

バイオレイヤー干渉法 (BLI) を用いたOctetシステムによるコロナウイルスワクチンと治療法の開発促進

イントロダクション

世界保健機関は2020年3月11日、新たなCOVID-19のアウトブレイクをパンデミックと宣言しました。世界中で数百万人がこのウイルスに感染し、これまでに数十万人の死亡が報告されています。パンデミックの疫学は急速に進歩しており、この病気の認可された治療法やワクチンがないことから、介入策開発の必要性がますます求められています。ワクチン探索の中心にあるのは、効果の可能性が最も高い候補を決定するために多くの潜在的候補の迅速スクリーニングが可能で、最新の生化学・分析技術です。COVID-19のゲノム配列が2020年1月に初めて共有されて以来、Octet®のデータは、コロナウイルスの生物学、ワクチン、および抗ウイルス治療法の開発に関連する、プレイクスルーをもたらしたいいくつかの出版物で取り上げられてきました。Octet BLIプラットフォームは、下記のような利点を科学者に提供することにより、SARS-CoV-2の研究を加速するのに役立っています。

- 標的抗原、ワクチン、治療薬候補を迅速に選択し特徴づけるための、ハイスループットカイネティクスによる相互作用解析ソリューション
- 抗体エピトープの特性評価とカバレッジ決定のための高速かつ柔軟なプラットフォーム
- ワクチンやバイオ医薬品開発研究に向いている様々なバイオセンサーによる効率的なワークフロー
- ワクチン力価、安定性、タイター測定など、上流および下流のワクチン開発および製造における多用途なソリューション
- 直感的で使いやすいデータ分析ソフトウェアツール

Octetでは、生体分子間相互作用を観察するために、検出面 (バイオセンサー) 上の結合による光の干渉を測定するBio-Layer Interferometry (BLI) 技術を利用しています。検出結果は結合レスポンスとしてリアルタイムに観察されます。この装置は、96または384ウェルプレート中のサンプルを、マイクロ流路のない環境で測定します。アッセイワークフローには、ディスプレイ可能なバイオセンサーをマイクロプレート内のサンプルに浸しリアルタイムで相互作用を検出する、シンプルなDip and Read™ 測定によって行われます。このワークフローは、細胞培養上清、血清、血漿、その他培地などの複雑なマトリックス中の標的分子の特異的なキャプチャーと分析を可能にするという点で、マイクロ流路ベースの技術よりも有利です。スクリーニングのために抗体や他の組換えタンパク質を精製する必要がなく、サンプルが目詰まりするリスクを回避することができます。

これらの特徴により、ユーザーはアッセイやバイオセンサーの条件を簡単に変更し、貴重なサンプルを再利用することができるので、迅速かつ低コストでアッセイの最適化を実現します。さらにユーザーは、ワクチンや生物治療薬の開発研究に適した、様々なアフィニティキャプチャーおよび固相化法のセンサーを選択することができます。幅広いサンプルに適用でき、事前調製が不要なバイオセンサーの表面に固相化された化学物質を表1に示します。

Biosensor	Description	Application
AHC	Anti-Human Fc-Capture	ヒトIgGまたはヒトFc融合タンパク質を、精製または未精製培地中からキャプチャーし、様々なアナライトを用いたカイネティクス分析またはエピトープマッピング分析に用います。
AMC	Anti-Mouse Fc-Capture	マウスIgGまたはマウスFc融合タンパク質を、精製または未精製培地中からキャプチャーし、様々なアナライトを用いたカイネティクス分析またはエピトープマッピング分析に用います。
SA	Streptavidin	ビオチン化された分子を固相化し、カイネティクスまたはエピトープマッピング分析に用います。
HIS1K	Anti-Penta-HIS	精製または未精製培地中からHisタグ付きタンパク質をキャプチャーし、標的アナライトを用いたカイネティクス分析を行うことができます。緩衝液、培地、または希釈溶解液中のHisタグ付きタンパク質の定量にも用いることができます。バイオセンサーは、ペンタHis抗体であらかじめコーティングされています。
FAB2G	Anti-Human Fab-CH1 2nd Generation	ヒトFabフラグメントおよびIgGと、標的抗原、Fc受容体、他のアナライトとのカイネティクス分析。FabおよびIgGの定量にも用いることができます。
NTA	Ni-NTA	緩衝液や希釈したマトリックス中でのHisタグ付きタンパク質の定量に用いることができます。各種アナライトを用いたカイネティクス分析のためのHisタグ付きタンパク質のキャプチャーにも使用します。
Protein A	Fc-Capture	ヒトを含む様々な種の、IgGおよびFc融合タンパク質のキャプチャーに用います。

表1: 抗体ベースのカイネティクス解析、受容体結合およびエピトープマッピングアッセイに広く使用されているバイオセンサーの化学表面。すべてのバイオセンサーについての情報・選択ガイドは、[Biosensor selection guide](#)をご覧ください。

Octetは、様々なワクチン開発研究プログラム (HIV Reference 1, 2、インフルエンザReference 3、エボラウィルスReference 4、新型コロナウイルスReference 5-15) と、ナノ粒子Reference 16、ウィルス様粒子 (VLP)Reference 17 および二重特異抗体Reference 18などのワクチン製剤技術の評価に広く使用されています。Octetシステムはまた、リード候補の選択だけではなく、パイオプロセス開発と製造へのソリューションも提供します。このレビューでは、コロナウイルス研究とワクチン開発への取り組みにおける、Octetアッセイを使用した最近の研究成果の事例をまとめました。

コロナウイルス受容体の結合機構と交差反応性の決定

SARS-CoV-2 (あるいは2019-nCoV) は、他のコロナウイルスファミリー、特にbetacoronavirus属 (SARS-CoV 2003) と遺伝的および形態学的な特徴を共有しています。SARS-CoV-2は、ヒトアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2) 受容体 (Reference 19) を介して宿主細胞への侵入を得るために、グリコシル化されたホモ3量体クラスI fusionスパイク (S) タンパク質を使用しています。SARS-CoV-2のS糖タンパク質は、MERS-CoVのような他の主要なコロナウイルスと比較すると、SARS-CoVと有意な構造的相同性を有しています。Sタンパク質は、宿主細胞膜とウィルス膜を融合させるために再編成を受ける。融合前準安定構造が存在することが知られています。宿主細胞受容体へのS1サブユニットの結合は、融合前状態の三量体の不安定化を誘発し、そのタンパク質構造変化によりS2サブユニットを介して宿主細胞膜との融合が開始されます。宿主細胞受容体に結合するためには、S1の受容体結合ドメイン (RBD) は、ダウンコンフォメーションとアップコンフォメーションと呼ばれる、受容体結合領域を隠す、あるいは提示する、ヒンジのような構造変化を経る必要があります。それは受容体結合へのアクセスを可能にし、またワクチン開発のための重要な抗原ターゲットとしてそれ自体が提示されます。

Wrappらにより、融合前コンフォメーションにおけるSARS-CoV-2 S三量体の構造が、クライオ電子顕微鏡法による最初の構造解析の一つとして明らかにされました (Reference 12)。彼らは、SARS-CoV-2 Sタンパク質の全体的な構造がSARS-CoV Sとほぼ類似しているのに対し、RBDのダウンコンフォメーションの間に違いが存在することを示しました。

Wallsらによって、SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質複合体の別のクライオ電子顕微鏡構造が明らかにされました (Reference 10)。この研究では、SARS-CoV-2 S糖タンパク質は、S1/S2サブユニット間境界は生成中に処理されるfurin切断部位を有し、これはこのウィルスをSARS-CoVおよび他のSARS関連CoVと区別することを示しました。またOctet結合アッセイを用いて、SARS-CoV-2 SとSARS-CoV Sの受容体結合ドメインは、ヒトACE2と同じような結合親和性で結合することが示されました。同様の観察が、SARS-CoV-2 S RBDの高分解能結晶構造により、Joyceらによって報告されています (Reference 5)。さらにこの研究では、SARS-CoVおよびMERS-CoV受容体結合ドメイン (RBD) と相互作用することが知られている抗体を用いて、SARS-CoV-2への結合活性についてOctetのカイネティクスアッセイを行っています。プールのうち240CDおよびCR3022の2つの抗体のみが、SARS-CoV-2 RBDに対して低nMでの結合親和性を示しました。しかしこれらの2つの抗体は、Octetのクロス競合アッセイによると、SARS-CoV-2 RBDの同じ結合部位に対して競合していました。クロス競合またはエピトープピンングアッセイは、各モノクローナル抗体 (mAbs) が結合する抗原領域またはエピトープに基づいて、ピンに抗体をセグメント化するために使用することができます (図1)。さらにOctet競合アッセイにより、SARS-CoV-2 RBDに結合した240CDまたはCR3022抗体は、ACE2の認識を阻害しないことが明らかになりました。

Octetによるエピトープピンングフォーマットとアッセイガイドライン

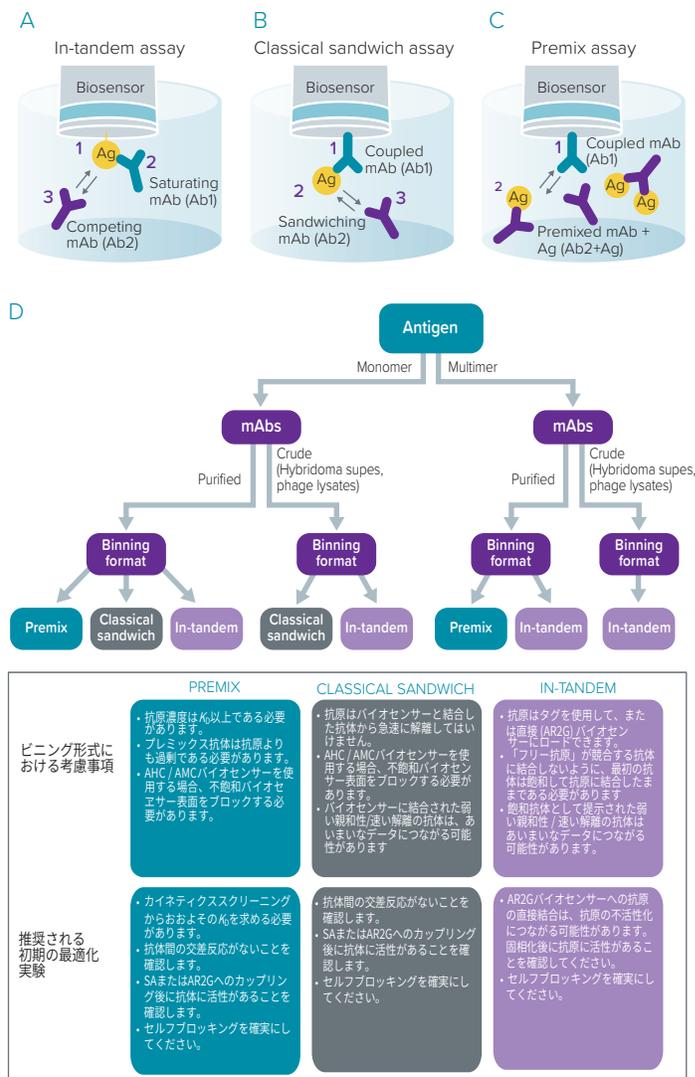


図1: エピトープピンングアッセイフォーマットと最適なエピトープピンングアッセイフォーマットを選択するための推奨ガイドライン。Octetシステムは、クロス競合評価のための複数のアッセイフォーマットを可能にし、エピトープピンングのための専用のハイスループットソフトウェア解析ツールを提供しています。(A) In Tandemアッセイ。抗原はバイオセンサー上に固相化され、その後、それぞれ飽和mAb (Ab1) と競合mAb (Ab2) の結合が行われます。(B) Classical Sandwichアッセイ。あるmAbをバイオセンサーに固定化し (Ab1)、このmAbを用いて抗原をキャプチャーした後、2つ目のサンドイッチmAbを試験します (Ab2)。(C) Premixアッセイ。あるmAbをバイオセンサーに固定化し (Ab1)、抗原と大過剰モル濃度の2つ目のmAb (Ab2) を含む、プレミックス溶液にバイオセンサーを浸します。(D) 最適なエピトープピンングアッセイフォーマットを選択するためのガイドライン。クロス競合スクリーニングの開発および分析についての詳細は、Octet assay guideをお読みください。

また結晶構造解析の結果、CR3022はSARS-CoVとSARS-CoV-2の両方に保存されているRBDの部位に結合し、交差反応性を示しました。しかし本研究で同定されたSARS-CoV-2と、これまでの構造データから得られたSARS-CoVおよびMERS-CoVのエピトープ領域を比較したところ、CR3022はSARS-CoV-2 S内の新規エピトープに結合していることが明らかになりました。このエピトープ領域内に導入された特異的なRBD ノックアウト変異体 (384位置の糖鎖ノックアウト) は、CR3022と240CDの両抗体の結合を排除していることが、両抗体がエピトープを共有することを確認したOctetデータにより示されました。

受容体結合と細胞への侵入におけるSARS-CoV-2のスパイク構造を理解するために、SARS-CoV-2、SARS-CoV、およびMERS-CoVの三量体ユニットに結合したCR3022の構造がモデル化されました (Reference 5)。RBDがダウンコンフォメーションにあるときには、CR3022エピトープは隣接するスパイクプロモーターによって妨害されていますが、アップコンフォメーションではよりアクセス可能であることが示されました。Octetアッセイにより、非安定化されたS-糖タンパク質 (S1) のコンフォメーションへCR3022の結合、またS2 P三量体へのはるかに弱い結合が観察されました。最小限のタンパク質分解、あるいは受容体結合により、CR3022の不明瞭なエピトープへの結合が変化すかどうかを評価するために、S2三量体をトリプシンで処理するか、またはACE2とインキュベートしました。S2 P三量体をヒトACE2でインキュベートしても、CR3022結合に劇的な影響は与えませんでした。しかしS2 Pコンフォメーションのトリプシン処理は、非安定化S糖タンパク質での結合と同様の結合レベル増加をもたらしました。この結合レベルは、タンパク質分解の増加と相関があるため、CR3022結合エピトープが構造内部に埋め込まれているような特性であることが推測されました。同様の観察は、SARS-CoV-2 RBDに結合した中和抗体CR3022の結晶構造を用いて、Yuanらによって報告されています (Reference 14)。Octetの結合データは、SARS-CoVとSARS-CoV-2 RBDの間に高い配列保存性があるにもかかわらず、CR3022 FABsはSARS-CoV-2 RBDよりも100倍以上高い親和性でSARS-CoVを結合することを示しました。これはおそらく上記の2つのエピトープ間で保存されていない残基によります。in vitroでのマイクロ中和アッセイでは、CR3022はSARS-CoVに対しては中和活性が高く、SARS-CoV-2では中和活性が低いことが示されましたが、これはRBDの結合親和性の低さと一致します。これらの構造研究により、SARS-CoV-2が体液性免疫応答の標的となるメカニズムに対しての知見が得られ、また相互防御的なnAbs創薬に利用できる可能性のある、SARS-CoV-2とSARS-CoVの間で保存され構造内部に埋め込まれているエピトープが共有されていることが明らかとなりました。

中和抗体の開発

中和抗体 (nAbs) は現在の治療法の中でコロナウイルス感染症に対して最も効果的な治療法の一つであると考えられ、緊急に必要とされています。SARS-CoV RBDを標的としたいくつかのnAbsでは、in vivoで有意な抗ウイルス活性を示すことが、動物モデルでウイルス力価を低下させることにより明らかにされています。しかし交差反応性を有するnAbsが利用できれば、一本鎖RNAウイルスに典型的なウイルス変異に対抗できる、持続的に利用できる治療薬の鍵となる可能性があります。

SARS-CoVとSARS-CoV-2の2つのスパイク (S) タンパク質の間には80%程度の配列類似性があることから、SARS-CoVのスパイク (S) タンパク質の免疫応答から得られた抗体が、新しいSARS-CoV-2との交差反応性を保持するかどうかを理解することは、治療用抗体や予防ワクチンの開発に重要な洞察と指針を提供することになります。

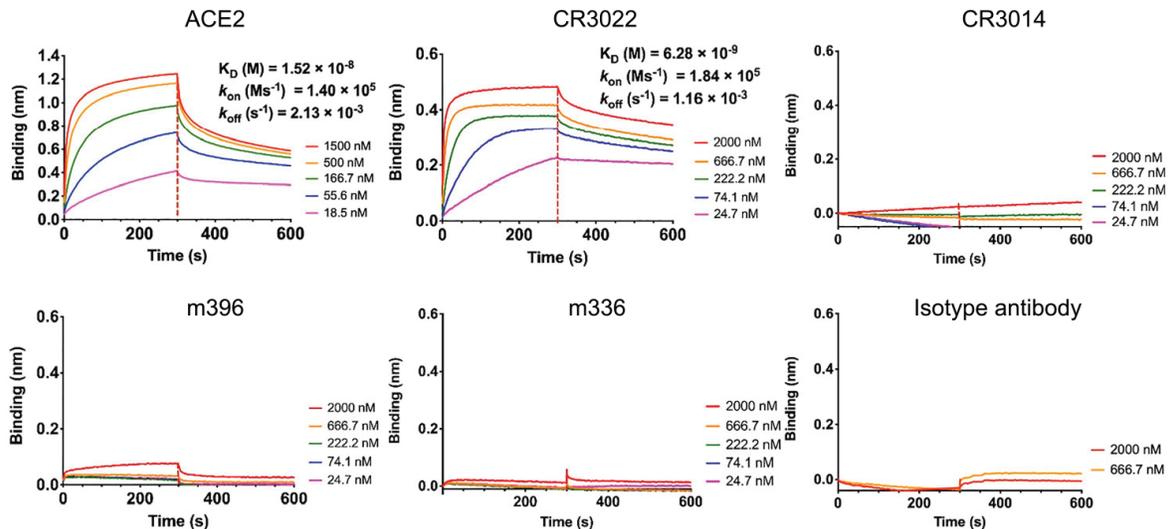
Tianらの先駆的な研究では、CoV-2 RBDを発現および精製し、RBDを標的としてSARS-CoVに対して強力な中和活性を発揮することが知られている、いくつかのSARS-CoV特異的中和抗体の結合を試験しました (Reference 9)。SARS-CoV nAbsであるm396、CR3014、CR3022、およびMERS-CoV nAbであるm336を、SARS-CoV-2 RBDの認識について試験しました (図2)。ほとんどの抗体はSARS-CoV-2 RBDへの有意な結合を示しませんでした。SARS-CoV患者から単離されたCR3022は6.3 nMの親和性 (k_{on} は $1.84 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ 、 k_{off} は $1.16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) で結合しました。

Octet BLI競合アッセイは、CR3022がSARS-CoV-2 RBDのACE2結合部位と競合しないことを示し、ACE2結合部位とは異なるエピトープに結合していることを示しました (図2B)。Wrappらは同様に、以前に発表されたSARS-CoV-2 RBD結合抗体の別のセット、S230、m396、および80RをSARS-CoV-2 Sタンパク質と一緒に調べました (Reference 12)。Octet結合アッセイでは、SARS-CoVとは異なるエピトープを介して認識されるためか、有意な結合活性の欠如が示されました。Sunらは、SARS-CoV S1またはRBDタンパク質を用いて、マウスおよびウサギを免疫して作製したいいくつかのpAbsおよびmAbsは、SARS-CoV-2 pseudovirus (PSV) において良好な交差中和活性を示さなかったことを報告しています。しかしこれらの抗体は、SARS-CoVウイルスに対して強力な中和活性を示し、SARS-CoV RBDに対する高親和性の結合を示しました (K_D ~9-200 pM) (Reference 8)。これらの結果は、SARS-CoV中和活性やRBD結合を示す抗体が、RBDの高い配列相同性にもかかわらず、必ずしもSARS-CoV-2への活性の必須条件ではないことを示しており、SARS-CoV-2のRBDを特異的に標的とする新規抗体の開発が必要であることを示唆しています。

Wangらは、SARS-CoV-2およびSARS-CoVウイルス活性に対して中和力を有するヒトモノクローナル抗体の発見を報告しました (Reference 11)。免疫化トランスジェニックマウスに由来するSARS S ハイブリドーマを含む上清コレクションからのスクリーニングで得られた47D11は、SARS-CoVおよびSARS-CoV-2 pseudotyped VSVの両方に対して交差反応性および中和活性を示しました。Octetを用いた研究では、47D11は、SARS-CoV-2の S_{ecto} ドメイン ($K_D = 10.8 \text{ nM}$) と比較して、SARS-CoVの S_{ecto} ドメインに高い親和性 ($K_D = 0.745 \text{ nM}$) の結合を示しましたが、SARS-CoVおよびSARS-CoV-2のRBD結合ドメインへの結合については似たような結合親和性が報告されているため、2つのウイルス受容体結合モチーフ (RBM) 構造の間のエピトープアクセス性の違いをさらに検証しています。加えて、これまでに報告されている他の例と同様に、47D11はSARS-CoVやSARS-CoV-2 RBDと競合せず、受容体ブロッキングとは異なるモードで中和されていることが示唆されました。この交差中和抗体は、共通エピトープを標的としていることが報告されており、SARS-CoV-2の予防や治療に応用できる可能性があります。

Pintoらは、SARS-CoV生存者からnAbsのスクリーニングを行いました (Reference 7)。このスクリーニングで得られた8種類のmAbsは、SARS-CoVおよびSARS-CoV-2 Sタンパク質をトランスフェクションしたCHO細胞の両方に結合し、そのうちS303、S304、S309、およびS315は、SARS-CoVおよびSARS-CoV-2 RBDの両方を認識しました。Octetデータにより、S309は両SドメインどちらにもnMレベルの親和性で結合し、SARS-CoVおよびCoV-2の pseudovirus、本物のSARS-CoV-2に対しても同等の中和力を示すことが示されました。S309は、受容体結合モチーフ (RBM) とは異なる、SARS-CoV-2のRBD上のタンパク質/グリカンエピトープを認識し、アップ状態とダウン状態の両方にアクセス可能であると、構造データより考えられます。Octet BLI競合アッセイは、S309 FabおよびIgGのSARS-CoV-2 RBDへの結合が、ACE2受容体のSARS-CoV-2 Sタンパク質への結合を阻害しないことを示しました。

A



B

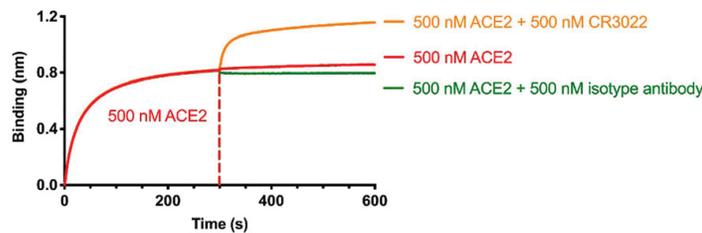


図2：SARS-CoV-2 RBDに対するSARS-CoV抗体の相互作用の特性解析。(A) Octetにより測定した、SARS-CoV-2 RBDと、ACE2あるいは抗体との結合プロファイル。(B) CR3022およびACE2と、SARS-CoV-2 RBDとの競合。競合分析のために、SARS-CoV-2 RBDをStreptavidinバイオセンサー上に固相化し、次いでACE2を作用させた後に、ACE2のみ、CR3022+ACE2、またはACE2+アイソタイプ抗体コントロールのいずれかと反応させました。図はReference 9からの転載です。

mAbsのパネルセットで認識されるエピトープについてより多くの洞察を得るために、OctetエピトープピニングアッセイによるSARS-CoVおよびSARS-CoV-2 RBDに存在する抗原性部位のマッピングが実施されました。Octetエピトープピニング解析により、mAbが標的とするSARS-CoV RBD内の4つの抗原性領域が同定されました。これらの知見に基づき、異なる抗原性領域を標的としたmAbの組み合わせについて、中和力と相乗効果の可能性について試験を行ったところ、S304あるいはS315と、S309の組み合わせは、SARS-CoV-2に対する中和力を増強することが示されました。この研究で同定されたS309は、複数のsarbecovirusに対して幅広い中和活性を示し、有効な治療薬候補として期待されています。

Panらは、SARS-CoV-2のRBDドメインを使用して、馬の抗血清から中和抗体を作製しました(Reference 6)。馬の抗血清から単離されたF(ab)₂は、SARS-CoV-2に対して~25μg/mLのEC₅₀で中和活性を示したと報告されています。Octet BLIのカイネティクス分析はまた、76 nMの親和性でのF(ab)₂へのSARS-CoV-2受容体の結合を確認しました。抗血清からのF(ab)₂のアフィニティー精製により、SARS-CoV-2に対する中和活性(EC₅₀ = 0.18 μg/mL)が向上し、またOctet BLIで測定した結合親和性(0.76 nM)も増加しました。これはRBD特異的F(ab)₂がSARS-CoV-2の治療薬候補になる可能性を示唆しています。

Wuらは、SARS-CoV-2 RBDを標的とするシングルドメイン抗体の生成および試験を報告しました(Reference 13)。SARS-CoV-2 RBDおよびS1を抗原として用いたパンニングにより、SARS-CoV-2 RBD上の5種類の中和エピトープまたは非中和エピトープを標的とする抗体が同定されました。18個のヒトシングルドメイン抗体を、Octetシステムを用いた競合結合アッセイで試験した結果、それらが互いに競合を示さない3つの競合グループ(グループA、B、C)に分けられることを彼らは発見しました。SARS-CoV-2 S1をパンニング抗原として用いたライブラリーから同定したシングルドメイン抗体n3130は、pseudotype ウイルスおよび生ウイルスの両方に対して強力な中和活性を示し、SARS-CoV-2 S1およびRBDドメインへの強い結合を示しました。また、SARS-CoV-2 RBDがSARS-CoVやMERS-CoVと比較してユニークな免疫原性プロファイルを示したこともこの研究では報告されており、SARS-CoV-2に対する有効なワクチン開発に重要な意味を持つと考えられます。

ウイルス侵入を阻害するペプチド阻害剤の設計と検証

保護作用を持つ抗体に加えて、ペプチドおよび低分子阻害剤も、SARS-CoV-2 RBDを標的にしてウイルスの侵入を防ぐための阻害戦略として使用可能です。Zhangらは、SARS-CoV-2 S受容体とACE2タンパク質の複合体の結晶構造を元に、結合界面にまたがるACE2 PD α 1ヘリックスに基づいて発見された、23-merペプチドインヒビター (SBP1) の設計および開発を研究しました (Reference 15)。SARS-CoV-2 RBDへのペプチドの結合の標的特異性を試験するために、Octet BLIを使用しています。SBP1は、47 nM ($k_{on} = 4.69 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ および $k_{off} = 2.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) の親和性でRBDに結合し、この結合親和性は、全長ACE2のSARS-CoV-2 RBDへの結合の強さに匹敵します。したがってSBP1は、SARS-CoV-2表面のスパイクタンパク質をカバーすることで、ACE2の結合を打ち負かす新たな治療戦略となる可能性があります。

まとめ

親和性の特性評価、中和性、競合性の研究は、新型SARS-CoV-2に対する治療法やワクチン開発のための、高親和性で中和可能性のあるリード候補の選択に不可欠です。カイネティクス解析は、親和性だけではなく、親和性の元となる結合および解離の詳細なパラメータを調べます。一方クロス競合アッセイは、より最適な候補の同定を可能にします。上記の研究に加えて、他のコロナウイルスのメンバーや関連する種を特徴づけ、調査するために、研究者はOctetアッセイを利用してきました。これらの観察と結果は、SARS-CoV-2に対する現在の治療戦略の実施と枠組み作りのために非常に貴重なものでした。表2は、現在および今までのコロナウイルス研究において、Octetアッセイを使用している研究についていくつかを選択し、要約したものです (Reference 20-27)。これらの研究すべてにおいて、すぐに使える多様なバイオセンサーケミストリーの可用性と、Octetシステムの使いやすさを組み合わせることで、ユーザーが結果を得る時間を大幅に短縮し、現在のパンデミックに対するワクチンや治療法のための継続的な探索を進めることが可能になりました。

Analyte(s)	Immobilized ligand(s)	Virus species	Assay focus	Biosensor	Reference
ACE2	Fc-tagged SARS CoV-2 RBD	SARS CoV-2	Cross-reactivity and receptor binding	AHC	12
ACE2	SARS-CoV-2 S _B SARS-CoV S _B	SARS CoV-2	Receptor binding	HIS1K	10
mAb, MERS S protein, VHH	SARS CoV-2 S1, SARS CoV-2 RBD	SARS CoV-2	VHH and mAb binding assessment, Epitope binning	AR2G	13
Fab, IgG	SARS CoV-2 S protein, SARS CoV-2 RBS	SARS CoV-2	FAB, IgG binding characterization	HIS1K	14
ACE2, SARS-CoV RBD	SARS-CoV-specific neutralizing antibodies	SARS CoV-2	Cross-reactivity binding	SA	9
Antibodies	Biotin-Recombinant SARS-CoV S1 protein	SARS CoV-2	Neutralization antibody assessment	SA	8
FAB, ACE2, SARS S protein	mAb, ACE2	SARS CoV-2	Receptor binding, antibody reactivity, competition assays	AHC, HIS1K	5
SARS CoV-2 RBD	Inhibitor Peptide	SARS CoV-2	Peptide inhibitor development	SA	15
mAb	S1B and SARS S _{ecto} domains	SARS CoV and SARS CoV-2	Antibody reactivity assessment	HIS1K	11
SARS CoV-2 RBD, SARS CoV RBD, mAbs, FAB	mAbs, SARS CoV-2 RBD, SARS CoV RBD	SARS CoV and SARS CoV-2	Antibody binding characterization, epitope binning, competition binding	Protein A, HIS2, HIS1K	7
Coronavirus S proteins	Biotin-90Ac6SLN	SARS CoV and MERS CoV	Receptor binding	SA	20
MERS-5HB fusion inhibitor	Biotin-peptide (MERS-HR2P)	MERS CoV	Protein Inhibitor development	SA	21
mAb, MERS S protein	mAb, MERS S protein	MERS CoV	Epitope binning and Receptor binding	SAX, Protein A	22
MERS-CoV S	mAbs	MERS CoV	Antibody reactivity measurements, competition assays	AHC, HIS1K	23
MERS-CoV NTD, mutants	mAb	MERS CoV	Antibody reactivity measurements	AHC	24
MERS S-protein	mAbs	MERS CoV	Antibody reactivity measurements	AHC	25
RBD/S1/S2 antigen	Vaccine-induced mouse monoclonal IgGs	MERS CoV	Antibody reactivity and epitope binning	AHC, HIS1K	26
FABs	MERS-CoV RBD	MERS CoV	Epitope binning	HIS1K	27

表2：コロナウイルス研究およびワクチン開発におけるOctet BLIアッセイの例。

References

- 1 Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus, Murin CD et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 111:17182-17187, 2014, doi:10.1073/pnas.1414164111.
- 2 A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies, Sanders RW, et al., *PLoS Pathog*, 9:e1003618, 2013, doi:10.1371/journal.ppat.1003618.
- 3 Kinetic analysis of the influenza A virus HA/NA balance reveals contribution of NA to virus-receptor binding and NA-dependent rolling on receptor-containing surfaces, Guo H, et al., *PLoS Pathog*, 14:e1007233, 2018, doi:10.1371/journal.ppat.1007233.
- 4 Antibody Repertoires to the Same Ebola Vaccine Antigen Are Differentially Affected by Vaccine Vectors, Meyer M, et al., *Cell Rep*, 24:1816-1829, 2018, doi:10.1016/j.celrep.2018.07.044.
- 5 A Cryptic Site of Vulnerability on the Receptor Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein, Joyce MG, et al., *bioRxiv*, 2020.2003.2015.992883, 2020, doi:10.1101/2020.03.15.992883.
- 6 Immunoglobulin fragment F(ab')₂ against RBD potently neutralizes SARS-CoV-2 *in vitro*, Pan X, et al., *bioRxiv*, 2020.2004.2007.029884, 2020, doi:10.1101/2020.04.07.029884.
- 7 Structural and functional analysis of a potent sarbecovirus neutralizing antibody, Pinto D, et al., *bioRxiv*, 2020.2004.2007.023903, 2020, doi:10.1101/2020.04.07.023903.
- 8 SARS-CoV-2 and SARS-CoV spike-RBD structure and receptor binding comparison and potential implications on neutralizing antibody and vaccine development, Sun C, et al., *bioRxiv*, 2020.2002.2016.951723, 2020, doi:10.1101/2020.02.16.951723.
- 9 Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody, Tian X, et al., *Emerg Microbes Infect*, 9:382-385, 2020, doi:10.1080/22221751.2020.1729069.
- 10 Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, Walls, AC et al., *Cell*, 181:281-292 e286, 2020, doi:10.1016/j.cell.2020.02.058.
- 11 A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection, Wang C, et al., *bioRxiv*, 2020.2003.2011.987958, 2020, doi:10.1101/2020.03.11.987958.
- 12 Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, Wrapp D, et al., *Science*, 367:1260-1263, 2020, doi:10.1126/science.abb2507.
- 13 Fully human single-domain antibodies against SARS-CoV-2, Wu Y, et al., *bioRxiv*, 2020.2003.2030.015990, 2020, doi:10.1101/2020.03.30.015990.
- 14 A highly conserved cryptic epitope in the receptor-binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV, *Science*, doi:10.1126/science.abb7269 (2020).
- 15 The first-in-class peptide binder to the SARS-CoV-2 spike protein, Zhang G, et al., *bioRxiv*, 2020.2003.2019.999318, 2020, doi:10.1101/2020.03.19.999318.
- 16 Presenting native-like trimeric HIV-1 antigens with self-assembling nanoparticles, He L, et al., *Nat Commun*, 7:12041, 2016, doi:10.1038/ncomms12041.
- 17 Exposure of epitope residues on the outer face of the chikungunya virus envelope trimer determines antibody neutralizing efficacy, Fong RH, et al., *J Virol*, 88:14364-14379, 2014, doi:10.1128/JVI.01943-14.
- 18 A "Trojan horse" bispecific-antibody strategy for broad protection against ebolaviruses, Wec AZ, et al., *Science*, 354:350-354, 2016, doi:10.1126/science.aag3267.
- 19 Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses, Letko M, Marzi A and Munster V, *Nat Microbiol*, 5:562-569, 2020, doi:10.1038/s41564-020-0688-y.
- 20 Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors, Tortorici MA, et al., *Nat Struct Mol Biol*, 26:481-489, 2019, doi:10.1038/s41594-019-0233-y.
- 21 Potent MERS-CoV fusion inhibitory peptides identified from HR2 domain in spike protein of bat coronavirus HKU4, Xia S, et al., *Viruses*, 11, 2019, doi:10.3390/v11010056.
- 22 Towards a solution to MERS: protective human monoclonal antibodies targeting different domains and functions of the MERS-coronavirus spike glycoprotein, Widjaja I, et al., *Emerg Microbes Infect*, 8:516-530, 2019, doi:10.1080/22221751.2019.1597644.
- 23 Importance of neutralizing monoclonal antibodies targeting multiple antigenic sites on the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus spike glycoprotein to avoid neutralization escape, Wang L, et al., *J Virol*, 92, 2018, doi:10.1128/JVI.02002-17.
- 24 Structural definition of a neutralization epitope on the N-terminal domain of MERS-CoV spike glycoprotein, Zhou H, et al., *Nat Commun*, 10:3068, 2019, doi:10.1038/s41467-019-10897-4.
- 25 Ultrapotent human neutralizing antibody repertoires against Middle East Respiratory Syndrome coronavirus from a recovered patient, Niu P, et al., *J Infect Dis*, 218:1249-1260, 2018, doi:10.1093/infdis/jiy311.
- 26 Evaluation of candidate vaccine approaches for MERS-CoV, Wang L, et al., *Nat Commun*, 6:7712, 2015, doi:10.1038/ncomms8712.
- 27 A humanized neutralizing antibody against MERS-CoV targeting the receptor-binding domain of the spike protein, Li Y, et al., *Cell Res*, 25:1237-1249, 2015, doi:10.1038/cr.2015.113.



ザルトリウス・ジャパン株式会社
〒140-0001 東京都品川区北品川1-8-11
Tel: 03-6478-5200 Fax: 03-6478-5494 E-mail: fortebiojp@sartorius.com