

CONTENTS:

EDITORIAL

Importance of mAb murinization for *in vivo* mouse models

Cell-based assays for screening SARS-CoV-2 therapeutics

PRODUCTS

Mouse Anti-Mouse mAbs

- Immune Checkpoints
 - CTLA-4
 - PD-1
 - PD-L1
- Lymphocyte Markers for Depletion
 - CD3
 - CD4
 - CD8
- Tumor-Associated Antigens
 - gp75

COVID-19 Related Cell Lines

- HEK-Blue™ hACE2 Cells
- A549-hACE2 Cells
- A549-hACE2-TMPRSS2 Cells

InvivoGen

ASIA

Unit 106, 1F,
15W Phase 3, Hong Kong Science Park,
Pak Shek Kok,
Hong Kong

T: +852 3622 3480
F: +852 3622 3483

info.hk@invivogen.com
www.invivogen.com

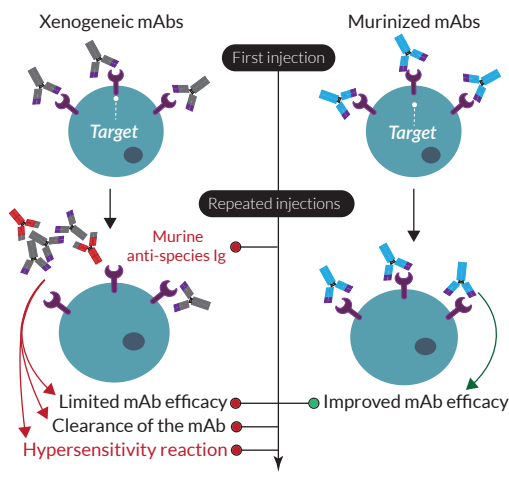
DECEMBER 2020

Inside this issue

今回の insight ニュースレターでは、それぞれ異なる 2 つの製品群について取り上げます。一つ目は、*in vivo* マウス研究用に最適化されたモノクローナル抗体の製品群増加について、二つ目は、SARS-CoV-2 に対する新規治療薬の開発用に特別に設計された COVID-19 (新型コロナウイルス感染症) 関連細胞株の新しいシリーズについてです。

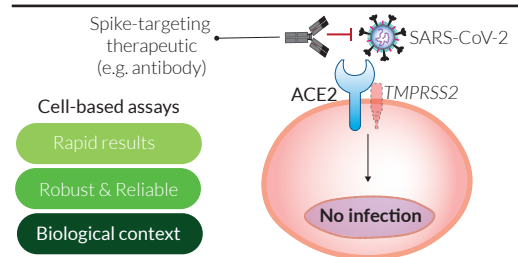
1985 年、FDA (米国食品医薬品局) は臨床用のモノクローナル抗体 (mAb) を初めて承認しました。この mAb は、臓器同種移植に対する拒絶反応を治療するための抗 CD3 抗体でした¹。この mAb はマウス由来だったため、これを投与されたすべての患者はヒト抗マウス免疫グロブリン (Ig) 抗体 (HAMA) 応答を起こし、その使用が著しく制限されました²。この応答は、血液中の mAb の不活性化および排除を引き起こし、結果として治療効力が失われます。また、場合によっては重度の過敏症反応が起こる場合もあります³。この制限を克服するため、ヒトのバックボーン内に相補性決定領域 (CDR) を作製することにより CD3 mAb のヒト化が達成されました⁴。現在、臨床承認された mAb はすべて、さまざまな技術 (例えばヒト化マウス) を使用してヒト化されたものか、または「完全な」ヒト型のものかのいずれかです¹。同様の望ましくない「抗抗体」応答が、マウスに非マウス、つまり異種 (例えばラット/ハムスター) mAb を反復投与した際に報告されています。このマウス免疫応答は、投与された mAb の排除だけでなく、致死的な過敏症反応を引き起こす場合もあります⁵⁻⁷。*in vivo* 前臨床試験に異種 mAb を使用することは、初回ヒト臨床試験向けの最適用量、タイミング、および反復投与の評価に大きな影響を及ぼすことがあります。したがって、ヒト mAb を最適化するために使用されるものと同様の技術が、*in vivo* マウス研究用の mAb に適用されています。まず、非マウス型の定常領域をマウス Ig シーケンスに完全に置換することで mAb を「マウス化」して、キメラ mAb を作製します。

重要なことに、このような改変技術は、投与された mAb の血中濃度半減期を延長するだけでなく、反復投与時の過敏症反応を有意に減少させることが示されています⁷。さらに、マウス化は、可変 CDR のマウス移植によって達成することができます。とはいえ、このようなプロセスは、ヒト化のプロセスと同様に、非常に複雑かつ達成困難なものであり、親和性が低い mAb が得られることもあります。理想的には、完全なマウス型 mAb は、ノックアウト (KO) マウスで目的の遺伝子を標的にすることによって作製可能です。しかし、その標的ノックアウトが胚性致死の場合、この方法は困難です。*in vivo* 研究用の mAb は、組換え技術を用いて、バックボーンのマウス化や、最適なエフェクター機能を持つようなアイソタイプ置換により、大幅に改善させることができます。



COVID-19 の世界的な蔓延に伴い、中和抗体、阻害性低分子、ワクチンなどの特異的治療法の開発を急速に進めるための世界的な取り組みが、これまでに加速しています。そのような研究の大半は、SARS-CoV-2 抗原性スパイクタンパク質と宿主受容体 ACE2 との相互作用を遮断することによって、宿主細胞へのウイルス侵入を阻害する方法を見出すことに向けられてきました。

COVID-19 に有効な治療法を開発する上での重要なステップは、迅速で信頼性が高く頑健なプラットフォームを使用して有効性を検証することです。この目的を達成するため、さまざまな種類の *in vitro* アッセイが開発されています。その中でも、細胞ベースアッセイ (CBA) は、生化学アッセイと比較して、*in vivo* の生物学的文脈により即した重要な利点を提示するため、創薬プロセスを加速させるとともに、必要な動物実験の件数を減らすことができます。



InvivoGen社は、ハイスループットに対応し、かつ特にSARS-CoV-2を感染させることができるよう設計された、ユニークな細胞株の製品を開発しました。これらの細胞株は、一般的に使用されるHEK293細胞株と、COVID-19との関連性がより高いA549肺細胞株という、2つの異なる特徴を持つ細胞に由来しています。HEK293細胞はACE2を発現するように改造されている一方、A549細胞はACE2とスパイク切断プロテアーゼTMPRSS2の両方をトランスフェクションされており、最適な許容性を備えています。これらの細胞におけるACE2の発現は、組換えスパイク-(S1)-Fcタンパク質を用いたフローサイトメトリー結合アッセイで確認されています。また、これらの細胞株の許容性を検証するため、スパイク擬型GFPレンチウイルス粒子、および中和mAbを含む種々の潜在的阻害剤を用いた阻害アッセイが実施されました。重要なことに、これらのCBAの信頼性および再現性は、スパイクタンパク質の2つの変異体 (D614またはG614) を発現する粒子を用いて得られたデータから確認されています。現在、InvivoGen社のCOVID-19関連細胞株、およびそれらの開発に使用された各種ツールをご利用いただくことができます。

REFERENCES

1. Almagro, J.C. et al. 2017. Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. *Front Immunol* 8, 1751.
2. Kimball, J.A. et al. 1993. OKT3 antibody response study (OARS): a multicenter comparative study. *Transplant Proc* 25, 558-560.
3. Shawler, D.L. et al. 1985. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol* 135, 1530-1535.
4. Adair, J.R. et al. 1994. Humanization of the murine anti-human CD3 monoclonal antibody OKT3. *Hum Antibodies Hybridomas* 5(1-2):41-7.
5. Mall, C. et al. 2016. Repeated PD-1/PD-L1 monoclonal antibody administration induces fatal xenogeneic hypersensitivity reactions in a murine model of breast cancer. *Oncimmunology* 5, e1075114.
6. Murphy, J.T. et al. 2014. Anaphylaxis caused by repetitive doses of a GITR agonist monoclonal antibody in mice. *Blood* 123, 2172-2180.
7. Belmar, N.A. et al. 2017. Murinization and H Chain Isotype Matching of the Anti-GITR Antibody DTA-1 Reduces Immunogenicity-Mediated Anaphylaxis in C57BL/6 Mice. *J Immunol* 198, 4502-4512.

Mouse Anti-Mouse InvivoFit™ mAbs

*in vivo*用モノクローナル抗体 (mAb) は通常、他の種 (例えばラットやハムスター) で作製されます。したがって、それらがマウスに注入されると、異物として認識されます。このような非マウス (すなわち異種) 抗体をマウスに反復投与すると、マウスは免疫応答を起こし、免疫原性による抗体産生を引き起こします。これによって、投与された mAb の有効性の制限などの望ましくない効果が引き起こされ、最終的には致死的な炎症誘発性過敏症反応が起こります。InvivoGen 社は、*in vivo*での免疫原性を制限するため、マウス抗マウス mAb の製品を設計しました。

Murinization for reduced toxicity *in vivo*

mAb のマウス化には、非マウス由来のシーケンスを、対応するマウスのシーケンスに置き換える必要があります。InvivoGen 社は、抗ヒト/ラット/ハムスター mAb の非マウス定常領域をマウス IgG シーケンスに置き換えることによって、一連の mAb をマウス化しました。したがって、InvivoGen 社のマウス抗マウス mAb は以下の特徴を有しています。

- ❖ 免疫原性による応答の低減
- ❖ 投与された mAb の血中濃度半減期の長期化
- ❖ 毒性・過敏症反応の低減

マウスに異種 mAb を反復投与すると、まず、定常領域に対する用量依存的な免疫応答が起こります。最終的に、この応答は分子全体に対して起こります。マウスで免疫原性による抗体産生が起こると、投与された mAb が血液中で排除され、それによって mAb の *in vivo* の有効性が低下します。さらに、この免疫原性は致死的な過敏症反応を引き起こす場合があります。特に、この応答は、免疫チェックポイントを標的とする異種 mAb (例えば PD-1/PD-L1⁵ および GITR^{6,7}) の研究で記述されており、マウス mAb (すなわち抗 mCLTA4) に対する望ましくない応答は認められていません。これらの研究では、マウスへの 3 度目または 4 度目の mAb 投与時に、不活発、立毛、呼吸困難、体温の急激な低下などの過敏症反応関連の兆候が示されました⁵⁻⁷ (以下の社内データ参照)。重要なことに、mAb のマウス化によって、投与された mAb が血液中に長く留まることができ、さらには過敏症反応が低減されることが示されています⁷。

LIMITED RISK OF A HYPERSENSITIVITY REACTION WITH A MURINIZED ANTIBODY

マウスにおける非種性応答の誘導を実証するため、エフェクター機能のないヒトアテゾリズマブ由来の抗PD-L1 mAbと、これをマウス化したものとを比較しました (図1参照)。非マウスmAb処理群では、4度目の投与から約30分後に、体温の低下 (赤線) に加えて、その他の過敏症反応の症状が観察されました。これらのマウスは、介入 (外部からの加熱など) によって生存しました。一方、マウス化mAb処理群は、ネガティブコントロール (青線) と同様の体温 (紫線) を維持し、過敏症反応の兆候を示しませんでした。

Recombinant production for increased quality

市販されている *in vivo* 研究用の mAb は、そのほとんどがハイブリドームで産生されており、軽鎖の交換や細胞誘導といった難点を多く抱えています⁸。InvivoGen 社は、これらの問題を克服するために組換え技術を使用しています (図2参照)。さらに、この技術を使用することで、*in vivo*での有効性が高まることを証明された最適なフォーマットに、オリジナルのアイソタイプを置き換えることが可能になります⁹。

- ❖ ロット間の構造の一貫性
- ❖ 最適化されたアイソタイプフォーマット

InvivoGen 社のマウス抗マウス mAb は CHO 細胞 (ウイルスフリーを確認済み) で発現および産生されており、信頼性と再現性を確保しています。

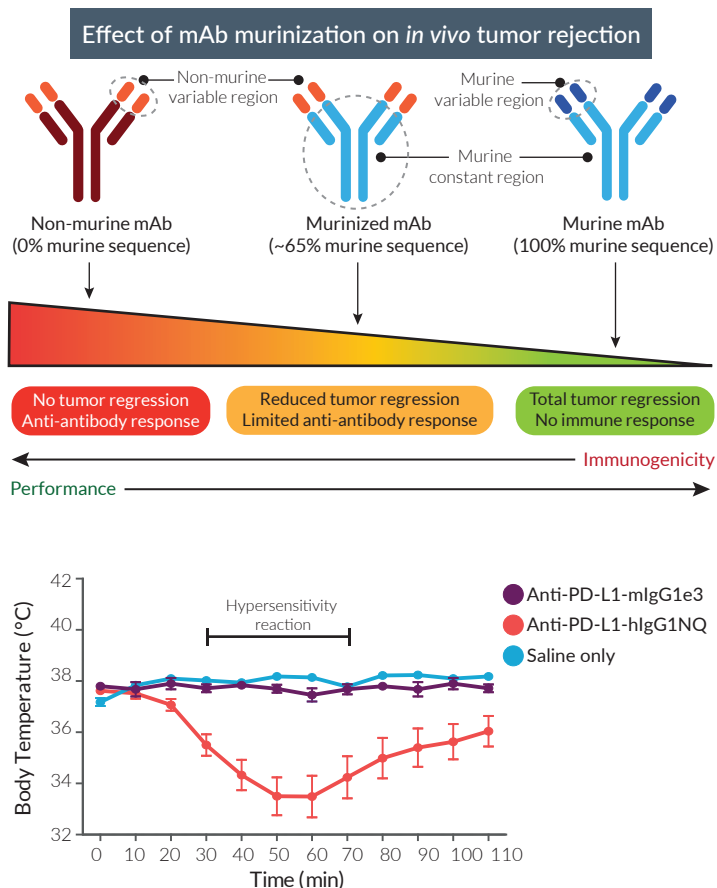
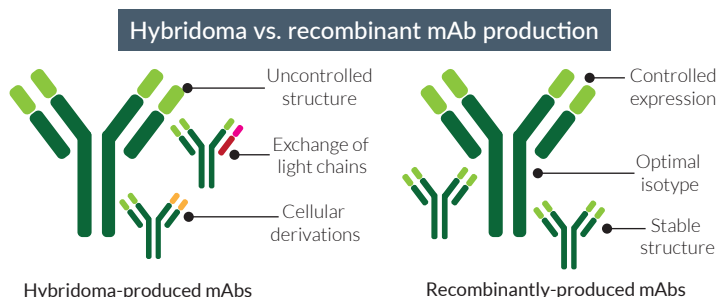


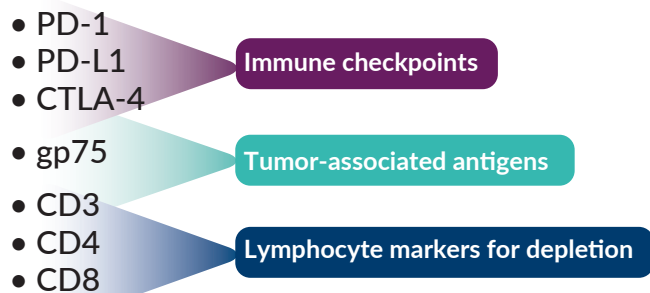
Fig 1: Body temperature comparison between human and murinized Anti-PD-L1 mAb after IP4. BALB/c mice aged 10 weeks were challenged subcutaneously with 2×10^5 CT26 cells. After 8 days, Anti-PD-L1-mIgG1e3 (murine) or Anti-PD-L1-hIgG1NQ (human) was administered intraperitoneally (IP) into the mice in sterile PBS (200 µg/mouse). IP injections were then performed twice a week for 3 weeks. After IP4, rectal temperature measurements were taken every 10 minutes for all groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM.



REFERENCES CONTINUED

8. Bradbury, A. et al. 2018. When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *mAbs*, 10(4), 539–546. 9. Selby, M.J. et al. 2013. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res.* 1(1):32–42.

InvivoGen社は、以下に示すようなさまざまな免疫チェックポイント(IC)、腫瘍関連抗原、または細胞枯渴用のリンパ球マーカーを標的とする高品質のマウス抗マウスmAbを提供し、その品目数を拡大し続けています。



InvivoGen社のマウス由来の抗マウス mAb はすべて、組換え技術によって作製されています。マウス由来の mAb の一部(例: 抗 mCTLA4)は、オリジナルのアイソタイプを、*in vivo* での有効性を最適化するフォーマットに置き換えています(すなわち IgG2b 対 IgG2a)⁹(図 3 参照)。その他の抗ヒト/ラット/ハムスター mAb については、非マウス定常領域全体をマウス IgG シーケンスに置き換えました。さらに、InvivoGen 社では、同一のエフェクター機能が維持されていることを確認しています。例えば、エフェクター機能のない PD-L1 mAb (アテゾリズマブ) 由来の抗 PD-L1 mAb のマウス IgG1e3 アイソタイプは、エフェクター機能を完全に喪失させる変異を含むように設計されています。

InvivoGen 社では、一貫性のある高品質のマウス抗マウス mAb を確実に研究にご使用いただけるように、厳格な品質管理を行っています。

- ❖ 高い純度 (>95%)
- ❖ 低い凝集性 (<5%)
- ❖ 無菌
- ❖ ロット間で再現性のある標的結合

InvivoGen 社の製品は、*in vivo* 研究のために特別に設計された高品質の基準を示す InvivoFit™ グレードで提供されています。この基準は、InvivoGen 社のマウス抗マウス mAb が無菌およびエンドトキシンフリー (<1 EU/mg) であることが保証されていることを意味しています。

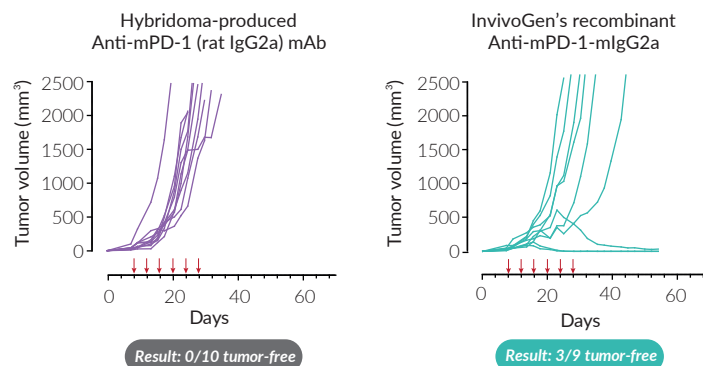


Fig 2: Tumor growth after treatment with a hybridoma-produced or recombinantly-produced Anti-PD-1 mAb. BALB/c mice aged 10 weeks were challenged subcutaneously with 2×10^5 CT26 cells. After 8 days, InvivoGen's Anti-PD-1-mlgG1e3 or a hybridoma-produced Anti-PD-1 mAb was administered intraperitoneally (IP) into the mice in sterile PBS (200 µg/mouse). Following this, IP injections were performed twice a week for 3 weeks (red arrows). Tumor growth was monitored for 60 days.

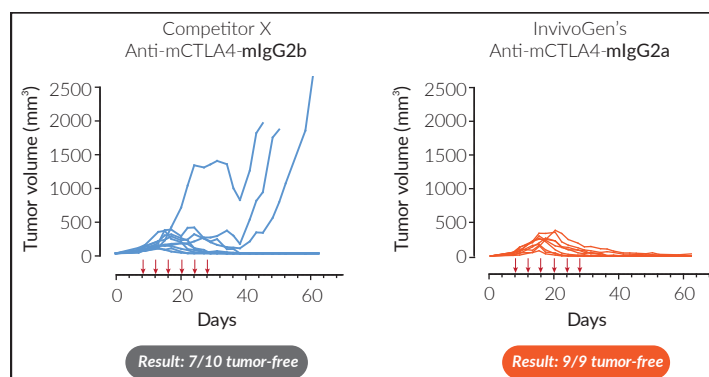


Fig 3: Tumor growth after treatment with a murine Anti-CTLA4-mlgG2b and Anti-CTLA4-mlgG2a mAb. BALB/c mice aged 10 weeks were challenged subcutaneously with 2×10^5 CT26 cells. After 8 days, InvivoGen's Anti-mCTLA4-mlgG2a or Competitor X's Anti-mCTLA4-mlgG2b mAb was administered intraperitoneally (IP) into the mice in sterile PBS (200 µg/mouse). Following this, IP injections were performed twice a week for 3 weeks (red arrows). Tumor growth was monitored for 60 days.

PRODUCT	DESCRIPTION	QTY	CAT. CODE
<i>In vivo</i> depletion mAbs			
Anti-mCD3-mlgG2a InvivoFit™ NEW	145-2C11-derived mouse mAb against murine CD3	1mg / 10 mg	mcd3-mab10-1 / -10
Anti-mCD4-mlgG2a InvivoFit™ NEW	GK1.5-derived mouse mAb against murine CD4	1mg / 10 mg	mcd4-mab10-1 / -10
Anti-mCD8-mlgG2a InvivoFit™ NEW	YTS169.4-derived mouse mAb against murine CD8	1mg / 10 mg	mcd8-mab10-1 / -10
<i>In vivo</i> immune checkpoint blocking mAbs			
Anti-mCTLA4-mlgG2a InvivoFit™	9D9-derived mouse mAb against murine CTLA-4	1mg / 10 mg	mctla4-mab10-1 / -10
Anti-mPD-1-mlgG1e3 InvivoFit™	RMP1-14-derived mouse mAb against murine PD-1	1mg / 10 mg	mpd1-mab15-1 / -10
Anti-PD-L1-mlgG1e3 InvivoFit™	Murinized atezolizumab mouse mAb against PD-L1	1mg / 10 mg	pdl1-mab15-1 / -10
<i>In vivo</i> tumor-associated antigen mAbs			
Anti-mgp75-mlgG2a InvivoFit™	TA99-derived mouse mAb against murine gp75	1mg / 10 mg	mgp75-mab10-1 / -10
<i>In vivo</i> isotype controls			
Anti-β-Gal-mlgG1e3 InvivoFit™	Mouse IgG1e3 isotype control	1mg / 10 mg	bgal-mab15-1 / -10
Anti-β-Gal-mlgG2a InvivoFit™	Mouse IgG2a isotype control	1mg / 10 mg	bgal-mab10-1 / -10



InvivoGen offers **bulk quantities** of mAbs in our mouse anti-mouse collection **upon request**. Please [contact us](#) for more information.

To learn more about our mouse anti-mouse mAb collection visit:



www.invivogen.com/mouse-anti-mouse-mabs

COVID-19-Related Cell Lines

SARS-CoV-2 (2019-nCoV) は新しい β コロナウイルスであり、COVID-19 (新型コロナウイルス感染症) の世界的大流行 (パンデミック) を引き起こしている病原体です。InvivoGen 社は、このウイルスの研究に利用できる細胞株の品目数を拡大しています。これらの細胞は、一般的に使用されるヒト胎児腎細胞 293 (HEK293) 細胞株、および生物学的関連性の高いヒト A549 肺がん細胞株の 2 つの細胞モデルに由来します。

- HEK-Blue™ hACE2 Cells **NEW**
- A549-hACE2-TMPRSS2 Cells **NEW**

- ❖ SARS-CoV-2 宿主受容体の過剰発現を確認済み
- ❖ 感染アッセイで機能性を検証済み
- ❖ SARS-CoV-2 阻害剤のスクリーニング用に設計

HEK-Blue™ hACE2 および A549-hACE2-TMPRSS2 細胞は、細胞表面に高レベルのヒト (h)ACE2 を発現し、SARS-CoV-2 を感染させることが可能です。ACE2 発現 HEK293 細胞に TMPRSS2 を添加しても感染許容性は亢進しないのに対して、それを ACE2 発現 A549 細胞 (A549-hACE2 細胞) に添加すると、感染性は有意に向上します (図 1 参照)。これらの細胞株はハイスループットに対応し、SARS-CoV-2 と宿主細胞との相互作用を遮断する新規低分子阻害剤、または回復期の COVID-19 患者から単離された中和抗体のスクリーニングに適しています (図 2 参照)。

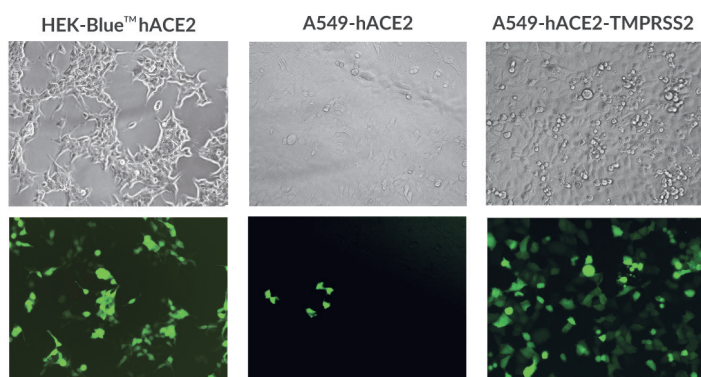


Fig 1: Infection by SARS-CoV-2 Spike pseudotyped lentiviral particles. HEK-Blue™ hACE2, A549-hACE2, and A549-hACE2-TMPRSS2 cells were cultured in the presence of SARS-CoV-2 Spike-D614 (HEK293) or Spike-G614 (A549) pseudotyped GFP lentiviral particles. After 72 hours, the transduction efficiency of the Spike-pseudotyped GFP particles was evaluated by fluorescence microscopy.

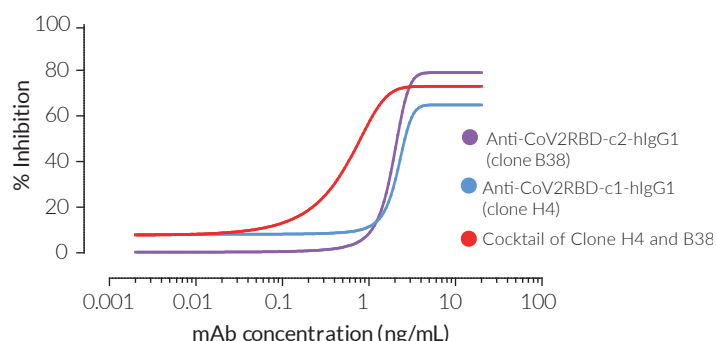
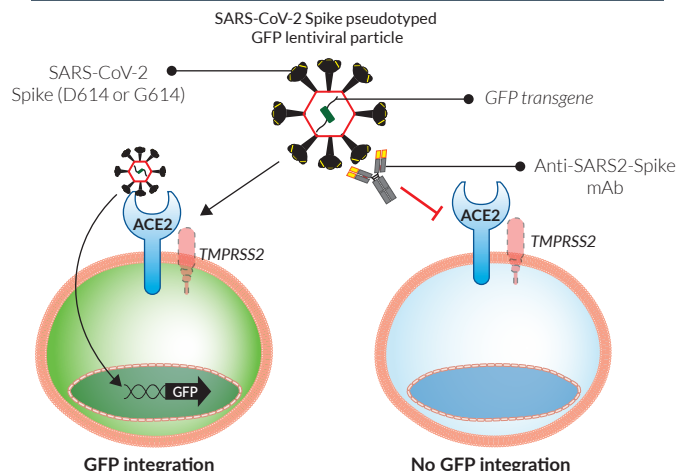


Fig 2: Neutralization ability of Anti-SARS-CoV-2 Spike-RBD mAbs. SARS-CoV-2 spike-RBD targeting mAbs (clones H4 & B38) were incubated with Spike (G614)-pseudotyped lentiviral particles for 1 hour at 37°C. Following this, HEK-Blue™ hACE2 cells were added and incubated for 72 hours. Infection (GFP fluorescence) was then measured using flow cytometry. Data are presented as % inhibition of infection compared to a no antibody control.

Application of cell-based assays for SARS-CoV-2 research



PRODUCT	QTY	CAT. CODE
HEK-Blue™ hACE2 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-hace2
A549-hACE2-TMPRSS2 Cells	3-7 x 10 ⁶ cells	a549-hace2tpsa
A549-hACE2 Cells (control)	3-7 x 10 ⁶ cells	a549-hace2



COMING SOON

A549 細胞は機能性 RNA センシング経路を発現するため、SARS-CoV-2 感染に対する宿主応答の研究に有用な細胞モデルになります。InvivoGen 社は、NF- κ B および IRF 依存性 SEAP、ならびにルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現する A549-Dual™ hACE2-TMPRSS2 細胞のシリーズを開発しました。これらの細胞では、RNA ウイルスの自然受容体である RIG-I または MDA5 がノックアウトされています。そのため、SARS-CoV-2 感染におけるこれらの受容体の役割を理解するのに最適な細胞です。

- A549-Dual™ hACE2-TMPRSS2
- A549-Dual™ KO-RIG-I hACE2-TMPRSS2
- A549-Dual™ KO-MDA5 hACE2-TMPRSS2

OTHER PRODUCTS YOU MAY NEED

pLV-SARS2-S-d19	Spike D614 pseudotyping vector
pLV-SARS2-S-d19 (D614G)	Spike G614 pseudotyping vector
Anti-CoV2RBD-c1-hlgG1	SARS-CoV-2 mAb (clone H4)
Anti-CoV2RBD-c2-hlgG1	SARS-CoV-2 mAb (clone B38)

For a complete list of SARS-CoV-2 related research tools visit:



www.invivogen.com/covid-19

InvivoGen

Europe Tel: +33 562 71 69 39
USA Tel: +1 888 457 5873
Asia Tel: +852 3622 3480

Fax: +33 562 71 69 30
Fax: +1 858 457 5843
Fax: +852 3622 3483

info.eu@invivogen.com
info@invivogen.com
info.hk@invivogen.com