

JANUARY 2019

SUMMARY :

REVIEW

Immune Checkpoint Blockade: InestimAble advances

PRODUCTS

Immune Checkpoint Anti-human Antibodies

- Anti-hCTLA4 Isotype Family
- Anti-hPD1 Isotype Family
- Anti-hPD-L1 Isotype Family

ADCC Reporter Cell-Based Assay

- Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 Cells
- Raji-hCTLA4 Cells
- Raji-hPD-1 Cells
- Raji-hPD-L1 Cells

pTRIOZ Plasmids

Zeocin™

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

Immune Checkpoint Blockade: InestimAble Advances

過去 10 年間で、T 細胞応答の制御における重要なステップを理解することにより、がんを戦う免疫チェックポイント阻害モノクローナル抗体 (mAbs) という画期的な開発がもたらされた。FDA により承認された初の mAb は、メラノーマおよび非小細胞肺癌に対し、前例に見えない寛解をもたらしたが、奏効率 (10% ~ 90%) にはかなりのばらつきがあり、有意な毒性もある^{1,2}。癌治療におけるこの革命は現在、新規の IC ベースの治療戦略の基礎となっている。

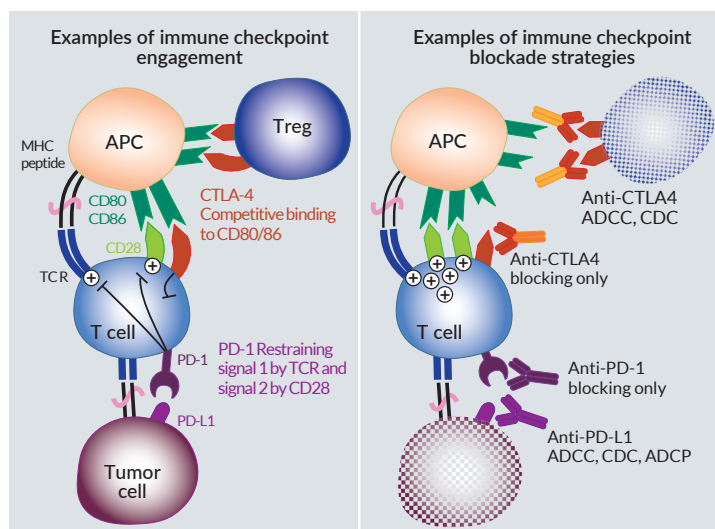
T 細胞応答は最初、T 細胞受容体 (TCR) による抗原提示細胞 (APCs) 上にある MHC : ペプチド複合体の認識に依存する。共刺激分子および共抑制分子のさらなる関与により、T 細胞活性の開始および抑制が引き起こされる。これらの分子は、その機能のとおりに「免疫チェックポイント」(IC) と呼ばれている。初期の研究では、共抑制性 CTLA-4 (細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4) および PD-1 (プログラム細胞死タンパク質 1) 受容体による免疫抑制ブレーキの緩和に焦点が当てられていた³。CTLA-4 は、活性化 T 細胞および制御性 T 細胞 (Treg) で発現しており、刺激性 CD28 リガンド (CD80/CD86) に対して競合的に結合する。PD-1 は、活性化され疲弊した T 細胞で発現しており、そのリガンドである PD-L1 および PD-L2 と結合する。この結合により、SHP2 を介した近位シグナル伝達エレメントの脱リン酸化によって TCR シグナル伝達を直接阻害する³。注目すべきことに、最近の発見では、CD28 を CTLA-4 および PD-1 の両方に対する集中的な制御標的として捉え、PD-1 が腫瘍内 T 細胞輸送を制御することに注目が集まっている³。

治療用 IC 阻害剤 mAbs は、それらの構造に固有の二重の活性を有する。すなわち、可変領域は IC エピトープに結合するが、Fc 領域 (fragment crystallizable) は先天性エフェクター細胞上の Fc 受容体 (ADCC : 抗体依存性細胞傷害、ADCP : 抗体依存性細胞食作用) および補体分子 C1q (CDC : 補体依存性細胞傷害) との選択的相互作用を通して標的細胞死を媒介する⁴。現在までに承認されている IC-mAb は IgG1 と IgG4 であり、標的細胞を保護または殺傷するため、必要性に応じて使い分けられる⁵。抗 CTLA4 イビリ

ムマブと抗 PDL1 アテゾリズマブは、それぞれ Treg と腫瘍細胞の枯渇を優先的に引き起こすことが期待される IgG1 である^{1,3}。対照的に、抗 PD1 ニボルマブとペムブロリズマブは、主に PD-1 とそのリガンドとの相互作用を阻害することによって作用する、エフェクター機能の低い修飾 IgG4 である^{1,5}。まとめると、これらの IC-mAb はエフェクター T 細胞の活性をよりいっそう高める。このため、抗 CTLA4 および抗 PD1/PDL1 の併用が生存率を改善させる^{1,3}。

IC 免疫療法の課題は、より大規模ながん患者パネルにおける mAb 奏効率の改善である。第一のアプローチは、Fc 領域のエンジニアリングを介して mAb の機能を調節することである (次ページ参照)。例えば、アテゾリズマブは、その阻害活性を保持しているが細胞傷害性機能がない非グリコシル化 IgG1 である³。エフェクター機能を増強または抑制した新しい抗 CTLA4 mAb も開発されており、この臨床試験が進行中である¹。T 細胞上のより多くの共刺激分子 (例えば、LAG3、TIM-3、TIGIT、VISTA) を標的とする他の戦略についても、それらの生物学的役割は完全には理解されていないものの、臨床試験が開始されている^{3,7}。次世代の治療用 mAb には、エフェクター応答を増強するような、T 細胞上の共刺激分子 (OX40、ICOS、GITR、4-1BB、CD40) を標的とするアゴニスト剤も含まれている^{3,7}。重要なことに、上述のアプローチの組み合わせは大きく期待されている⁷。

抗腫瘍免疫療法の将来は、T 細胞に加えて、その他のエフェクター細胞 (例えば、ナチュラルキラー細胞、好中球) の利用を含む複数レベルでの応答の誘導にかかっている。一例として、抗 NKG2A モナリズマブは、ナチュラルキラー細胞および細胞傷害性 T 細胞のサブセットの抑制性シグナル伝達を遮断し、さらに他の治療用 mAb を増強する⁸。信頼できる予測バイオマーカーの同定、ならびに IC 療法と他の免疫療法 (例えば、養子 T 細胞療法、腫瘍溶解性ウイルス、パターン認識受容体に対するアゴニスト) や放射線療法/化学療法との併用によって、奏効率を究極的に最大化できる可能性がある⁹。



1. Kavelansky J and Pavlick A.C. 2017. Beyond checkpoint inhibitors: the next generation of immunotherapy in oncology. *AJHO*. 13(2):9.
2. Ribas A. and Wolchok J.D. 2018. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 359:1350.
3. Wei, S.C. et al. 2018. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov*. 8(9):1069.
4. Quast I. et al. 2017. Regulation of antibody effector functions through IgG Fc N-glycosylation. *Cell. Mol. Life. Sci.* 74(5):837.
5. Almagro, J.C. et al. 2018. Progress and challenges in the design and clinical development of antibodies for cancer therapy. *Front. Immunol.* 8:1751.
6. Whang, X. et al. 2018. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell*. 9:63.
7. Donini, C. et al. 2018. Next generation immune-checkpoints for cancer therapy. *J Thorac Dis.* 10 (suppl 13): S1581.
8. André P. et al. 2018. Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells. *Cell*. 175:1731.
9. Marshall H.T. and Djamgoz B.A. 2018. Immuno-oncology: emerging targets and combination therapies. *Front. Oncol.* 8:315.

Immune Checkpoint Antibodies

InvivoGen 社では、免疫チェックポイント (IC) を阻害する治療用モノクローナル抗体 (mAbs) の研究開発ニーズを満たすため、CTLA-4、PD-1、または PD-L1 を標的とした、臨床適用が可能な mAb シリーズを提供している。mAb は、オリジナルフォーマット、または改変エフェクター機能を付加した変異/遺伝子操作した抗体 (アイソタイプ) として提供されている。

- Anti-hCTLA4 Isotype Family
- Anti-hPD1 Isotype Family
- Anti-hPD-L1 Isotype Family

InvivoGen 社の IC mAb は、承認された免疫チェックポイント阻害剤 (ICIs、表を参照) の Fab (フラグメント抗原結合) 領域と、さまざまな免疫グロブリンアイソタイプ (オリジナルを含む) の Fc (結晶性フラグメント) 領域 (下記参照) で構成されている。ICI が誘導するさまざまなエフェクター機能には、ADCC (抗体依存性細胞傷害)、ADCP (抗体依存性細胞食作用)、および CDC (補体依存性細胞傷害) がある。標的細胞の保護または殺傷の必要性に応じ、Fc 領域の修飾を通して ICI の機能を調節できる。

InvivoGen 社の IC 抗体は、完全ヒト mAb である。これらは DNA 組換え技術により作製され、CHO 細胞中で産生される。シークエンス、アイソタイプ、および結合活性は徹底的に検証されている。

InvivoGen ICI isotypes

	Native isotypes			Engineered isotypes		
	IgG1	IgG2	IgA2	IgG1Nq	IgG1fut	IgG4 (S228P)
ADCC	++	+/-	+/-	-	++++	+/-
ADCP	+++	+/-	+	-	+++	+
CDC	++	+	-	+/-	++	-

強力なエフェクター機能を誘導するアイソタイプ

IgG1 は、承認された mAb 治療薬 (例えば、抗 CTLA4 イピリムマブおよび抗 CD20 リツキシマブ) の大部分を占めるアイソタイプである。IgG1 は、強力な ADCC、ADCP、および CDC を誘導するため、液性免疫および細胞性免疫の両方に関与できる。グリカン・シークエンスの脱フコシル化 (**IgG1fut**) によって、IgG1 誘導 ADCC を増強させることができる。特定の CHO 細胞株を用いて得られるこの修飾は、mAb の Fc γ RIIIa/CD16 への結合を増強する。承認された抗 CD20 オビヌツズマブは、フコース含量を低減した遺伝子操作 mAb である。また現在、イピリムマブの非フコシル化変異体の臨床試験が実施されている。

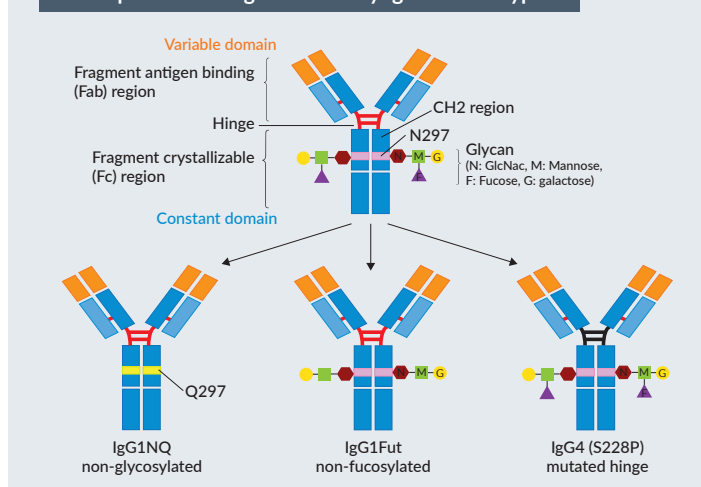
低エフェクター機能を誘導するアイソタイプ

IgG1Nq および **IgG1 (N298A)** は、CH2 領域のグリコシル化部位で、それぞれ 297 位 (アスパラギン (N) からグルタミン (Q)) および 298 位 (アスパラギン (N) からアラニン (A)) に変異を有する遺伝子操作アイソタイプである。抗 PD-L1 アテゾリズマブなどのこれらの非グリコシル化 mAb は、主に阻害剤として作用する。それらは ADCC も ADCP も誘導せず、最小の CDC のみを誘導する。

IgG2 は、ADCC および ADCP 誘導が弱い、CDC 機能はある程度保持している。臨床試験中のトレメリムマブは、CTLA4 を標的とする IgG2 である。**IgG4 (S228P)** は、ADCC および ADCP が低く、CDC を示さない IgG4 遺伝子操作アイソタイプである。ヒンジ領域の 228 位では、セリンをプロリンに置換する (S228P) ことにより、IgG4 分子間で頻繁に生じる Fab アーム交換を妨げる。抗 PD-1 ニボルマブやペムブロリズマブなどの IgG4 (S228P) mAb は、主に阻害剤として作用する。

IgA2 は、低 ADCC および ADCP を誘導し、CDC は、誘導しない非変性アイソタイプである。IgA は、臨床試験はまだ実施されていないが、前臨床試験で有望な結果を示している。

Examples of Strategies to Modify IgM Ab Isotypes



PRODUCT

CAT. CODE

Anti-hCTLA4 antibodies, variable regions of ipilimumab

Anti-hCTLA4-hIgG1	hctla4-mab1
Anti-hCTLA4-hIgG1Nq	hctla4-mab12
Anti-hCTLA4-hIgG1fut	hctla4-mab13
Anti-hCTLA4-hIgG2	hctla4-mab2
Anti-hCTLA4-hIgG4 (S228P)	hctla4-mab14
Anti-hCTLA4-hIgA2	hctla4-mab7

Anti-hPD1 antibodies, variable regions of nivolumab

Anti-hPD1-Ni-hIgG1	hpd1ni-mab1
Anti-hPD1-Ni-hIgG1Nq	hpd1ni-mab12
Anti-hPD1-Ni-hIgG1fut	hpd1ni-mab13
Anti-hPD1-Ni-hIgG2	hpd1ni-mab2
Anti-hPD1-Ni-hIgG4 (S228P)	hpd1ni-mab114
Anti-hPD1-Ni-hIgA2	hpd1ni-mab7

Anti-hPD1 antibodies, variable regions of pembrolizumab

Anti-hPD1-Pem-hIgG1	hpd1pe-mab1
Anti-hPD1-Pem-hIgG1Nq	hpd1pe-mab12
Anti-hPD1-Pem-hIgG2	hpd1pe-mab2
Anti-hPD1-Pem-hIgG4 (S228P)	hpd1pe-mab14
Anti-hPD1-Pem-hIgA2	hpd1pe-mab7

Anti-hPD-L1 antibodies, variable regions of atezolizumab

Anti-hPD-L1-hIgG1	hpd1l-mab3
Anti-hPD-L1-hIgG1 (N298A)	hpd1l-mab12
Anti-hPD-L1-hIgG1fut	hpd1l-mab13
Anti-hPD-L1-hIgG2	hpd1l-mab2

すべての抗体は 100 μ g 単位で提供しており、要望に応じて、より大きい単位での提供が可能です。

InvivoGen 社の組換え抗体アイソタイプファミリーの全リストについては、InvivoGen 社のウェブサイト参照してください。



www.invivogen.com/antibody-isotypes

ADCC Reporter Cell-Based Assay

NEW

InvivoGen 社の抗体依存性細胞傷害 (ADCC) レポーター細胞ベースのアッセイは、主にナチュラルキラー (NK) 細胞の細胞傷害活性に依存する従来のアッセイに代わるものである。InvivoGen 社のバイオアッセイでは、ADCC 誘導における初期のシグナル伝達事象である NFAT (活性化 T 細胞の核因子) 活性化を測定できるように設計されたヒト T 細胞株を使用している。ADCC 誘導のレベルは、NFAT 依存性 Lucia ルシフェラーゼ・レポータータンパク質が生成する生物発光シグナルとして測定される。

- ❖ **堅牢かつ高い信頼性**：再現性の高い結果
- ❖ **迅速性**：1 日で実施可能なバイオアッセイ (インキュベーション時間は計 7 時間)
- ❖ **簡便性**：
 - InvivoGen 社のさまざまな標的細胞の中から選択可能
 - 標的細胞とエフェクター比率が最適
- ❖ **高い費用対効果**：無制限の細胞株の使用

ADCC は、NK 細胞など Fc 受容体を有するエフェクター細胞が、細胞の表面に抗原を発現する抗体被覆標的細胞を認識し殺傷する免疫機構である。ADCC は、抗原に結合した抗体と免疫エフェクター細胞の表面にある Fc 受容体 CD16A (FcγRIIIA) との間に架橋することで引き起こされる。これらの相互作用は、細胞内カルシウム濃度の増加および核への NFAT 転写因子の移行を誘発し、そこで ADCC 関連遺伝子のプロモーター領域に結合することができる。

Reporter effector cell line

● Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 Cells

InvivoGen 社の Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 細胞は、ヒト T リンパ球 Jurkat 細胞株を操作して作製されている。それらは、細胞表面 Fc 受容体 CD16A (FcγRIIIA, V158 高親和性アロタイプ) と共に、最小プロモーターおよび 6 つの NFAT 応答エレメントの制御下で、Lucia ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を安定的に発現する。Jurkat 細胞は、機能的な NFAT 経路を自然に発現する。

Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 細胞は、さまざまな標的細胞および特異的 mAb アイソタイプとの組み合わせで機能的に試験され、EC₅₀ の低さは、より高い ADCC 効力と相関している。

これらの細胞は Blasticidin および Zeocin™ に耐性がある。

Immune Checkpoint Inhibitor Target Cells

- Raji-hCTLA4 Cells
- Raji-hPD-1 Cells
- Raji-hPD-L1 Cells

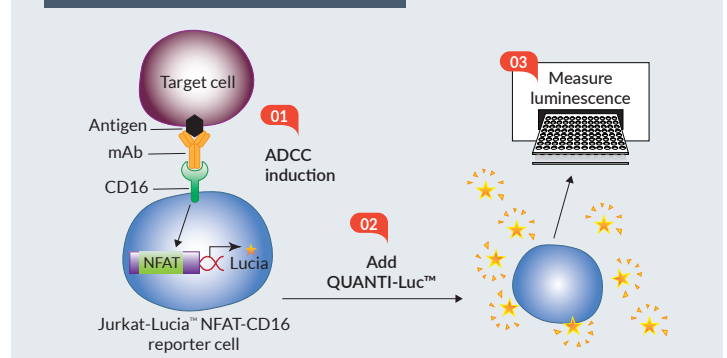
これら 3 つの細胞株は、Raji (ヒト B 細胞リンパ球) 由来の標的細胞に属しており、ヒト CTLA-4、ヒト PD-1、ヒト PD-L1 などの免疫チェックポイントタンパク質だけでなく、HER2、EGFR、CD20 (Raji 細胞によって天然に発現される抗原) などの腫瘍抗原* も安定して発現する。

Raji-hCTLA4、Raji-hPD-1、および Raji-hPD-L1 は、遺伝子操作されたアイソタイプを特徴とする免疫チェックポイント抗ヒト抗体の品質管理の一部として InvivoGen 社でも使用されている。

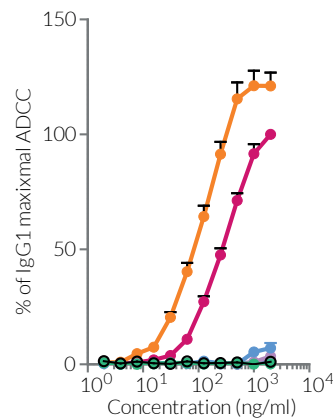
これらの細胞は Blasticidin に耐性がある。

PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 cells	3-7x10 ⁶ cells	jktl-nfat-cd16
Raji-hCTLA4 cells	3-7x10 ⁶ cells	raji-hCTLA4
Raji-hPD-1 cells	3-7x10 ⁶ cells	raji-hpd1
Raji-hPDL-1 cells	3-7x10 ⁶ cells	raji-hpdl1

ADCC Reporter Cell-Based Assay

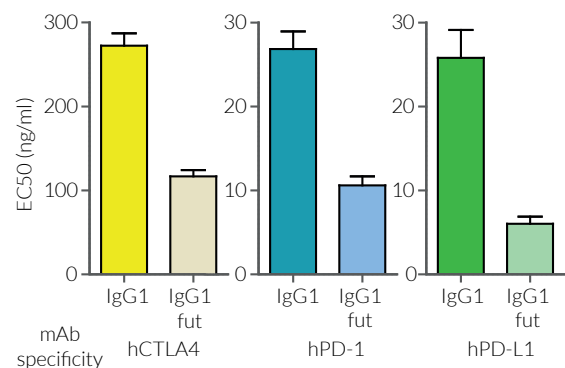


ADCC reporter cell-based assay procedure. 1- **ADCC Induction**: the target cells expressing surface antigens are incubated with specific mAbs for 1 hour before the addition of Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 effector cells at a determined target:effector ratio for 6 hours. 2- **Addition of Lucia luciferase detection reagent QUANTI-Luc™**: detection reagent is added to supernatant samples. 3- **ADCC measure**: bioluminescent signal is detected using a luminometer.



Example of a comparison of ADCC potency for native and engineered isotypes of an anti-human CTLA4 using Raji-hCTLA4 target cells. Raji-hCTLA4 cells were incubated with gradient concentrations of Anti-hCTLA4 or Anti-β-galactosidase mAbs for 1 hour. Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 effector cells were then co-incubated with targets cells for 6 hours. NFAT activation, reflecting the induced ADCC response, was assessed by determining Lucia luciferase activity in the supernatant using QUANTI-Luc™. Percentages of the maximal response normalized to the IgG1 isotype are shown. See left page for each isotype description.

● IgG1 ● IgG2
● IgG1fut ● IgG4(S228P)
● IgG1NQ ● IgA2 ● β-gal



Increased ADCC activity mediated by IgG1 compared to IgG1fut (non-fucosylated): Raji-hCTLA4, -hPD-1, and -hPD-L1 cells were incubated with Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 effector cells and corresponding IgG1 or IgG1fut specific mAbs. The data represent the EC₅₀ for each antibody.

pTRIOZ plasmids NEW

InvivoGen 社は現在、全モノクローナル抗体 (mAbs) の大量生産用に設計された次世代型プラスミド pTRIOZ を提供している。pTRIOZ は、単一プラスミド内で固有の複合プロモーターの制御下にて重鎖 (H) と軽鎖 (L) の両方を発現するための個別のカセットを含む。

- ❖ **高い信頼性**：InvivoGen 社の mAb コレクションを製造するために社内で使用
- ❖ **高い費用対効果**：重鎖および軽鎖の両方に対し単一のプラスミドで可能
- ❖ **高い発現性**：最大 30 倍の抗体作製

pTRIOZ は、最も新しいプラスミド製品であり、遺伝子操作と組換え mAb の生産用に特化したプラスミドである。このコレクションには、重鎖または軽鎖の発現用に設計された InvivoGen 社のベストセラー製品であり、充実した品揃えの pFUSE プラスミドファミリーが含まれる。pFUSE プラスミドは一般的に、mAb をあるアイソタイプから別のものへ、ある種から別のものへと改変するために使用されている。

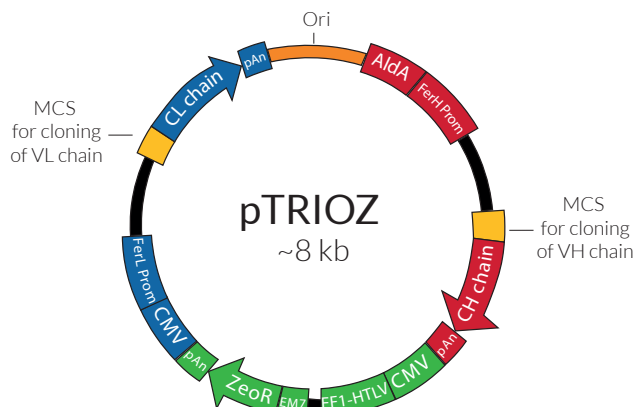
pTRIOZ は、全組換え mAb を高収率で作製するための単一プラスミドである。最適な mAb 作製のためには、重鎖と軽鎖の正確な発現比率が必要となる。このため、pFUSE プラスミドと同様に、pTRIOZ プラスミドは 2 つのヒト・フェリチン (Fer) サブユニットの共発現を促進する一対のプロモーターを利用している。pTRIOZ には、以下の特徴がある。

- **Light chain cassette**: FerL promoter + MCS + constant (C) IgG L chain
- **Heavy chain cassette**: FerH promoter + MCS + constant (C) IgG H chain
- **Zeocin™ selection cassette**: enhancer + composite promoter + *Sh Ble* gene

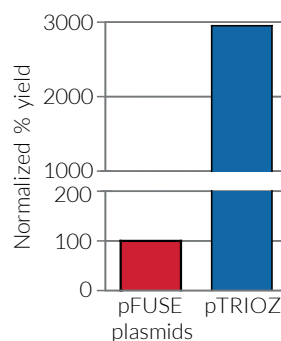
pTRIOZ は、InvivoGen 社の mAb を製造するために社内でも利用されている。2 度反復させるプラスミド (pFUSE) 法と比較した場合、最大 30 倍の収率で抗体を得ることができ、全 mAb の大規模生産に理想的である。InvivoGen 社では、mAb 作製で使われる最も人気のある 4 つのアイソタイプを提供している。これらは、最高の発現と純度を確実に得られるよう最適化されている。

PRODUCT	CAT. CODE
pTRIOZ-hlgG1	ptrioz-higg1
pTRIOZ-hlgG4 (S228P)	ptrioz-higg4sp
pTRIOZ-mlgG1e2	ptrioz-migg1e2
pTRIOZ-mlgG2a	ptrioz-migg2a

すべてのプラスミドは、20 µg の凍結乾燥 DNA として提供しています。



pTRIOZ general plasmid map. pTRIOZ contains three distinct cassettes with composite promoters for the optimized expression of the H and L chains, as well as the *Sh ble* gene conferring resistance to Zeocin™. It contains two unique multiple cloning sites (MCS) for the insertion of the variable H and L chains.



Comparison between pTRIOZ and pFUSE mAb yield. For the production of anti-PDL-1, an optimized 1:1 ratio of the pFUSE heavy chain and pFUSE light chain plasmids was tested alongside pTRIOZ. The maximum yield is normalized to the pFUSE ratio.



www.invivogen.com/pTRIOZ

Zeocin™

Selective antibiotic

- ❖ **独占的なメーカー**：InvivoGen 社が専売権を持つ抗生物質
- ❖ **簡便性**：原核生物および真核生物の両方の選択に利用可能
- ❖ **高品質**：細胞培養試験済み、エンドトキシンレベル < 1 EU/mg

Zeocin™ は銅キレート化グルコペプチド系選択的抗生物質であり、DNA にインターカーレートし、切断することで細胞死を引き起こす。InvivoGen 社は世界で唯一の Zeocin™ メーカーであり、それゆえ、最高の品質を保証している。Zeocin™ は、バクテリアの汚染がないこと、最高の純度であることを保証するため、厳格な社内試験を受けている。Zeocin™ の細胞毒性は最小限であり、さまざまな用途に適用可能である。Zeocin™ は、原核細胞 (例：大腸菌) および真核細胞 (例：CHO 細胞、酵母) の両細胞タイプで効果があり、セレクションによく用いられる抗生物質である。

InvivoGen 社は、セレクション用として Zeocin™ と一緒に利用することができるレポーター細胞株、クローニングベクター、発現ベクターなどの豊富な製品群を取り揃えています。



PRODUCT	QUANTITY	CAT. CODE
Zeocin™ (solution)	1g (10 x 1ml)	ant-zn-1
Zeocin™ (solution)	5g (50 x 1ml)	ant-zn-5
Zeocin™	Bulk	Available upon enquiry

InvivoGen 社の選択的抗生物質の全ラインアップについては、ウェブサイト参照してください。



www.invivogen.com/zeocin

ナカライテスクでは、輸入取り扱いにかかる商品中に特許物質が含まれることにより特許権の侵害が生じないよう万全を期しておりますが、ナカライテスク取り扱いの全ての商品について特許登録の有無を調査することは極めて困難であり、特許物質が含まれている場合があります。万一、ナカライテスク取扱商品の中に特許を侵害する物質等が含まれていると判断される場合には、直ちに該当品の取り扱いを停止する措置をとるものとします。

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