

Recent COVID-19 Research Progress Achieved by InvivoGen Technology

[Updated in Jun 2021]

VACCINE DEVELOPMENT

SARS-CoV-2 感染予防に対する緊急の対応と大規模な世界的取り組みによって、複数の COVID-19 ワクチンが前例のない速さで市場に導入されています。COVID-19 ワクチンの研究開発は、非常に活発に続けられています。2021 年 6 月 4 日現在、臨床試験実施中のワクチン候補は 102 種類あり、また、180 種類以上の実験的ワクチンが前臨床評価段階にあります (表 1)。特に、ワクチンの効力を高めることができるアジュバントは、さまざまなタイプのワクチンの設計および研究において重要な役割を果たします。

ウイルスベクター型ワクチンは、COVID-19 のワクチンレースを先行するワクチンの 1 つです。例えば、ヤンセン社製の非複製アデノウイルスベクター型 COVID-19 ワクチンである Ad26.COV2.S は、最近、米国 FDA によって緊急使用が承認されました。Solfrosi らは、Ad26.COV2.S の有効性を評価する前臨床試験において、同社ワクチン候補が Th1 優位な免疫応答を生じるのに対し、可溶性三量体スパイクタンパク質からなる 2 型ヘルパー T (Th2) 細胞に偏向した免疫応答を生じる対照ワクチンのアジュバントとして InvivoGen 社の Alhydrogel® アジュバント 2% (水酸化アルミニウムゲル) を採用しています²。Th2 に偏向した細胞性免疫は、ワクチン誘発性の重度肺疾患の増強に関連していると考えられています³。この潜在的なリスクを排除するために、研究チームは、高齢の非ヒト霊長類を対象として、免疫後の SARS-CoV-2 スパイクタンパク質特異的な中和抗体価ならびに T 細胞応答を、Ad26.COV2.S と Alhydrogel® アジュバント + スパイクタンパク質との間で比較しました。この確認作業によって、Ad26.COV2.S のヒトでの臨床試験を開始するにあたって安全性が裏付けられました。また、ウイルスベクターはアジュバントの性質がもともと備わっていますが、研究者らは、免疫原性をより高めることを目的として、アジュバントを添加したウイルスベクターワクチンのプロトタイプを設計しています。Kurup らは、InvivoGen 社の MPLA (TLR4 アゴニスト) と AddaVax™ (MF59 に類似したスクアレンベースの水中油滴型エマルジョン) を組み合わせ、不活化狂犬病ウイルスベクター型 SARS-CoV-2 S1 ワクチンの免疫応答プロファイルを Th1 優位とするためのアジュバントとして使用しました⁴。MPLA-AddaVax™ をアジュバントとするワクチンは、接種したシリアンハムスター群において、より高レベルの中和抗体を効果的に誘導しました。

WHO が mRNA ワクチンの緊急使用を初めて承認した後、核酸 (DNA および RNA) ベースのワクチンが脚光を浴びています。核酸自体が

自然免疫応答を誘発することができますが、Hayashi らは、SARS-CoV-2 スパイク標的型 DNA ワクチンの効果を、alum でさらに増強できるかどうか検討しました⁵。研究チームは、プラスミド DNA を単独、または InvivoGen 社の AdjuPhos® (水酸化アルミニウムゲル) とともに筋肉内注射してラットを免疫しました。Alum とともに注射した群では抗体産生が有意に誘導されたことから、AdjuPhos® はその後の実験で共投与剤として採用されました。アジュバント添加ワクチンは Th1 型に偏向した細胞性免疫応答を示したことから、その候補薬は臨床評価に進むことが妥当と判断されました。さらに、Szurgot らは、DNA-launched 自己レプリコン RNA プラットフォームの治験ワクチンプロトタイプ 2 種類をエマルジョンブーストと投与しました⁶。1 回のワクチン接種でも高い抗体価が得られ、誘導された抗体はシュドタイプウイルスを効率的に中和できましたが、研究チームは AddaVax™ 中の異種スパイクタンパク質を用いて 1 次免疫応答をブーストすることによって、RBD 特異的抗体価の誘導を 20 倍に増強することに成功しました。

タンパク質型ワクチンは、COVID-19 ワクチンの開発に使用される主要な戦略の 1 つです。組換えタンパク質プラットフォームでは、ほとんどの場合にアジュバントシステムが必要です。例えば、Tan らは組換え SARS-CoV-2 の S および RBD サブユニットを AddaVax™ で製剤化し、マウスおよび非ヒト霊長類に接種しました⁷。アジュバントでブーストされたこれらのタンパク質レジメンは、どちらも優れた結合および中和抗体応答を惹起できることが示されました。タンパク質型ワクチンの代替アプローチとして、表面に標的抗原を提示するエンベロープウイルス様粒子 (eVLPs) の使用があります。Fluckiger らは、AdjuPhos® を添加した Spike-eVLPs 型ワクチン製剤のマウスにおける中和抗体産生と細胞応答について、MF59 様 AddaVax™、AS03、および AS04 をアジュバントとする製剤と比較し評価しました⁸。S eVLPs とともに AdjuPhos® を単回投与したところ、Th1/Th2 応答の均衡がよりとれており、中和抗体価がより高いことが示されました。この結果は、その潜在的候補の最初の臨床評価を開始する裏付けとなりました。

懸念の変異体の発生に適応し、長期的な保護が得られる安全かつ効果的な COVID-19 ワクチンを開発することは、依然として必須の課題です。InvivoGen 社は、alum やエマルジョンをはじめ、無菌保証の VacciGrade™ の PRR リガンドなどの多彩な高品質アジュバントコレクションを提供することで、COVID-19 ワクチン接種の前臨床試験をサポートしています。詳細については <https://www.invivogen.com/vaccine-adjuvants> をご覧ください。

Table 1. Summary of COVID-19 vaccine candidates under clinical trials and preclinical studies¹

Type of Vaccine Platform	Vaccine Candidate in Clinical Evaluation	Vaccine Candidate in Preclinical Evaluation
DNA	10	16
RNA	16	24
Inactivated Virus	16	9
Protein Subunit	32	72
Non-replicating Viral Vector	15	21
Replicating Viral Vector	3	19
VLP (Virus Like Particles)	5	18
Others	5	6
Total	102	185

SARS-CoV-2 SPIKE-DEPENDENT CELL FUSION

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 受容体との相互作用によって媒介される細胞融合イベントによって、感染した細胞同士の合胞体形成が開始されます⁹。SARS-CoV-2 感染時に合胞体が果たす役割は十分に理解されていないものの、合胞体は広範な組織損傷を呈す重症 COVID-19 患者の肺で確認されています⁹。そのため研究者らは、例えば、細胞融合を抑制し、スパイクによって誘発される合胞体形成を阻止できる薬剤候補探索のための細胞ベースのスクリーニング系として利用するなど、その治療可能性を探求しています¹⁰。

そこで、InvivoGen 社は、SARS-CoV-2-Spike-ACE2 依存性細胞融合の研究に手軽に利用できるアッセイを提供しています。このアッセイは、アダプター分子 MyD88 を「ドナー細胞株」から、NF-κB 誘導性 SEAP レポーター遺伝子を発現する「アクセプター細胞株」に移動させることに基づいています(図 1)。具体的には、「ドナー」細胞は、スパイク変異体(例: 英国型 B.1.1.7、南アフリカ型 B.1.351 など)の1つを持つ最適化された発現プラスミドを用いて、293-hMyD88 細胞株を一過性または安定的にトランスフェクションすることによって作製することができます。このようにして得られた細胞は SARS-CoV-2 模倣体となり、感染許容株である hACE2-TMPRSS2 「アクセプター」HEK-Blue™ または A549-Dual™ レポーター細胞と融合することができます。293-hMyD88-Spike 「ドナー」細胞を「アクセプター」細胞と共培養すると、スパイクタンパク質が ACE2 に結合し、TMPRSS2 によるタンパク質分解によって切断されます。最終的に、これらのイベントは細胞融合を引き起こし、その評価は SEAP 検出試薬 QUANTI-Blue Solution™ を用いて共培養上清で簡単に行うことが可能です。

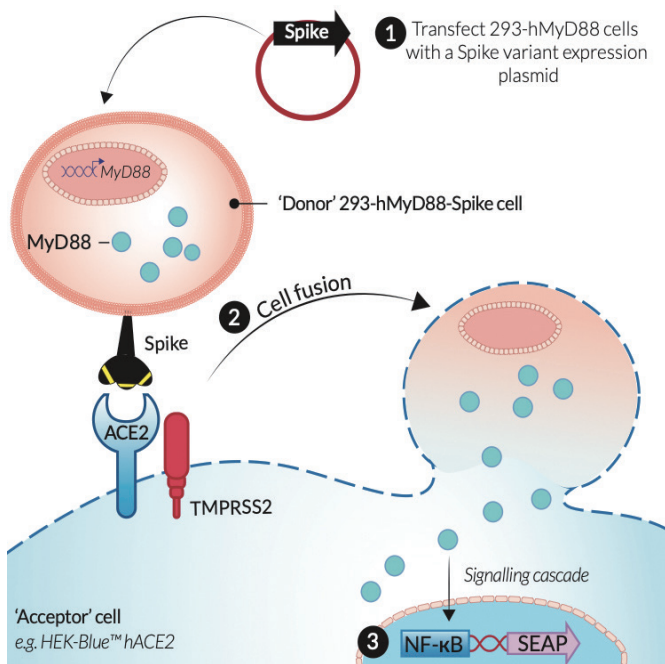


Figure 1. InvivoGen's cell fusion assay in three simple steps

SARS-CoV-2 変異株の出現により、それまでの感染やワクチン接種によって誘導された免疫応答を逃れる可能性が懸念されるようになったため、SARS-CoV-2 が標的細胞に侵入するのを防ぐ新規阻害剤を開発し、問題の変異株が COVID-19 ワクチンおよび治療薬に及ぼす影響について評価することが極めて重要です。したがって、このアッセイは、SARS-CoV-2 スパイク-宿主間相互作用の阻害剤のスクリーニングと、ワクチンまたは抗体治療薬の様々な変異株に対する有効性評価の研究に有用です。

さらに、InvivoGen 社は SARS-CoV-2 スパイク (D614) を発現する 293 細胞も提供しています。これらの細胞は、pUNO-hmyD88 ベクターと共培養して細胞融合アッセイに利用することもできます。COVID-19 関連細胞株の詳細については、<https://www.invivogen.com/covid-19-related-cells> をご覧ください。

SARS-CoV-2 DETECTION

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質は、その細胞発現に影響を与える可能性のあるフーリン切断部位を含むことが分かっています。スパイクタンパク質のフーリン (dfur) 切断部位を不活化することにより、その表面発現を改善させることができます。そこで、InvivoGen 社は、293-SARS2-S-dfur 細胞株を作製し、切断されていない完全なスパイクタンパク質の最適な表面発現とその検出を容易にできるようにしました。この細胞株は、感染者またはワクチン接種者の血清に含まれるスパイクに対する抗体の、フローサイトメトリーを使用したスクリーニングに最適です。したがって、機能的フーリン部位を有する 293-SARS2-S 細胞と比較すると、293-SARS2-S-dfur 細胞は抗スパイクモノクローナル抗体に対してより強い結合を示しました(図 2)。

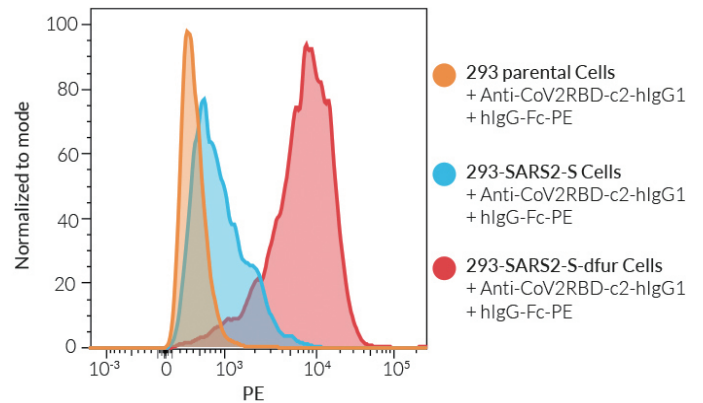


Figure 2 - Validation of the expression of SARS-CoV-2 spike by 293-SARS2-S-dfur cells. 293 parental (orange), 293-SARS2-S (blue), and 293-SARS2-S-dfur (red) cells were incubated with Anti-CoV2RBD-c2-hlgG1 (clone B38) for 1h at 4°C. Cells were then washed and incubated with goat anti-human IgG-FC coupled to PE for 1h at 4°C. Cell surface staining was analyzed by flow cytometry.

また、InvivoGen 社は一連のフーリン部位不活化スパイク発現プラスミドを提供しており、これらはフローサイトメトリーベースのスクリーニングアッセイでの利用を目的として、宿主細胞(例: 293XL/null 細胞)に一過性または安定トランスフェクションを実施できるよう設計されています。スパイク遺伝子のコレクションは、世界各地で発生した問題となる変異株について、継続して更新されます。詳細は <https://www.invivogen.com/covid-19-related-genes> をご覧ください。

MORE COVID-19 RESOURCES AVAILABLE...

- [InvivoGen's COVID-19 animation](#)
- [Spotlight on COVID-19: Infection](#)
- [Spotlight on COVID-19: Treatment with repurposed drugs](#)
- [Spotlight on COVID-19: Predicted immune responses](#)
- [Spotlight on COVID-19: Vaccine development](#)
- [Spotlight on COVID-19: Protective immunity & re-infection](#)

REFERENCES

- World Health Organization, 2021. DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines. Retrieved from <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- Solforosi, L. et al., 2021. Immunogenicity and efficacy of one and two doses of Ad26. COV2. S COVID vaccine in adult and aged NHP. *Journal of Experimental Medicine*, 218(7), e20202756. DOI: 10.1084/jem.20202756.
- Jeyanathan, M. et al., 2020. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nature Reviews Immunology*, 20(10), 615-632. DOI: 10.1038/s41577-020-00434-6.
- Kurup, D. et al., 2021. Inactivated rabies virus vectored SARS-CoV-2 vaccine prevents disease in a Syrian hamster model. *PLoS pathogens*, 17(3), p.e1009383. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009383.
- Hayashi, H. et al., 2020. Preclinical study of DNA vaccines targeting SARS-CoV-2. *bioRxiv* [pre-print]. DOI: 10.1101/2020.10.21.347799.
- Szurgot, I. et al., 2021. DNA-launched RNA replicon vaccines induce potent anti-SARS-CoV-2 immune responses in mice. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13. DOI: 10.1038/s41598-021-82498-5.
- Tan, H. X. et al., 2021. Immunogenicity of prime-boost protein subunit vaccine strategies against SARS-CoV-2 in mice and macaques. *Nature communications*, 12(1), 1-10. DOI: 10.1038/s41467-021-21665-8.
- Fluckiger, A. et al., 2021. An enveloped virus-like particle vaccine expressing a stabilized prefusion form of the SARS-CoV-2 spike protein elicits potent immunity after a single dose. *bioRxiv* [pre-print]. DOI: 10.1101/2021.04.28.441832.
- Lin, L. et al., 2021. Syncytia formation during SARS-CoV-2 lung infection: a disastrous unity to eliminate lymphocytes. *Cell Death & Differentiation*, 1-3. DOI: 10.1038/s41418-021-00795-y.
- Braga, L. et al., 2021. Drugs that inhibit TMEM16 proteins block SARS-CoV-2 Spike-induced syncytia. *Nature*, 1-6. DOI: 10.1038/s41586-021-03491-6.

Product	Description	Quantity	Cat. Code
Alum and Emulsions			
AddaSO3™	ASO3 -like squalene-based adjuvant	10 ml	vac-as03-10
AddaVax™	Squalene-Oil-in-water	10 ml	vac-adx-10
Adju-Phos® adjuvant	Aluminium phosphate gel	250 ml	vac-phos-250
Alhydrogel® adjuvant 2%	Aluminium hydroxide gel (Alum)	250 ml	vac-alu-250
CFA	Complete Freund's Adjuvant	10 ml	vac-cfa-10
IFA	Incomplete Freund's adjuvant	10 ml	vac-ifa-10
Quil-A® adjuvant	Purified triterpenoid saponin	1 g	vac-quil
VacciGrade™ PRR Ligands			
2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp) VacciGrade™	2'3' bisphosphorothioate analog of c-di-AMP - STING agonist	500 µg	vac-nacda2r
2'3'-cGAMP VacciGrade™	Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] - STING agonist	1 mg	vac-nacga23
c-di-AMP VacciGrade™	Cyclic diadenylate monophosphate - STING agonist	1 mg	vac-nacda
c-di-GMP VacciGrade™	Cyclic diguanylate monophosphate - STING agonist	1 mg	vac-nacdg
CL401 VacciGrade™	Chimeric molecule - TLR2 & TLR7 agonist	5 mg	vac-c401-5
CL413 VacciGrade™	Chimeric molecule - TLR2 & TLR7 agonist	5 mg	vac-c413-5
CL429 VacciGrade™	Chimeric molecule - TLR2 & NOD2 agonist	5 mg	vac-c429
Flagellin FlIC VacciGrade™	Recombinant flagellin from <i>S. typhimurium</i> - TLR5 agonist	50 µg	vac-fla
Imiquimod VacciGrade™	Imidazoquinoline compound -TLR7 agonist	5 mg	vac-imq
LPS-EB VacciGrade™	Lipopolysaccharide from <i>E. coli</i> O111:B4 strain - TLR4 agonist	5 x 10 ⁶ EU	vac-3pelps
MPLA-SM VacciGrade™	Monophosphoryl lipid A from <i>S. minnesota</i> R595 - TLR4 agonist	1 mg	vac-mpla
MPLAs VacciGrade™	Synthetic monophosphoryl lipid A - TLR4 agonist	1 mg	vac-mpls
ODN 1585 VacciGrade™	CpG ODN, Class A (murine) - TLR9 agonist	1 mg	vac-1585-1
ODN 1826 VacciGrade™	CpG ODN, Class B (murine) - TLR9 agonist	1 mg	vac-1826-1
ODN 2006 VacciGrade™	CpG ODN, Class B (human) - TLR9 agonist	1 mg	vac-2006-1
ODN 2395 VacciGrade™	CpG ODN, Class C (human/murine) - TLR9 agonist	1 mg	vac-2395-1
Pam3CSK4 VacciGrade™	Synthetic triacylated lipoprotein - TLR1/2 agonist	1 mg	vac-pms
Poly(I:C) (HMW) VacciGrade™	Polyinosine-polycytidylic acid -TLR3 agonist	10 mg	vac-pic
R848 VacciGrade™	Imidazoquinoline compound -TLR7/8 agonist	5 mg	vac-r848
TDB VacciGrade™	Synthetic analog of the cord factor - Mincle agonist	2 mg	vac-tdb

Reviews on COVID-19

Product	Description	Quantity	Cat. Code
COVID-19-Related Cells			
293-SARS2-S Cells	SARS-CoV-2 spike (D614)-expressing HEK293 cells	3-7 x 10 ⁶ cells	293-cov2-s
293-SARS2-S-dfur Cells	SARS-CoV-2 spike (D614)-expressing HEK293 cells	3-7 x 10 ⁶ cells	293-cov2-sdf
293-hMyD88 Cells	Human MyD88 expressing HEK293 cells	3-7 x 10 ⁶ cells	293-hmyd
HEK-Blue™ hACE2 Cells	SEAP reporter HEK293 cells expressing human ACE2	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-hace2
HEK-Blue™ hACE2-TMPRSS2 Cells	SEAP reporter HEK293 cells expressing human ACE2 & TMPRSS2	3-7 x 10 ⁶ cells	hkb-hace2tpsa
A549-hACE2 Cells	ACE2 expressing A549 cells	3-7 x 10 ⁶ cells	a549-hace2
A549-hACE2-TMPRSS2 Cells	ACE2 & TMPRSS2 expressing A549 cells	3-7 x 10 ⁶ cells	a549-hace2tpsa
A549-Dual™ hACE2-TMPRSS2 Cells	Dual reporter A549 cells expressing ACE2 & TMPRSS2	3-7 x 10 ⁶ cells	a549d-cov2r
A549-Dual™ KO-MDA5 hACE2-TMPRSS2 Cells	MDA5 knockout dual reporter A549 cells expressing ACE2 & TMPRSS2	3-7 x 10 ⁶ cells	a549d-komda5-cov2r
A549-Dual™ KO-RIG-I hACE2-TMPRSS2 Cells	RIG-I knockout dual reporter A549 cells expressing ACE2 & TMPRSS2	3-7 x 10 ⁶ cells	a549d-korigi-cov2r
COVID-19-Related Genes			
pUNO1-Spike	Wuhan-Hu-1 Spike gene	20 µg	p1-spike
pUNO1-Spike-dfur	Wuhan-Hu-1 Spike gene (inactivated furin site)	20 µg	p1-spike-df
pUNO1-SpikeV1	Wuhan-Hu-1 Spike gene with D614G mutation	20 µg	p1-spike-v1
pUNO1-SpikeV1-dfur	Wuhan-Hu-1 Spike gene (inactivated furin site) with D614G mutation	20 µg	p1-spike-v1-df
pUNO1-SpikeV2	Spike gene from United Kingdom Variant (B.1.1.7)	20 µg	p1-spike-v2
pUNO1-SpikeV2-dfur	Spike gene (inactivated furin site) from United Kingdom Variant (B.1.1.7)	20 µg	p1-spike-v2-df
pUNO1-SpikeV3	Spike gene from South African Variant (B.1.351)	20 µg	p1-spike-v3
pUNO1-SpikeV3-dfur	Spike gene (inactivated furin site) from South African Variant (B.1.351)	20 µg	p1-spike-v3-df
pUNO1-SpikeV4	Spike gene from Californian Variant (B.1.429)	20 µg	p1-spike-v4
pUNO1-SpikeV4-dfur	Spike gene (inactivated furin site) from Californian Variant (B.1.429)	20 µg	p1-spike-v4-df
pUNO1-SpikeV5	Spike gene from Brazilian Variant (P.1)	20 µg	p1-spike-v5
pUNO1-SpikeV5-dfur	Spike gene (inactivated furin site) from Brazilian Variant (P.1)	20 µg	p1-spike-v5-df
pUNO1-SpikeV6	Spike gene from New York Variant (B.1.526)	20 µg	p1-spike-v6
pUNO1-SpikeV6-dfur	Spike gene (inactivated furin site) from New York Variant (B.1.526)	20 µg	p1-spike-v6-df
pLV-Spike	Wuhan-Hu-1 Spike Pseudotyping Vector	20 µg	plv-spike
pLV-SpikeV1	Wuhan-Hu-1 Spike (D614G) Pseudotyping Vector	20 µg	plv-spike-v1
pLV-SpikeV2	UK Variant (B.1.1.7) Spike Pseudotyping Vector	20 µg	plv-spike-v2
pLV-SpikeV3	South African Variant (B.1.351) Spike Pseudotyping Vector	20 µg	plv-spike-v3
pLV-SpikeV4	Californian Variant (B.1.429) Spike Pseudotyping Vector	20 µg	plv-spike-v4
pLV-SpikeV5	Brazilian Variant (P.1) Spike Pseudotyping Vector	20 µg	plv-spike-v5
pLV-SpikeV6	New York Variant (B.1.526) Spike Pseudotyping Vector	20 µg	plv-spike-v6
COVID-19-Related Antibodies			
Anti-Spike-RBD-hlgG1	SARS-CoV & SARS-CoV-2 Spike RBD monoclonal human IgG1 antibody (Clone CR3022)	100 µg	srbd-mab1
Anti-CoV2RBD-c1-hlgG1	SARS-CoV-2 Spike RBD monoclonal human IgG1 antibody (Clone H4)	100 µg	cov2rbdc1-mab1
Anti-CoV2RBD-c2-hlgG1	SARS-CoV-2 Spike RBD monoclonal human IgG1 antibody (Clone B38)	100 µg	cov2rbdc2-mab1
Anti-CoV-N-hlgG1	SARS-CoV & SARS-CoV-2 nucleocapsid monoclonal human IgG1 antibody (Clone CR3018)	100 µg	covn-mab1

InvivoGen's products are for research use only, and not for clinical or veterinary use.

For more information, please visit : www.invivogen.com

INVIVOGEN ASIA

Email: tech.hk@invivogen.com

TEL : +852-36223480 / FAX : +852-36223483

