラグメント (Fab) がFcRn相互作用に及ぼす影響については報告があるものの、その詳細な機構は未だ十分に説明されていませんでした。そこで我々は、ほぼ同一のFc領域を持ちながらヒトにおける消失半減期 (terminal half-life) が異なる2つのIgG1抗体 (ブリアキヌマブおよびウスチキヌマブ) に着目し、両者のドメインをクロスオーバー (相互置換) させた各種変異体や、電荷分布を変化させた改変体を系統的に作製・解析しました。

FcRnアフィニティクロマトグラフィー、分子動力学 (MD) シミュレーション、およびヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いた in vivo PK試験を駆使した結果、Fvドメイン上の電荷分布がFcRnへの「過剰な結合 (過度の親和性)」に関与している証拠を示しました。この過剰な結合は、生理的pH条件下における効率的なFcRnとIgGの解離を阻害し、結果としてFcRn依存的な消失半減期を短縮させます。さらに、抗体変異体のFcRnカラム保持時間 (リテンションタイム) と、in vivo での消失半減期との間に直線的な相関関係が存在することを観察しました。総括すると、本研究はIgGとFcRnの相互作用に関する理解を深めるものであり、可変Fab領域を対象としたFcRn依存的な抗体エンジニアリング (分子設計) においても非常に有益な可能性を提供するものです。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25918417/>

Dashivets T. et al. (2015) Multi-Angle Effector Function Analysis of Human Monoclonal IgG Glycovariants.

PLoS One; 10(12):e0143520. doi: 10.1371/journal.pone.0143520. eCollection 2015

遺伝子組み換え (リコンビナント) 抗体の治療性能は、「抗原認識」および「Fc領域を介した抗体エフェクター機能」という 2 つの独立したメカニズムに依存しています。Fcフラグメントと各種 Fc 受容体 (FcR) との相互作用は、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) およびコンプレメント (補体) 依存性細胞傷害活性 (CDC) を誘発し、血清中における抗体の持続性を決定づけます。治療用抗体の文脈においては、Fc γ 3R (Fc γ 3受容体) が最も重要な役割を果たします。Fc領域に結合した糖鎖部分は IgG のエフェクター機能に不可欠であり、個々の Fc γ 3R に対する親和性を左右し、活性化型または抑制型といった異なる受容体クラスへの結合を決定することが示されています。本研究において我々は、モノクローナル IgG1 および酵素的に改変されたその 8 種類の糖鎖変異体 (グリコバリエーション) のエフェクター機能を系統的に解析しました。糖鎖変異体と FcR の相互作用解析は、単体 (単量体) の抗体、抗原結合型抗体、および免疫複合体 (IC) 形態の IgG のそれぞれについて実施しました。機能的特性に加えて、試験した糖鎖変異体の構造特性に対する糖鎖付加の影響についても検討しました。

その結果、糖鎖パターンが抗体の安定性および各種FcRs との相互作用に明確な影響を与えることを実証しました。過去の報告と一致して、脱糖鎖抗体は高親和性受容体であるFc γ RIを例外として、すべてのFc γ -受容体への結合能を失いました。IgG1 のFc γ RIIIaおよびFc γ RIIIに対する結合活性はガラクトース付加レベルに依存することが観察され、ハイパーガラクトシル化 (高ガラクトース付加) 抗体は受容体相互作用の向上を示しました。シアル化は、試験した IgG の Fc γ R 結合を低下させませんでした。対照的に、抗体のシアル化は Fc γ RIIa および IIb への結合を改善しました。我々はまた、糖鎖付加が IgG1 と FcRn の相互作用にもある程度の影響を与えることを示しています。しかしながら、糖鎖パターンに関わらず、可溶性モノマー標的 (可溶性単量体抗原) と IgG1 との相互作用は、驚くべきことに受容体結合能の低下をもたらしました。本研究では、マルチマー (多量体) リガンドによって誘導された免疫複合体 (IC) が、標的結合抗体の FcR に対する親和性低下を補完することを実証し、FcR を介したエフェクター機能における IC 形成の重要性を示しました。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25378534/>

Haberger M. et al. (2015) Functional assessment of antibody oxidation by native mass spectrometry.

MAbs, 7(5):891-900. doi: 10.1080/19420862.2015.1052199. Epub 2015 May 22.

メチオニン (Met) 残基の酸化は、遺伝子組み換え IgG1 抗体における複数の化学的劣化 (分解) 経路の 1 つです。さまざまな手法を用いた研究により、IgG1 定常領域における Met 酸化が、抗体の半減期に重要であるヒト新生児性 Fc 受容体 (huFcRn) との in vitro での相互作用に影響を与えることが示されてきました。本研究では、酸化ストレス条件の影響を調査するために、全く新しいアプローチを適用しました。溶液中における「近ネイティブ状態」のタンパク質複合体解析法として急速に普及している「ネイティブ質量分析 (native MS)」に対し、定量的な超高速液体クロマトグラフィー質量分析 (UPLC-MS) ペプチドマッピング、従来の表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、および近年開発された FcRn カラムクロマトグラフィーを組み合わせました。質量分析計の電圧および圧力条件を最適化することで気相中での抗体/huFcRn 受容体複合体を安定化させ、酸化された IgG1 サンプルを用いたネイティブ MS 実験を可能にしました。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26000623/>

Walters B.T. et al. (2016) Conformational Destabilization of Immunoglobulin G Increases the Low pH Binding Affinity with the Neonatal Fc Receptor.

J Biol Chem, 291(4):1817-25. doi: 10.1074/jbc.M115.691568. Epub 2015 Dec 1

結晶構造解析の知見は、新生児性Fc受容体 (FcRn) に対するIgG分子のpH依存的な親和性が、主にIgGのヒスチジン残基が関与する塩橋 (ソルトブリッジ) に起因しており、微酸性条件下での適度な親和性をもたらしていることを示唆しています。しかし、この見解は、FcRnへの親和性を最大10倍向上させるYTE変異体 (M252Y/S254T/T256E) など、IgG変異体間に見られる親和性の多様性を十分に説明できません。本研究では、FcRn結合の有無におけるpH 7.0およびpH 5.5での水素交換測定 (HDX) と、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により評価された解離定数、ならびにFcRnアフィニティークロマトグラフィーを比較解析しました。一連の実験結果の組み合わせにより、IgGとその同種YTE変異体との差異は、FcRnに結合する前の「pH感受性の構造ダイナミクス」に依存して変化することが実証されました。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26627822/>

Alt N et al. (2016) Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles.

Biologicals, 44(5):291-305. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.06.005. Epub 2016 Jul 25. Review

クオリティ・バイ・デザイン (QbD: 品質によるデザイン) は、製品の意図した性能を常に確実に達成できるよう、医薬品の製造プロセスおよび管理戦略を計画的に設計することを通じて医薬品開発の強化を目指す、グローバルな規制イニシアチブです。QbDに関連する医薬品開発の原則は、ICHガイドライン (ICH Q8~Q11) に記述されています。ロシュ/ジェネンテック社で構築された一連の統合的なリスク評価およびその関連要素は、遺伝子組み換えモノクローナル抗体の製造における製品およびプロセスに関する知見の全体像を提供するよう設計されました。本章では、バイオ医薬品のQbD開発における重要な第一歩として、「重要品質特性 (CQAs)」の特定について解説します。

科学的根拠に基づいた体系的なリスク順位付けおよびフィルタリング手法を用いることで、品質特性の深い理解が可能となり、医薬品の安全性および有効性に与える影響に応じた重要性の割り当て (設定) が可能となります。本アプローチおよびツールの適用例を示すため、モノクローナル抗体における具体例をいくつか紹介します。CQAの特定は継続的なプロセスであり、今後も治療用タンパク質の構造および機能特性の解析を促進していくものと考えられます。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27461239/>

Jensen P.F. et al. (2017) A Two-pronged Binding Mechanism of IgG to the Neonatal Fc Receptor Controls Complex Stability and IgG Serum Half-life.

Mol Cell Proteomics, 16(3):451-456. doi: 10.1074/mcp.M116.064675. Epub 2017 Jan 6

遺伝子組み換えモノクローナル免疫グロブリン (IgG) の成功は、特定の抗体を高い親和性で標的化する能力と、通常約3週間という極めて長い血清中半減期が組み合わさっていることに起因しています。IgGの薬物動態は、新生児性Fc受容体 (FcRn) のリサイクル機構と密接に関連しています。治療用IgGの長い血清中半減期を実現するには、FcRnとの高度にpH依存的な相互作用のバランスを保ち、弱酸性pHでの効率的なFcRn結合と、生理的pHでの効率的な解離をそれぞれ可能にする必要があります。抗体ブリアキヌマブ (briakinumab) のように、一部のIgGは通常よりも著しく短い約8日という半減期を示します。

本研究では、水素/重水素交換質量分析法 (HDX-MS) とFcRnアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせることで、治療用IgGにおける「過剰なFcRn結合」の分子レベルでの起源 (原因) を解明しました。我々は、ブリアキヌマブのFc領域およびFab領域の両方がFcRnと直接相互作用する「2段階 (2本柱) のIgG-FcRn結合メカニズム」に関する実験的証拠を提示し、過剰なFcRn結合の発生が通常よりも異常に強いFab-FcRn相互作用と関連していることを明らかにしました。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28062799/>

Wang X et al. (2017) Impact of SPR biosensor assay configuration on antibody: Neonatal Fc receptor binding data.

MAbs, 9(2):319-332. doi: 10.1080/19420862.2016.1261774. Epub 2016 Dec 21

ご提示いただいた論文アブストラクト (要約) の日本語訳です。訳例1. 論文・学術文書向け (正確性重視のフォーマルな表現) 新生児性Fc受容体 (FcRn) との結合相互作用は、遺伝子組み換えヒトモノクローナル抗体 (rhUmAb) 医薬品の薬物動態特性を決定づける要因の1つであり、IgG分子の結晶化可能領域 (Fc) に含まれる保存された結合モチーフがFcRnと相互作用します。rhUmAb医薬品とFcRnの相互作用の特性評価には、表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサーアッセイが頻繁に用いられます。このようなアッセイでは、一般的にrhUmAb (フォーマット1) またはFcRnタンパク質 (フォーマット2) のいずれかがバイオセンサーチップ上に固定化されます。しかしながら、場合によってはrhUmAbの可変ドメインもFcRn結合に影響を与える可能性を示す証拠があるため、我々はSPRアッセイの構成 (フォーマット) が結合データに与える影響を評価しました。

我々はこれら2種類のバイオセンサーアッセイフォーマットを用いて、2種類のrhUmAb (rhUmAb1およびrhUmAb2) のFcRnタンパク質に対するFcRn結合特性の評価を試みました。これら2種類のrhUmAbは、Fcドメインにおいて99%以上の配列相同性 (アイデンティティ) を有していますが、Fab領域は異なっています。rhUmAb2は可変ドメインに正電荷パッチを有していますが、rhUmAb1には存在しません。我々の結果は、rhUmAb1のFcRnへの結合がバイオセンサーアッセイの構成に依存しない一方で、rhUmAb2のFcRnへの結合はSPRアッセイの構成に強く依存することを示しました。さらなる解析により、rhUmAb2とFcRnの結合におけるフォーマット依存性は、rhUmAb2の可変ドメインにおいて正電荷パッチを形成する塩基性残基と関連していることが判明しました。本研究は、2つの異なるSPRバイオセンサーアッセイ構成を用いてrhUmAbとFcRnの結合相互作用を解析することの重要性を強調するものです。このアプローチはまた、一見典型的なIgGに見える抗体において、Fc領域以外に起因する非Fc駆動型のFcRn結合相互作用の可能性を特定するための簡便な方法を提供する可能性があります。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28001487/>

Dostalek M, Prueksaritanont T, Kelley RF. (2017) Pharmacokinetic de-risking tools for selection of monoclonal antibody lead candidates. *MAbs*. 9(5):756-766. doi: 10.1080/19420862.2017.1323160. Epub 2017 May 2

薬物動態 (PK) 研究は、創薬および開発のあらゆる段階において重要な役割を果たします。近年の治療用タンパク質の創出および最適化ツールの進歩により、目標製品プロファイル (TPP) の基準を満たす多数の候補化合物が生み出されるようになりました。in silico (コンピュータ予測)、小スケールの in vitro (試験管内評価)、および in vivo (生体内評価) ツールを組み合わせることは、創薬の初期段階において有望な特性を持つ臨床リード分画・分子の特定に役立ち、複数の候補化合物を臨床開発へ進める際の手間とコストを削減します。

本レビューでは、創薬段階で考慮すべきツールについて解説するとともに、モノクローナル抗体を中心に、Fc融合・改変治療用タンパク質の予期せぬ薬物動態挙動のリスクを低減 (デリスク) するために、リード候補創出工程の薬物動態スクリーニングに組み込むべきアプローチについて考察します。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28463063/>

Gahoual R. et al. (2017) Characterization of Monoclonal Antibody Receptor Interaction Using Affinity Liquid Chromatography Hyphenated to Native Mass Spectrometry. *Anal Chem*; 89(10):5404-5412. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00211. Epub 2017 Apr 26

本論文では、遺伝子組み換えモノクローナル抗体 (mAb) の各種修飾が固定化 FcRn 受容体ドメインとの相互作用に与える影響を解析するため、FcRn アフィニティー液体クロマトグラフィー (LC) とエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) をネイティブ条件 (生理的非熱性条件) 下でオンライン結合させた手法について報告します。分析条件は、アフィニティー LC と ESI-MS の双方の要求を満たすよう設計されました。移動相の組成は、対象となるタンパク質をネイティブ条件に維持し、かつ IgG の Fc ドメインと FcRn 受容体の相互作用を適切に再現するための急激な pH 変化を可能にするよう最適化されました。また、ネイティブ MS 解析を実現するため、移動相成分には十分な揮発性が求められました。

MS データにより IgG の擬ネイティブ (pseudonative) な状態の維持が実証され、分離された変異体の同定が可能となりました。様々な酸化ストレスを与えた治療用 mAb に対し、ネイティブ FcRn アフィニティー LC-ESI-MS を実施しました。サンプルの酸化レベルの定量を目的としてネイティブ MS 検出を使用しました。mAb の酸化変異体では、未修飾体 (インタクト体) と比較して保持時間が短くなり、受容体に対する親和性の低下が示されました。本手法は、ネイティブタンパク質レベルでの翻訳後修飾 (PTM) を同定および定量し、それらが FcRn 受容体への結合に与える影響との相関関係を明らかにするうえで好適であることが証明されました。ネイティブ FcRn アフィニティー LC-ESI-MS は、IgG の微小不均一性 (マイクロヘテロジェニティー) の生物学的関連性を評価するのに要する時間を大幅に短縮可能であり、バイオ医薬品の研究開発において価値ある情報を提供します。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28398745/>

Cymer F et al. (2017) Evaluation of an FcRn affinity chromatographic method for IgG1-type antibodies and evaluation of IgG variants. *Bioanalysis*, 9(17):1305-1317. doi: 10.4155/bio-2017-0109. Epub 2017 Sep 13.

目的:

新生児性Fc受容体 (FcRn) は、治療用IgG型抗体の長い血清中半減期を媒介します。この相互作用は薬物動態 (PK) の観点から「重要品質特性 (CQA)」に該当し、適切な品質管理戦略によって包括される必要があります。抗体は非特異的に細胞内へ取り込まれた後、早期エンドソーム内でFcRnと結合することでライソソームによる分解を免れ、再び血液循環へと放出されます。この複雑なリサイクル機構を in vitro (試験管内) のアッセイ戦略へと反映させることは、極めて難易度の高い課題です。

手法:

本研究では、FcRnアフィニティークロマトグラフィー法の適格性評価 (クオリフィケーション) について報告し、初めて「非重要性ウィンドウ (非影響許容域 / noncriticality window)」を確立しました。各種IgG型抗体、サブタイプ、糖鎖アイソフォーム (グリコフォーム)、ならびに変異体 (ミュータント) の解析を実施しました。

結論:

FcRnアフィニティークロマトグラフィー法を用いることで、pH依存的なFcRn相互作用の観点からモノクローナル抗体 (mAb) サンプルの適正な評価が可能となります。さらに、本手法の適用能力 (ポテンシャル) および現時点での限界点についても論じます。

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28901177/>

規制上の免責事項

品質管理または製造プロセスにのみ使用してください。



CustomBiotech

ホームページリンク

文献リストはこちらから
ご覧ください

ジャパンカスタムバイオテック担当者
にお問い合わせください。

©2026

All rights reserved.

発行者

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

〒108-0075 東京都港区港南1-2-70

Japan

japan.custombiotech@roche.com

Tel: 0120-600-152

<https://custombiotech-roche.jp/>

Linked in

