

## 2. 抗体療法を目指した変異株に有効な SARS-CoV-2 中和モノクローナル抗体の分離

郭 悠, 桑田 兵夫, 松下 修三

株式会社 CURED による寄付講座所属

我々はこれまでに2人の COVID-19 回復期患者よりプロトタイプの SARS-CoV-2 を強力に中和する5つのモノクローナル中和抗体を分離した。中でも9-105はreceptor-binding domain (RBD) への親和性が高く、変異株 B.1.1.7 ( $\alpha$ 株)、ミンク cluster 5 variant、B.1.351 ( $\beta$ 株)、P.1 ( $\gamma$ 株)、C.37 ( $\lambda$ 株)、B.1.617.1 ( $\kappa$ 株)、B.1.617.2 ( $\delta$ 株)、B.1.621 ( $\mu$ 株)にも有効であった。また、RBDのK417の変異により9-105の中和活性は低下した。これはホモロジーモデルから9-105軽鎖がRBDのK417を含む領域にACE2と同じ結合角で結合する為と考えられる。

### はじめに

2019年末より世界的なパンデミックを引き起こし、猛威を奮っている新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、ワクチン接種が世界的に行われているにも関わらず、世界中で1週間に57万人の新規感染者を数え未だ終息の兆しが見えない。severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) の Variant of Concern (VOC) は現在までに $\alpha$ 株、 $\beta$ 株、 $\gamma$ 株、 $\delta$ 株の4種指定されており、GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data) によると、2021年9月時点でウイルス流行株は野生株である武漢型から $\alpha$ 株、 $\delta$ 株へと変移した。特に $\alpha$ 株の流行には約15年を有したにも関わらず、 $\delta$ 株への変転は約0.5年と短縮している事は特筆すべき点で、ワクチンで誘導された免疫応答からの逃避変異を起こしている可能性がある。実際、Pfizer社、AstraZeneca社のワクチン共に接種者の77-100%に中和抗体が確認されるが、変異株ウイルスに対

する有効性は46-88%と報告されている<sup>1,2)</sup>。

現在までに日本ではRonapreve (REGN10933, REGN10987)、Sotrovimab (VIR-7831) が COVID-19 抗体療法に使用されている。これらの中和抗体は主に SARS-CoV-2 の Spike 蛋白のうち、宿主細胞に発現している ACE2 と結合する Receptor binding domain (RBD) と言われるエピトープを標的としている<sup>3,4)</sup>。

我々はこれまでに SARS-CoV-2 に対する中和モノクローナル抗体を5クローン作製した<sup>5)</sup>。これらのうち、RBDに結合する9-105、10-121と名付けた2クローンは $\alpha$ 株、 $\beta$ 株、 $\delta$ 株にも有効であり、今後これらを用いた抗体療法の開発を進めていく予定である。ここでは、臨床検体からセルソーターを用いた single cell sort による中和抗体の作製及び活性評価について述べる。

### COVID-19 回復期症例からのモノクローナル抗体分離

#### 1. 回復期症例スクリーニング

我々は2020年3月に COVID-19 に罹患して重症化した症例の中から、回復期血漿中 IgG の SARS-CoV-2 S 蛋白 (Wuhan-Hu-1) への結合が特に強かった (1:1,000,000) 2 症例を選択した。後述する pseudovirus による中和アッセイを行った結果、これら2症例の回復期血漿に50% of the maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) 1/640 ~ 1/2,800 の中和活性がみられた。興味深い事に、これら2症例は SARS-CoV, Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) に対しても弱い交叉中和活性を示した。

### 連絡先

〒860-0811

熊本県熊本市中央区本荘2-2-1

熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター

臨床レトロウイルス学分野

TEL: 096-373-6536

FAX: 096-373-6537

E-mail: shuzo@kumamoto-u.ac.jp

Binding and genetic characteristics of neutralizing mAbs

mAb	Binding			H-chain		L-chain		CDRH3	
	RBD	NTD	KD (nM)	gene	SHM	gene	SHM	aa	length
6-74	-	+	ND	IGHV3-7	0	IGKV2-28	0.67	ARVHIHAPNYDILTGYYGTTPGYGGMDV	29
3-5	+	ND	12.1	IGHV3-53	1.03	IGKV3-20	1.74	ARSYGDYFIDY	11
8-92	+	ND	0.576	IGHV3-53	2.05	IGKV1-9	1.77	ARDKNEGAMDV	11
10-121	+	ND	0.122	IGHV3-53	3.09	IGKV1-33	1.06	ARPIVGARAGMDV	13
9-105	+	ND	0.00203	IGHV3-53	2.05	IGKV3-20	2.44	ARDLEEAGGMDV	12

図 1

## 2. 抗体産生 B 細胞分離および抗体の再構成

選択した 2 症例の末梢血単核球 (PBMCs) より CD3-CD8-CD14<sup>+</sup> 細胞を magnet で negative selection したのち、セルソーターにて IgG 産生メモリー B 細胞 (7AAD-CD19+CD27+IgM-IgG<sup>+</sup>) を 96 well プレートに single cell sort した。単離した B 細胞から逆転写により IgG の重鎖・軽鎖それぞれの可変領域の相補 DNA を合成したのち、nested polymerase chain reaction nested (PCR) にて増幅した。増幅した IgG 可変領域をクローニングしたのち、HEK293 細胞, CHO 細胞で IgG を産生した<sup>6-8)</sup>。フローサイトメーターでの SARS-CoV-2 S 蛋白 (Wuhan-Hu-1) に対する結合にて抗 S 抗体を選別した。2 症例よりそれぞれ 444 クローンと 658 クローンの IgG を合成し、33 クローン (7.4%) と 55 クローン (8.4%) の抗 S 抗体を得た。

### モノクローナル抗体の機能評価

#### 1. Pseudovirus による中和アッセイ及び DSP アッセイ (cell fusion assay)

我々は lentiviral packaging plasmid (psPAX2-IN/HiBiT), the firefly luciferase-expressing lentiviral transfer plasmid (pWPI-Luc2) および SARS-CoV-2 S 発現プラスミドを HEK293T に cotransfect し、pseudovirus 中和アッセイを行った<sup>9)</sup>。さらに pseudovirus の発現を上げる為に D614G mutation と cytoplasmic tail の 19 アミノ酸を欠損させた S 発現プラスミド (pSARSCoV-2-S-D614G-19del) を作製した。Pseudovirus による感染性は細胞に大きく依存している為、標的細胞としてヒト気管上皮細胞 (Calu-3 細胞), ヒト腸管上皮細胞 (Caco-2 細胞) を用いた。また Cell fusion assay では 293FT/DSP1-7/ACE2/TMPRSS2 細胞もしくは Calu-3/DSP1-7 細胞と 293FT/DSP8-11/SARS-CoV-2-S 細胞を用いた DSP アッセイを行った。

我々が分離した抗 S 抗体のうち 5 クローンのモノクローナル抗体にそれぞれのアッセイで中和活性及び cell fusion 抑制効果がみられた。中でも、9-105 の中和活性は 293FT/ACE2/TMPRSS2 細胞, Calu-3 細胞, Caco-2 細胞のい

れでも 50% 感染阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) がそれぞれ 3.5 ng/mL, 1.9 ng/mL, 0.92 ng/mL と著しく低かった。

#### 2. 結合活性評価

次にこれら 6 クローンのモノクローナル抗体の S 蛋白の RBD (P322-N536) と N-terminal domain (NTD; S12-S305) への結合を AlphaScreen で測定した結果、6-74 は NTD に結合し、他の 4 クローンは RBD へ結合した。続いてこれら 4 クローンの抗 RBD 抗体の RBD への結合活性を surface plasmon resonance (SPR) で測定した結果、9-105 は解離定数 (KD) 2.03 pM と他の抗体に比べても結合活性が顕著に高かった。しかし、9-105 は抗 RBD 抗体に多くみられるイムノグロブリン遺伝子 IGHV3-53 にエンコードされており、HIV-1 広域中和抗体 (bnAb) に比べて somatic hyper mutation (SHM) が高度ではなく、重鎖相補決定領域 3 (CDRH3) に中和活性の強さを特徴づけるものはみられなかった (図 1)<sup>10-15)</sup>。

#### 3. 変異株及び Authentic virus への中和活性試験

B1.1.7 ( $\alpha$  株), B.1.351 ( $\beta$  株), P.1 ( $\gamma$  株) およびミンク cluster 5 の変異株に対する中和活性を pseudovirus による中和アッセイにて測定した。抗 NTD 抗体である 6-74 はこれら変異株に対して中和活性が低下し、抗 RBD 抗体では 3-5, 8-92 が顕著に中和活性が低下した。一方で同じ抗 RBD 抗体である 10-121, 9-105 は最も抵抗性の  $\beta$  株に対しても有効な中和活性を示した (IC<sub>50</sub> 0.34  $\mu$ g/ml, 0.021  $\mu$ g/ml)。また、最近の解析で、9-105 は新たな変異株  $\delta, \kappa, \lambda, \mu$  にも有効であることがわかった (IC<sub>50</sub> 0.0045  $\mu$ g/ml, 0.0081  $\mu$ g/ml, 0.0029  $\mu$ g/ml, 0.0045  $\mu$ g/ml)。我々はさらに authentic virus を用いた中和試験を Vero 細胞による plaque assay により行った<sup>16)</sup>。Japan/NGS/IA-1/2020 (prototype), Japan/QK002/2020 strains ( $\alpha$  株), Japan/TY8-612-P1/2021 ( $\beta$  株), Japan/TY7-503/2021 ( $\gamma$  株) を用いた中和アッセイで 10-121 は  $\beta$  株以外の変異株に対して有効な中和活性を示し (IC<sub>50</sub> 75~290ng/ml), 9-105 は全ての変異株を低濃度で中和した (IC<sub>50</sub> 4.2~32ng/ml)。

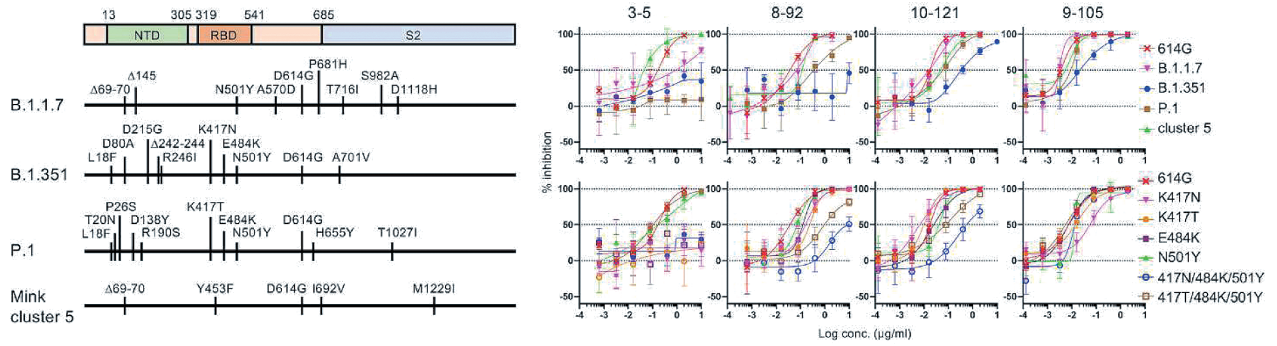


図 2

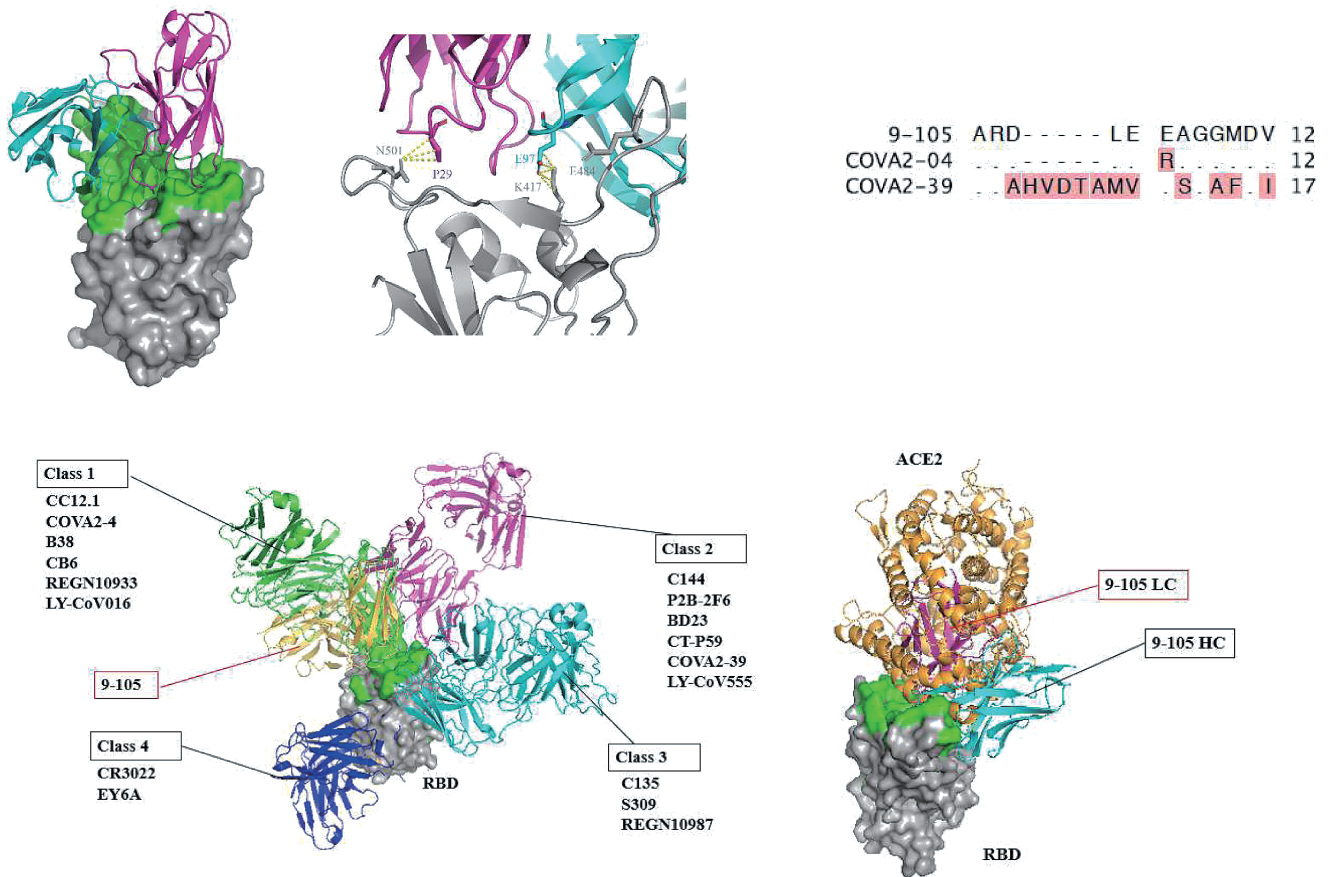


図 3

興味深い事に多くの報告では pseudotype virus に比べ、authentic virus を用いた中和アッセイでは中和活性が 1 log 程度高くなるが<sup>3,4,10,14</sup>、我々のアッセイでは同程度の有効性が示された。これらの変異株にみられるアミノ酸変異を個別に導入した pseudotype virus を用いた中和アッセイでは 9-105 は K417N 変異で中和活性が低下する事が分かった (図 2)。

### 3. Homology modeling

9-105 と CDRH3 が類似している COVA2-04<sup>14</sup> の構造 (PDB ID: 7JMO) を用いた Homology model では SARS-CoV-2 S 蛋白の K417 は 9-105 重鎖の E97 と結合し、N501 は軽鎖の P29 と結合する可能性が示唆された。Barnes らの提唱する抗 RBD 抗体の class 分類<sup>3)</sup> では 9-105 は Class 1 抗体のエピトープへ結合するが、9-105 の結合角は RBD の tip に対して代表的な Class 1 抗体に比べ鈍角であり、軽鎖 (LC) の結合角が ACE2 のそれと overlap していることが示唆された (図 3)。

## 最後に

我々が分離した 9-105 は SARS-CoV-2 変異株にも低濃度で有効な中和活性を示しており、治療抗体として用いれば低用量で有効性が得られ、治療コスト削減へ繋がると考えられる。また、9-105 は ACE2 と酷似した結合様式を取ると予想され、種々の変異株へ有効である可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究の実施にあたり、ご尽力頂きました、京都大学 小柳義夫先生、野田岳志先生、橋口隆生先生、熊本市市民病院 岩越一先生、熊本大学 田附常幸先生、その他多くのご協力頂いた方々に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Chen, R. E., Zhang, X., Case, J. B., Winkler, E. S., Liu, Y., VanBlargan, L. A., Liu, J., Errico, J. M., Xie, X., Suryadevara, N., Gilchuk, P., Zost, S. J., Tahan, S., Droit, L., Turner, J. S., Kim, W., Schmitz, A. J., Thapa, M., Wang, D., Boon, A., ... Diamond, M. S. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nature medicine*, 27(4), 717-726. 2021.
- 2) Planas, D., Veyer, D., Baidaliuk, A., Staropoli, I., Guivel-Benhassine, F., Rajah, M. M., Planchais, C., Porrot, F., Robillard, N., Puech, J., Prot, M., Gallais, F., Gantner, P., Velay, A., Le Guen, J., Kassis-Chikhani, N., Edriss, D., Belec, L., Seve, A., Courtellemont, L., ... Schwartz, O. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, 596(7871), 276-280. 2021.
- 3) Barnes, C.O., Jette, C.A., Abernathy, M.E., Dam, K.M.A., Esswein, S.R., Gristick, H.B., Maljutin, A.G., Sharaf, N.G., Huey-Tubman, K.E., Lee, Y.E., Robbiani D.F., Nussenzweig M.C., West Jr A.P., Bjorkman P.J. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature* 588, 682-687. 2020.
- 4) Yuan, M., Wu, N. C., Zhu, X., Lee, C. D., So, R., Lv, H., Mok, C., & Wilson, I. A. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6491), 630-633. 2020.
- 5) Kaku, Y., Kuwata, T., Zahid, H. M., Hashiguchi, T., Noda, T., Kuramoto, N., Biswas, S., Matsumoto, K., Shimizu, M., Kawanami, Y., Shimura, K., Onishi, C., Muramoto, Y., Suzuki, T., Sasaki, J., Nagasaki, Y., Minami, R., Motozono, C., Toyoda, M., Takahashi, H., Kishi, H., Fujii, K., Tatsuke, T., Ikeda, T., Maeda, Y., Ueno, T., Koyanagi, Y., Iwagoe, H., Matsushita, S. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by antibodies induced in convalescent patients with COVID-19. *Cell reports*, 36(2), 109385. 2021.
- 6) Coronella, J. A., Telleman, P., Truong, T. D., Ylera, F., & Junghans, R. P. Amplification of IgG VH and VL (Fab) from single human plasma cells and B cells. *Nucleic acids research*, 28(20), E85. 2000.
- 7) Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M. C., & Wardemann, H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *Journal of immunological methods*, 329(1-2), 112-124. 2008.
- 8) He, L., Sok, D., Azadnia, P., Hsueh, J., Landais, E., Simek, M., Koff, W. C., Poignard, P., Burton, D. R., & Zhu, J. Toward a more accurate view of human B-cell repertoire by next-generation sequencing, unbiased repertoire capture and single-molecule barcoding. *Scientific reports*, 4, 6778. 2014.
- 9) Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, T.S., Imai, K., Miyoshi, K., Kishigami, S., Ueno, T., Iwatani, Y., et al. SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nat. Commun.* 12, 848. 2021. Yamamoto, M., Kiso, M., Sakai-Tagawa, Y., Iwatsuki-Horimoto, K., Imai, M., Takeda, M., Kinoshita, N., Ohmagari, N., Gohda, J., Semba, K., et al. The Anticoagulant Nafamostat Potently Inhibits SARS-CoV-2 S Protein-Mediated Fusion in a Cell Fusion Assay System and Viral Infection In Vitro in a Cell-Type-Dependent Manner. *Viruses* 12, 629. 2020.
- 10) Cao, Y., Su, B., Guo, X., Sun, W., Deng, Y., Bao, L., Zhu, Q., Zhang, X., Zheng, Y., Geng, C., Chai, X., He, R., Li, X., Lv, Q., Zhu, H., Deng, W., Xu, Y., Wang, Y., Qiao, L., Tan, Y., ... Xie, X. S. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. *Cell*, 182(1), 73-84.e16. 2020.
- 11) Burton, D. R., & Hangartner, L. Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annual review of immunology*, 34, 635-659. 2016.
- 12) Kim, S. I., Noh, J., Kim, S., Choi, Y., Yoo, D. K., Lee, Y., Lee, H., Jung, J., Kang, C. K., Song, K. H., Choe, P. G., Kim, H. B., Kim, E. S., Kim, N. J., Seong, M. W., Park, W. B., Oh, M. D., Kwon, S., & Chung, J. Stereotypic neutralizing VH antibodies against SARS-CoV-2 spike protein receptor binding domain in patients with COVID-19 and healthy individuals. *Science translational medicine*, 13(578), eabd6990. 2021.
- 13) Kreye, J., Reincke, S. M., Kornau, H. C., Sánchez-Sendin, E., Corman, V. M., Liu, H., Yuan, M., Wu, N. C., Zhu, X., Lee, C. D., Trimpert, J., Höltje, M., Dietert, K., Stöffler, L., von Wardenburg, N., van Hoof, S., Homeyer, M. A., Hoffmann, J., Abdelgawad, A., Gruber, A. D., ... Prüss, H. A Therapeutic Non-self-reactive SARS-CoV-2 Antibody Protects from Lung Pathology in a COVID-19 Hamster Model. *Cell*, 183(4), 1058-1069.e19. 2020.
- 14) Brouwer, P., Caniels, T. G., van der Stratén, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., Bangaru, S., Torres, J. L., Okba, N., Claireaux, M., Kerster, G., Bentlage, A., van Haaren, M. M., Guerra, D., Burger, J. A., Schermer, E. E., Verheul, K. D., van der Velde, N., van der Kooij, A., van Schooten, J., van Breemen, M. J., ... van Gils,

- M. J. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 643–650. 2020.
- 15) Gaebler, C., Wang, Z., Lorenzi, J., Muecksch, F., Finkin, S., Tokuyama, M., Cho, A., Jankovic, M., Schaefer-Babajew, D., Oliveira, T. Y., Cipolla, M., Viant, C., Barnes, C. O., Bram, Y., Breton, G., Hägglöf, T., Mendoza, P., Hurley, A., Turroja, M., Gordon, K., ... Nussenzweig, M. C. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature*, 591(7851), 639–644. 2021.
- 16) Sakurai, Y., Ngwe Tun, M. M., Kurosaki, Y., Sakura, T., Inaoka, D. K., Fujine, K., Kita, K., Morita, K., & Yasuda, J. 5-amino levulinic acid inhibits SARS-CoV-2 infection in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 545, 203–207. 2021.

## **Isolation of anti-SARS-CoV-2 neutralizing monoclonal antibodies cross effective to variants aiming at antibody therapy**

**Yu KAKU, Takeo KUWATA, Shuzo MATSUSHITA**

Assigned to the endowed chair funded by CURED Co., Ltd

We isolated five mAbs with potent neutralizing activities against SARS-CoV-2 from two convalescent COVID-19 patients infected with prototype virus. Among them, the 9-105 antibody that have a highest affinity for the receptor-binding domain (RBD), cross-neutralize variants, such as B.1.1.7 (alfa), mink cluster 5 variant, B.1.351 (beta), P.1 (gamma), C.37 (lambda), B.1.617.1 (kappa), B.1.617.2 (delta) and B.1.621 (mu). A single amino acid mutation at K417 of RBD decreased neutralization sensitivity of 9-105. A 9-105 homology model revealed that 9-105 light chain binds to RBD including K417 by the same angle as ACE2.

