(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-517728
(P2025-517728A)
(43)公表日　令和7年6月10日(2025.6.10)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*16/10*	*(2006.01)*	C07K	16/10	ZNA	4B063	
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		4B065	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C085	
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	4H045	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全153頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-568079(P2024-568079)
(86)(22)出願日　令和5年5月17日(2023.5.17)
(85)翻訳文提出日　令和7年1月7日(2025.1.7)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/063375
(87)国際公開番号　WO2023/222825
(87)国際公開日　令和5年11月23日(2023.11.23)
(31)優先権主張番号　22174102.8
(32)優先日　令和4年5月18日(2022.5.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　23160838.1
(32)優先日　令和5年3月8日(2023.3.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　514185600
ブイアイビー ブイゼットダブリュ
ＶＩＢ ＶＺＷ
ベルギー王国 ９０５２ ゲント、スザンネ タシール ストラート １
Ｓｕｚａｎｎｅ Ｔａｓｓｉｅｒｓｔｒａａｔ １，９０５２ Ｇｅｎｔ，Ｂｅｌｇｉｕｍ
(71)出願人　516243478
ユニヴェルシテイト・ゲント
ベルギー国 ９０００ ヘント，シント－ピーテルスニーウストラート ２５
(71)出願人　501180768
フリーイェ・ユニヴェルシテイト・ブリュッセル
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　サルベコウイルスのスパイクＳ２サブユニットバインダー

(57)【要約】
本発明は、サルベコウイルスを強力に中和することが可能である、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のいずれか一方または両方を中和することが可能であるサルベコウイルス結合剤、特に抗体およびその抗原結合断片に関する。結合剤、特に抗体および抗体断片は、サルベコウイルスのスパイクタンパク質のヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメインに、より詳細には２つの隣接するＨＲ２ドメイン内に位置する四級エピトープに結合する。本発明はまた、これらの結合剤を使用する方法およびその使用に関する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
サルベコウイルスを中和することが可能な結合剤であって、配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｙ１２０６までの領域に対応するサルベコウイルスのスパイクタンパク質の領域または領域内に特異的に結合することを特徴とする結合剤。
【請求項２】
配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｌ１２０３、または好ましくはアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｌ１２０２までの領域に対応するスパイクタンパク質の領域または領域内に特異的に結合する、請求項１に記載の結合剤。
【請求項３】
配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｌ１２０３、または好ましくはアミノ酸Ｅ１１９４からアミノ酸Ｌ１２０２までの領域に対応するスパイクタンパク質の領域または領域内に特異的に結合する、請求項１または２に記載の結合剤。
【請求項４】
ウイルス膜に近位のサルベコウイルスのスパイクタンパク質のヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメインの領域に特異的に結合する、請求項１から３のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項５】
スパイクタンパク質三量体における四級エピトープに特異的に結合する、請求項１から４のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６】
スパイクタンパク質三量体の少なくとも２つのモノマーからのアミノ酸残基が、前記四級エピトープに寄与する、請求項５に記載の結合剤。
【請求項７】
配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９もしくはＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質の少なくとも１つのアミノ酸残基に特異的に結合するか；または配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９もしくはＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質の少なくとも１つのアミノ酸残基が、前記結合剤のスパイクタンパク質への結合に必須である、請求項１から６のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８】
配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６もしくはＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質の少なくとも１つのアミノ酸残基に特異的に結合するか；または配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６もしくはＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質の少なくとも１つのアミノ酸残基が、前記結合剤のスパイクタンパク質への結合に必須である、請求項１から６のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９】
配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質のアミノ酸残基、任意に、配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質のアミノ酸残基に特異的に結合するか；または配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１、任意に、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質のアミノ酸残基が、前記結合剤

のスパイクタンパク質への結合に必須である、請求項１から８のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１０】
スパイクタンパク質のプレフュージョンコンフォメーションを安定化する、例えば、スパイクタンパク質のＨＲ２コイルドコイルを安定化する、請求項１から９のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１１】
－ 水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）－サルベコウイルススパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイなどのサルベコウイルススパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイにおいて決定された場合、１００ｎｇ／ｍｌ以下、好ましくは１０ｎｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１ｎｇ／ｍｌ以下の５０％阻害濃度（IC_{50}）でサルベコウイルスを中和することが可能である；
－ ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２武漢株、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アルファバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．１バリアント、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．５バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２．７５．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．４．６バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＦ．７バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＱ．１．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢバリアントおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢ．１．５バリアントのうちの１つもしくは複数などのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２；ならびにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のいずれか一方もしくは両方を中和することが可能である；
－ サルベコウイルススパイクタンパク質を発現する細胞とアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）受容体を発現する細胞との間のスパイク媒介性シンシチア形成を阻害することが可能である；ならびに／または
－ 中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）に結合しない、請求項１から１０のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１２】
抗体または抗体断片を含むかまたはそれからなる、請求項１から１１のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１３】
免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）、好ましくはＶＨＨを含む、請求項１から１２のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１４】
前記ＩＳＶＤが、配列番号６３、４６、６９または７７のいずれか１つによって定義される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、配列番号６４、４７、７０、７３または７８のいずれか１つによって定義される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）、および配列番号４８、６７、７４または７９のいずれか１つによって定義される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；好ましくは、配列番号６５、７１、４９または８０のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ１、配列番号６６、７２、５０、７５または８１のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ２、および配列番号５１、６８、７６または８２のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ３を含む、請求項１３に記載の結合剤。
【請求項１５】
前記ＩＳＶＤが、各々独立して、配列番号１～１０のいずれかに存在するＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされ；好ましくは、前記ＩＳＶＤが、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３の組合せを含み、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が、配列番号１～１０に記載される配列のうちの特定の１つに存在する通りであり、前記ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる、請求項１３また

は１４に記載の結合剤。
【請求項１６】
前記ＩＳＶＤが、配列番号６３によって定義されるＣＤＲ１、配列番号６４によって定義されるＣＤＲ２、および配列番号４８によって定義されるＣＤＲ３；好ましくは、配列番号６５によって定義されるＣＤＲ１、配列番号６６によって定義されるＣＤＲ２、および配列番号５１によって定義されるＣＤＲ３；より好ましくは、配列番号５２～５４のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ１、配列番号５５～６２のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ２、および配列番号２１～２７のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ３を含む、請求項１３から１５のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１７】
前記ＩＳＶＤが、配列番号１～１０、および１２７～１２９からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１４から１６のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１８】
配列番号１～１０、および１２７～１２９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＩＳＶＤを含む、請求項１から１７のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１９】
多価形態であり、好ましくは、Ｆｃドメインに融合したＩＳＶＤを含む、請求項１から１８のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２０】
配列番号９６、１１８、１３０または１３１のいずれか１つによって定義されるアミノ酸配列を含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２１】
請求項１から２０のいずれか一項において定義される結合剤を含み、サルベコウイルススパイクタンパク質受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に特異的に結合する結合剤をさらに含む多重特異性結合剤。
【請求項２２】
前記ＲＢＤに特異的に結合する前記結合剤が、配列番号１２５もしくは配列番号１２４に記載される配列を含むＩＳＶＤまたはそのヒト化形態などの、配列番号１２４によって定義されるＶＨＨ７２による特異的結合を受けるエピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能な少なくとも１つのＩＳＶＤを含む、請求項２１に記載の多重特異性結合剤。
【請求項２３】
前記ＲＢＤに特異的に結合する前記結合剤が、配列番号１２７に記載される配列を含むＩＳＶＤまたはそのヒト化形態などの、配列番号１２７によって定義されるＶＨＨ３．１１７による特異的結合を受けるエピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能な少なくとも１つのＩＳＶＤを含む、請求項２１または２２に記載の多重特異性結合剤。
【請求項２４】
配列番号１１２～１１７のいずれか１つによって定義されるアミノ酸配列を含む、請求項２１から２３のいずれか一項に記載の多重特異性結合剤。
【請求項２５】
請求項１から２４のいずれか１つに記載の結合剤をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子；前記核酸分子を含むベクター；あるいは請求項１から２４のいずれか一項に記載の結合剤を発現するか、または前記核酸分子もしくは前記ベクターを含む細胞。
【請求項２６】
請求項１から２０のいずれか一項において定義される結合剤を含み、サルベコウイルススパイクタンパク質受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に特異的に結合する結合剤をさらに含む組成物。
【請求項２７】

前記ＲＢＤに特異的に結合する前記結合剤が、配列番号１２４によって定義されるＶＨＨ７２による特異的結合を受けるエピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能な少なくとも１つのＩＳＶＤ、および配列番号１１９によって定義される結合剤などの、配列番号１２７によって定義されるＶＨＨ３．１１７による特異的結合を受けるエピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能な少なくとも１つのＩＳＶＤを含む、請求項２６に記載の組成物。

【請求項２８】

配列番号１１８によって定義される結合剤および配列番号１１９によって定義される結合剤を含む、請求項２６または２７に記載の組成物。

【請求項２９】

請求項１から２０のいずれか一項に記載の結合剤、請求項２１から２４のいずれか一項に記載の多重特異性結合剤、請求項２５に記載の核酸分子、請求項２５に記載のベクター、もしくは請求項２６から２８のいずれか一項に記載の組成物、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物、または請求項１から２０のいずれか一項に記載の結合剤、請求項２１から２４のいずれか一項に記載の多重特異性結合剤、もしくは請求項２６から２８のいずれか一項に記載の組成物を含む診断キットなどのキット。

【請求項３０】

医薬における使用、好ましくは対象におけるサルベコウイルス感染症の防止もしくは処置における使用、または対象におけるサルベコウイルス感染症の診断における使用のための、請求項１から２０のいずれか一項に記載の結合剤、請求項２１から２４のいずれか一項に記載の多重特異性結合剤、請求項２５に記載の核酸分子、請求項２５に記載のベクター、請求項２６から２８のいずれか一項に記載の組成物、請求項２９に記載の医薬組成物、または請求項２９に記載のキット。

【請求項３１】

試料中のサルベコウイルスを検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、

－　前記試料を、請求項１から２０のいずれか一項に記載の結合剤または請求項２１から２４のいずれか一項に記載の多重特異性結合剤と接触させるステップと、

－　前記結合剤とサルベコウイルスまたはその一部との結合を決定するステップと

を含むｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、広くは結合剤、特に抗体の分野に属する。より詳細には、本発明は、サルベコウイルス、例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１を強力に中和することが可能なサルベコウイルス（Ｓａｒｂｏｃｏｖｉｒｕｓ）のスパイクタンパク質に結合する結合剤（ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）、特に抗体およびその抗原結合断片に関する。本発明はまた、これらの結合剤を使用する方法およびその使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）はＣＯＶＩＤ－１９の原因物質である（Ｚｈｕら　２０２０、Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　３８２：７２７～７３３頁）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染は無症状のこともあれば、軽度から中等度の重篤な症状を呈することもある。しかし、患者のおよそ１０％において、ＣＯＶＩＤ－１９は呼吸困難および低酸素血症を特徴とするより重篤な段階へと進行し、さらに進行すると、しばしば長期の集中治療を必要とする急性呼吸困難となり、一部の患者では死に至る。「ロングＣＯＶＩＤ」はさらに、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスが検出されなくなった場合でも生じるＣＯＶＩＤ－１９感染による長期的影響を指す。

【０００３】

特定のタイプの治療アプローチは、中和抗体、すなわち受動的抗体療法／免疫療法に依存する可能性がある。ＳＡＲＳコロナウイルスのスパイクは中和抗体の主要な標的である。このスパイクタンパク質はクラスＩの融合タンパク質であり、膜遠位のＳ１サブユニットと膜近位のＳ２サブユニットから構成されている。Ｓ１サブユニットは受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）を含み、このドメインに対する抗体は非常に強い中和活性を有することがある（Ｗｈｅａｔｌｅｙら　２０２１．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ　３７：１０９８２２頁）。Ｓ１サブユニット、特にＮ末端ドメインおよびＲＢＤは、抗原性変異および免疫逃避をもたらす変異を許容し得る。ＲＢＤは免疫優性でもある（Ｐｉｃｃｏｌｉら　２０２０．Ｃｅｌｌ　１８３：１０２４～１０４２頁）。

【０００４】

Ｓ２サブユニットは膜融合を担っており、その過程では、Ｓ２は大きな構造変化を起こす（Ｄｏｄｅｒｏ－Ｒｏｊａｓら　２０２１．ｅＬｉｆｅ　１０：ｅ７０３６２頁）。Ｓ２サブユニットはより保存されているため、少なくとも理論的には、広範な抗サルベコウイルス防御能を有する中和抗体の開発にとって魅力的な標的と思われる。ＳＡＲＳコロナウイルスのＳ２サブユニットの保存エピトープを認識するモノクローナル抗体がいくつか報告されている。しかし、一般にこれらのモノクローナル抗体はウイルス中和活性が低い。例えば、Ｓ２サブユニット特異的モノクローナル抗体Ｌ１９は、真正のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスを９．９～１９．８μｇ／ｍｌのＩＣ$_{100}$で中和する（Ａｎｄｒｅａｎｏら　２０２１．Ｃｅｌｌ　１８４：１８２１～１８３５頁）。Ｗｕら（２０２２．ＪＣＩ　Ｉｎｓｉｇｈｔ　７：ｅｅ１５７５９７頁）は、ＨＲ２ドメインのＮ末端に位置するエピトープにおいてＨＲ２ドメインを標的とするモノクローナル抗体、Ｍａｂ５およびＭａｂ３－２を同定した。この２つのｍＡｂはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対する中和能を有し、Ｍａｂ５のＩＣ$_{50}$値は１２．３μｇ／ｍＬ、Ｍａｂ３－２のＩＣ$_{50}$値は８７．４μｇ／ｍＬであった。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳ２サブユニットに対する、ナノボディまたはＶＨＨとしても知られる単一ドメイン抗体も報告されている（Ｍａｓｔら　２０２１．ｅＬｉｆｅ　１１０：ｅ７３０２７頁；Ｒｏｓｓｏｔｔｉら　２０２１．ＤＯＩ：１０．１１０１／２０２１．１２．２０．４７３４０１頁）。ここでも、報告されたＳ２サブユニットに結合するＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和力は非常に低かった。Ｒｏｓｓｏｔｔｉら（２０２１）に記載されているＩｇＧ１－Ｆｃに融合したＳ２サブユニット特異的ＶＨＨ　Ｓ２Ａ３は、武漢株のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を１２．２ｎＭのＩＣ$_{50}$で中和することができたが、フォーマットなしでは中和しなかった。

【発明の概要】

【０００５】

したがって、サルベコウイルスのスパイクタンパク質を標的とする強力な中和抗体に対するニーズが当技術分野には残っている。

【０００６】

本発明のある特定の実施形態を例示する実験セクションにおいて実証されるように、本発明者らは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４Ｇバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　アルファバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＡ．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＡ．５バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＡ．２．７５．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＡ．４．６バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＦ．７バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＱ．１．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢバリアント、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢ．１．５バリアントなどのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、ならびにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１を強力に中和した重鎖抗体（ＶＨＨ）のサルベコウイルス特異的可変ドメインを特定した。さらなる解析により、これらのＶＨＨはスパイクタンパク質のＳ２サブユニット内、特にＳ２サブユニットのヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメイン内、より詳細にはウイルス膜に近位のＨＲ２ドメインのＣ末端領域内のアミノ酸と相互作用し、これらのアミノ酸が複数のクレードのサルベコウイルスの

スパイクタンパク質において高度に保存されていることが判明した。したがって、この領域はより安定であり、頻繁な変異の影響を受けにくいと予想される。

【０００７】

したがって、一態様では、本発明は、サルベコウイルスを中和することが可能な結合剤であって、ウイルス膜に近位のサルベコウイルスのスパイクタンパク質のヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメインの領域に特異的に結合することを特徴とする結合剤に関する。

【０００８】

ある態様は、サルベコウイルスを中和することが可能な結合剤であって、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｙ１２０６までの領域に対応するサルベコウイルスのスパイクタンパク質の領域または領域内に特異的に結合することを特徴とする結合剤を提供する。

【０００９】

ある特定の好ましい実施形態では、結合剤は、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｌ１２０３までの領域に対応するスパイクタンパク質の領域または領域内に特異的に結合する。

【００１０】

ある特定の好ましい実施形態では、結合剤は、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｌ１２０２までの領域に対応するスパイクタンパク質の領域または領域内に特異的に結合する。

【００１１】

現在利用可能なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２処置選択肢の全体的な数がまだ限られており、特に、複数のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントが出現しており、これらのバリアントの一部が、より感染力が強く、ならびに／またはより重篤な疾患症状を引き起こし（若年者を含む）、ならびに／または既存のワクチンおよび／もしくは診断検査の一部を免れていることを考慮すると、スパイクタンパク質のより高度に保存されたＳ２サブユニットに結合するこのようなサルベコウイルス中和結合剤は追加されるべき貴重なツールである。

【００１２】

さらなる態様では、本発明は、本発明による結合剤をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子、ならびにこのような核酸分子を含むベクター、およびこのような核酸分子もしくはこのようなベクターを含む細胞、または本発明による結合剤を発現する細胞に関する。

【００１３】

本発明はさらに、本発明による結合剤、または上記のような核酸分子もしくはベクター、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物、ならびに本発明による結合剤を含む診断キットのようなキットに関する。

【００１４】

さらなる態様は、対象におけるサルベコウイルス感染の防止もしくは処置における使用、または対象におけるサルベコウイルス感染の診断における使用などの医薬における使用のための、本発明による結合剤、上記のような核酸分子もしくはベクター、医薬組成物、または上記のようなキットを対象とする。

【００１５】

本発明はさらに、試料中のサルベコウイルスを検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ方法に関し、前記方法は、

－　試料を本発明による結合剤と接触させるステップと、

－　結合剤とサルベコウイルスまたはその一部との結合を決定するステップと

を含む。

【００１６】

当業者であれば、以下に提供される詳細な説明および実施例から、本発明の方法、使用または生成物の他の多くの効果および利点、ならびに本発明の最終用途の多数の可能性を認識するであろう。

【図面の簡単な説明】
【００１７】
【図１－１】単離したクローンの大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ペリプラズム抽出物（ＰＥ）中に存在するＶＨＨは、ＥＬＩＳＡにおいて、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（ＳＣ２　Ｓ（６Ｐ））、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ（ＳＣ２　ＲＢＤ）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニット（ＳＣ２　Ｓ２）およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質（ＳＣ１　Ｓ）に結合する。（Ａ）ＥＬＩＳＡプレートにコーティングされた抗Ｈｉｓ抗体によって捕捉されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に関する３ラウンドのバイオパニング（Ｒ１～Ｒ３）後に単離されたクローン（Ｒ３＿Ｃｘｘ）のＥＬＩＳＡ。（Ｂ）３ラウンドの、抗Ｈｉｓ抗体によって捕捉されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に関するバイオパニング（Ｒ１～２）と、それに続く、直接コーティングされたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に関するバイオパニング（Ｒ３）の後に単離されたクローン（Ｒ３＿ＤＣｘｘ）のＥＬＩＳＡ。
【図１－２】（Ｃ）ＥＬＩＳＡプレートにコーティングされた抗Ｈｉｓ抗体によって捕捉されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に関する４ラウンドのバイオパニング（Ｒ１～Ｒ４）後に単離されたクローン（Ｒ４＿Ｃｘｘ）のＥＬＩＳＡ。（Ｄ）４ラウンドの、抗Ｈｉｓ抗体によって捕捉されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に関するバイオパニング（Ｒ１～２）と、それに続く、直接コーティングされたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に関するバイオパニング（Ｒ３～Ｒ４）後に単離されたクローン（Ｒ４＿ＤＣｘｘ）のＥＬＩＳＡ。グラフは、各ＰＥ試料について、対照抗原（ＢＳＡ）に関する対応するＰＥ試料のＥＬＩＳＡ　ＯＤ　４５０シグナルに対する、示された抗原に関するＥＬＩＳＡ　ＯＤ　４５０シグナルの比率を示す。ＲＢＤに結合するＶＨＨである、ＶＨＨ３．８３（３．８３）を発現する大腸菌細胞から調製されたペリプラズム抽出物は対照として使用された。ペリプラズム抽出物を調製するために使用された緩衝液は陰性対照として使用された（ＴＥＳ）。
【図２－１】ＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイクのＳ２サブユニットに結合することができるＶＨＨの配列解析。（Ａ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイクのＳ２サブユニットに結合するファミリー１　ＶＨＨのアライメント。ＶＨＨの全配列のアライメントに基づき、Ｓ２に結合するＶＨＨの２つのファミリー（ファミリー１およびファミリー２）を同定することができた。ファミリー１のＶＨＨの配列が以下に示されている：Ｒ３＿Ｃ４およびＲ３＿ＤＣ１３（配列番号１）、Ｒ３＿ＤＣ１９（配列番号８３）、Ｒ３＿ＤＣ２１およびＲ３＿ＤＣ２２（配列番号８４）、Ｒ３＿Ｃ２２およびＲ４＿ＤＣ１６（配列番号２）、Ｒ３＿ＤＣ２０（配列番号３）、Ｒ３＿ＤＣ１、Ｒ３＿ＤＣ９、Ｒ３＿ＤＣ１４およびＲ３＿ＤＣ１５（配列番号９）、Ｒ３＿ＤＣ２（配列番号４）、Ｒ４＿ＤＣ２０（配列番号５）、Ｒ３＿ＤＣ１２およびＲ４＿ＤＣ１３（配列番号１０）、Ｒ３＿ＤＣ５（配列番号８５）、Ｒ４＿ＤＣ２４、Ｒ４＿ＤＣ２１、Ｒ３＿ＤＣ１１およびＲ４＿ＤＣ９（配列番号６）、Ｒ３＿ＤＣ８、Ｒ４＿ＤＣ３およびＲ４＿ＤＣ６（配列番号７）、Ｒ３＿ＤＣ２３（配列番号８）。アミノ酸残基の番号付けはＫａｂａｔの番号付けに従って行った。Ｋａｂａｔに従ってアノテーションされたＣＤＲ１、２および３は、それぞれ左、中央および右のボックスで示されている。
【図２－２】（Ｂ）ＣＤＲ３アミノ酸配列に基づくファミリー１　ＶＨＨの系統解析。灰色でマークされたＶＨＨは、中規模生産とＮｉ－ＮＴＡ精製用に選択された。「＊」で示されたＶＨＨはＮ－グリコシル化部位モチーフを含有する。
【図３－１】選択したＳ２に結合するＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　武漢バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニットのスパイクタンパク質を認識するが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤは認識しない。グラフは、対照のＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）を含む示されたＶＨＨ、または基質にコーティングされた、武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質Ｓ－６Ｐ（Ａ）、ＲＢＤ（Ｅ）およびＳ２サブユニット（Ｄ）、オミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質（Ｂ）、ならびにＳＡＲＳ－

ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質（Ｃ）、または基質にコーティングされたＢＳＡ（Ｆ）に対するＳ３０９対照モノクローナル抗体の希釈系列のＯＤ　４５０　ＥＬＩＳＡシグナルを示す。

【図３－２】選択したＳ２に結合するＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　武漢バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニットのスパイクタンパク質を認識するが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤは認識しない。グラフは、対照のＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）を含む示されたＶＨＨ、または基質にコーティングされた、武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質Ｓ－６Ｐ（Ａ）、ＲＢＤ（Ｅ）およびＳ２サブユニット（Ｄ）、オミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質（Ｂ）、ならびにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質（Ｃ）、または基質にコーティングされたＢＳＡ（Ｆ）に対するＳ３０９対照モノクローナル抗体の希釈系列のＯＤ　４５０　ＥＬＩＳＡシグナルを示す。

【図３－３】選択したＳ２に結合するＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　武漢バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニットのスパイクタンパク質を認識するが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤは認識しない。グラフは、対照のＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）を含む示されたＶＨＨ、または基質にコーティングされた、武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質Ｓ－６Ｐ（Ａ）、ＲＢＤ（Ｅ）およびＳ２サブユニット（Ｄ）、オミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質（Ｂ）、ならびにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質（Ｃ）、または基質にコーティングされたＢＳＡ（Ｆ）に対するＳ３０９対照モノクローナル抗体の希釈系列のＯＤ　４５０　ＥＬＩＳＡシグナルを示す。

【図３－４】選択したＳ２に結合するＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　武漢バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニットのスパイクタンパク質を認識するが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤは認識しない。グラフは、対照のＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）を含む示されたＶＨＨ、または基質にコーティングされた、武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質Ｓ－６Ｐ（Ａ）、ＲＢＤ（Ｅ）およびＳ２サブユニット（Ｄ）、オミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質（Ｂ）、ならびにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質（Ｃ）、または基質にコーティングされたＢＳＡ（Ｆ）に対するＳ３０９対照モノクローナル抗体の希釈系列のＯＤ　４５０　ＥＬＩＳＡシグナルを示す。

【図３－５】選択したＳ２に結合するＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　武漢バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニットのスパイクタンパク質を認識するが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤは認識しない。グラフは、対照のＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）を含む示されたＶＨＨ、または基質にコーティングされた、武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質Ｓ－６Ｐ（Ａ）、ＲＢＤ（Ｅ）およびＳ２サブユニット（Ｄ）、オミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質（Ｂ）、ならびにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質（Ｃ）、または基質にコーティングされたＢＳＡ（Ｆ）に対するＳ３０９対照モノクローナル抗体の希釈系列のＯＤ　４５０　ＥＬＩＳＡシグナルを示す。

【図３－６】選択したＳ２に結合するＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　武漢バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニットのスパイクタンパク質を認識するが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤは認識しない。グラフは、対照のＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）を含む示されたＶＨＨ、または基質にコーティングされた、武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質Ｓ－６Ｐ（Ａ）、ＲＢＤ（Ｅ）およびＳ２サブユニット（Ｄ）、オミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質（Ｂ）、ならびにＳＡＲＳ－

ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質（Ｃ）、または基質にコーティングされたＢＳＡ（Ｆ）に対するＳ３０９対照モノクローナル抗体の希釈系列のＯＤ　４５０　ＥＬＩＳＡシグナルを示す。

【図４】Ｓ２を標的とするＶＨＨは細胞表面に発現したスパイクタンパク質に効率的に結合する。（Ａ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現する細胞に対するＲ３＿ＤＣ２３、Ｒ４＿ＤＣ６およびＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）対照の結合のフローサイトメトリー解析。グラフは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（６１４Ｇ－ｄｅｌ１８）発現ベクター（スパイクＤ６１４Ｇ）と組み合わせたＧＦＰ発現ベクターをトランスフェクトしたＧＦＰ発現細胞へのＶＨＨの結合を検出するための、ＡＦ６４７がコンジュゲートした抗マウスＩｇＧの平均蛍光強度（ＭＦＩ）を示す。（Ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現していない細胞に対するＲ３＿ＤＣ２３、Ｒ４＿ＤＣ６およびＧＢＰ対照ＶＨＨの結合のフローサイトメトリー解析。グラフは、ＧＦＰ発現ベクターを対照発現ベクターと組み合わせてトランスフェクトしたＧＦＰ発現細胞へのＶＨＨの結合を検出する、ＡＦ６４７がコンジュゲートした抗マウスＩｇＧのＭＦＩを示す。

【図５－１】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスを中和する。Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞は、様々な濃度の示されたＶＨＨと共にプレインキュベートされた、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスにより形質導入された。１５時間後、ＧＦＰ蛍光を蛍光光度計で測定した。（Ａ）グラフは、ＶＨＨ希釈系列（Ｎ＝３±ＳＤ）の平均ＧＦＰ蛍光強度を、各希釈系列に含まれる非感染対照細胞および未処理の感染細胞のＧＦＰ蛍光強度値に対してそれぞれ正規化したものを示す。

【図５－２】（Ｂ）各ＶＨＨ希釈系列について、線形回帰曲線フィッティング（可変勾配を伴うｌｏｇ（阻害剤）対正規化された応答）を使用してＩＣ５０を計算した。グラフは、試験された各中和ＶＨＨのＩＣ５０計算値（Ｎ＝３±ＳＤ）を示す。

【図６－１】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスのＴＭＰＲＳＳ２媒介性感染を防止することができる。Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞は、様々な濃度の示されたＶＨＨと共にプレインキュベートされた、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスにより形質導入された。１５時間後、ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計を用いて測定された。（Ａ）グラフは、ＶＨＨ希釈系列（Ｎ＝３±ＳＤ）の平均ＧＦＰ蛍光強度を、いずれも各プレートも含まれる非感染対照細胞および未処理の感染細胞のＧＦＰ蛍光強度値に対してそれぞれ正規化したものを示す。

【図６－２】（Ｂ）各ＶＨＨ希釈系列について、線形回帰曲線フィッティング（可変勾配を伴うｌｏｇ（阻害剤）対正規化された応答）を使用してＩＣ５０を算出した。グラフは、試験した各中和ＶＨＨのＩＣ５０計算値（Ｎ＝３±ＳＤ）を示す。

【図７－１】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２武漢スパイクタンパク質でシュードタイプ化された複製コンピテントＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスを中和する。Ｋｏｅｎｉｇら（２０２１）によって記載された１００ＰＦＵの複製コンピテントＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルス（ＶＳＶ－ΔＧ　ＳＣ２Ｓ　ＥＧＦＰ　Ｓ１０ａ）は、示されたＶＨＨとプレインキュベートされ、Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞に感染させるために使用された。感染の２日後、ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計を用いて測定された。（Ａ）グラフは、ＶＨＨ希釈系列（Ｎ＝２±ＳＤ）の平均ＧＦＰ蛍光強度を、各希釈系列に含まれる非感染対照細胞および未処理の感染細胞のＧＦＰ蛍光強度値に対してそれぞれ正規化したものを示す。

【図７－２】（Ｂ）各ＶＨＨ希釈系列について、線形回帰曲線フィッティング（可変勾配を伴うｌｏｇ（阻害剤）対正規化された応答）を使用してＩＣ５０を算出した。グラフは、試験された各中和ＶＨＨのＩＣ５０計算値（Ｎ＝２±ＳＤ）を示す。

【図８－１】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１ス

パイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスを中和する。Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞は、様々な濃度の示されたＶＨＨと共にプレインキュベートされた、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスにより形質導入された。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２バリアントを中和することが知られているＳ３０９モノクローナル抗体が陽性対照として使用された。１５時間後、ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計を用いて測定された。（Ａ）グラフは、ＶＨＨ希釈系列（Ｎ＝１）の平均ＧＦＰ蛍光強度を、各希釈系列に含まれる非感染対照細胞および最も低濃度のＶＨＨで処置された感染細胞のＧＦＰ蛍光強度値に対してそれぞれ正規化したものを示す。

【図８－２】（Ｂ）各ＶＨＨ希釈系列について、線形回帰曲線フィッティング（可変勾配を伴うｌｏｇ（阻害剤）対正規化された応答）を使用してＩＣ５０を計算した。グラフは、試験された各中和ＶＨＨのＩＣ５０計算値（Ｎ＝１）を示す。

【図９－１】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスを中和する。Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞（Ａ）またはＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞（Ｂ）は、様々な濃度の示されたＶＨＨと共にプレインキュベートされた、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスにより形質導入された。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１を中和することが知られるＶＨＨ７２－Ｓ５６Ａナノボディが陽性対照として使用された。１５時間後、ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計を用いて測定された。グラフは、ＶＨＨ希釈系列（Ｎ＝２±ＳＤ）の平均ＧＦＰ蛍光強度を、いずれも各希釈系列に含まれる非感染対照細胞および未処置の感染細胞のＧＦＰ蛍光強度値に対してそれぞれ正規化したものを示す。

【図９－２】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスを中和する。Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞（Ａ）またはＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞（Ｂ）は、様々な濃度の示されたＶＨＨと共にプレインキュベートされた、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスにより形質導入された。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１を中和することが知られるＶＨＨ７２－Ｓ５６Ａナノボディが陽性対照として使用された。１５時間後、ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計を用いて測定された。グラフは、ＶＨＨ希釈系列（Ｎ＝２±ＳＤ）の平均ＧＦＰ蛍光強度を、いずれも各希釈系列に含まれる非感染対照細胞および未処置の感染細胞のＧＦＰ蛍光強度値に対してそれぞれ正規化したものを示す。

【図９－３】（Ｃ）各ＶＨＨ希釈系列について、線形回帰曲線フィッティング（可変勾配を伴うｌｏｇ（阻害剤）対正規化された応答）を使用してＩＣ５０を計算した。グラフは、Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞とＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞の両方に関する試験された各中和ＶＨＨのＩＣ５０計算値（Ｎ＝２±ＳＤ）を示す。

【図１０－１】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＡ．２スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスを中和する。Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞は、様々な濃度の示されたＶＨＨと共にプレインキュベートされた、６１４Ｇスパイクタンパク質、またはオミクロンＢＡ．１もしくはオミクロンＢＡ．２バリアントのスパイクタンパク質のいずれかでシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスにより形質導入された。１５時間後、ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計を用いて測定された。（Ａ）グラフは、ＶＨＨ希釈系列（Ｎ＝２±ＳＤ）の平均ＧＦＰ蛍光強度を、各希釈系列に含まれる非感染対照細胞および未処理の感染細胞のＧＦＰ蛍光強度値に対してそれぞれ正規化したものを示す。

【図１０－２】（Ｂ）各ＶＨＨ希釈系列について、線形回帰曲線フィッティング（可変勾配を伴うｌｏｇ（阻害剤）対正規化された応答）を使用してＩＣ５０を計算した。グラフは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇスパイクタンパク質（６１４Ｇ）、またはオミクロンＢＡ．１（ＢＡ．１）もしくはオミクロンＢＡ．２（ＢＡ．２）バリアントのスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスにより形質導入

されたＶｅｒｏ　Ｅ６細胞における、各試験された中和ＶＨＨのＩＣ５０計算値（Ｎ＝２±ＳＤ）を示す。
【図１１】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、真正の６１４ＧおよびオミクロンＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスを中和することができる。Ｒ３＿ＤＣ２３またはＲ４＿ＤＣ６の希釈系列は、約４０ＰＦＵの６１４ＧバリアントＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２またはオミクロンＢＡ．１ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスと３７℃で１時間プレインキュベートされ、その後Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞に感染させるために使用された。アルファおよびオミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを中和することが知られている抗体Ｓ３０９が陽性対照として使用された。感染の２日後、細胞は固定され、クリスタルバイオレットで染色されて、ウイルス斑が可視化された。グラフは、示されたＶＨＨ濃度または抗体濃度における、６１４Ｇ（Ａ）またはオミクロンＢＡ．１（Ｂ）のウイルス斑の平均数（Ｒ３＿ＤＣ２３およびＲ４°ＤＣ６についてはＮ＝２±ＳＤ、Ｓ３０９についてはＮ＝１）を示す。曲線は非線形回帰を使用してフィッティングした（可変勾配に対するｌｏｇ（阻害剤）（４つのパラメータ））。
【図１２】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、Ｓ１サブユニットの脱落を惹起しない。（Ａ）示されたＶＨＨ構築物と共に３０分間インキュベートしたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現するＲａｊｉ細胞（Ｒａｊｉスパイク）、または発現しないＲａｊｉ細胞（Ｒａｊｉ）の増殖培地（ＳＮ）および細胞溶解物（ＬＹＳ）の抗Ｓ１ウェスタンブロット解析を示すパネル。ＣＢ６抗体およびＳ３０９抗体は、それぞれＳ１の脱落を惹起する、および惹起しないことが知られており、対照として使用された。ブロットの右側の下と上の三角形はそれぞれ、スパイクタンパク質のフューリンに媒介される切断後に生じたＳ１スパイクサブユニット、および細胞内の未切断スパイクタンパク質を示す。（Ｂ）Ｓ１脱落の定量。グラフは、増殖培地中で検出されたＳ１ウェスタンブロットシグナル（脱落）と、細胞溶解物中で検出されたＳ１ウェスタンブロットシグナル（非脱落＋細胞内）との計算された比率を示す。
【図１３】Ｓ２を標的とするＶＨＨは融合を強力に阻害する。ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３は、ＧＦＰを発現するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクシュードタイプ複製－コンピテントＶＳＶウイルスを感染させたＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞のコンフルエント単層のシンシチウム形成を妨げる。Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞に４０　ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクシュードタイプ複製－コンピテントＶＳＶウイルスを感染させ、２時間後に示されたモノクローナル抗体（パリビズマブ、Ｓ３０９またはＣＢ６）またはＶＨＨ（ＧＢＰまたはＲ３＿ＤＣ２３）が最終濃度１０μｇ／ｍｌまで添加された。非感染細胞が陰性対照として使用された。細胞は一晩インキュベートされ、蛍光顕微鏡で画像化された。ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計で測定された。（Ａ）示されたＶＨＨまたはモノクローナル抗体で処置された感染細胞で発現したＧＦＰの代表的画像。（Ｂ）ＧＦＰ蛍光強度（平均±ＳＥＭ、Ｎ＝４）を示すグラフ。Ｓ３０９で処置された試料において測定されたＧＦＰ蛍光は、パリビズマブ対照抗体で処置された試料よりも有意に低かった（ｐ＜０．０５、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ）。Ｒ３＿ＤＣ２３で処置された試料において測定されたＧＦＰ蛍光は、ＧＢＰ対照ＶＨＨで処置された試料よりも有意に低かった（ｐ＜０．０５、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ）。Ｒ３＿ＤＣ２３で処置された試料において測定されたＧＦＰ蛍光は、Ｓ３０９で処置された試料よりも有意に低かった（ｐ＜０．０５、Ｍａｎｎ－Ｗｈｉｔｎｅｙ）。
【図１４－１】Ｓ２を標的とするＶＨＨは融合を強力に阻害する。Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞に４０ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクシュードタイプ複製－コンピテントＶＳＶウイルスを感染させ、２時間後に示されたモノクローナル抗体（Ｓ３０９またはＣＢ６）またはＶＨＨ（ＧＢＰ、Ｒ３＿ＤＣ２３、Ｒ３＿Ｃ４またはＲ３＿ＤＣ２０）の希釈系列が添加された。非感染細胞が陰性対照として使用された。細胞は一晩インキュベートされ、蛍光顕微鏡で画像化された。ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計で測定された。（Ａ）１０、０．４または０．００３２μｇ／ｍｌの示されたＶＨＨまたはモノクローナル抗体で処置された感染細胞で発現したＧＦＰの代表的画像。矢印は単一のＧＦＰ陽性感染

細胞を示す。
【図１４－２】（Ｂ）ＧＦＰ蛍光強度（平均±ＳＥＭ、Ｎ＝２）を示すグラフ。
【図１５】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、スパイク発現Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞の融合を強力に阻害する。Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞は、対照発現ベクター（スパイクなし）またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク発現ベクターのいずれかと組み合わせたＧＦＰ発現ベクターをトランスフェクトされた。トランスフェクションの２時間後に、ＰＢＳ、または示されたモノクローナル抗体（Ｓ３０９またはパリビズマブ）またはＶＨＨ（Ｒ３＿ＤＣ２３またはＲ３＿Ｃ４）は最終濃度１０μｇ／ｍｌまで添加された。トランスフェクションの２２時間後に細胞は固定され、蛍光顕微鏡を使用して画像化された。パネルは示された試料の代表的な画像を示す。スパイクなし＝対照発現ベクターと組み合わせたＧＦＰ発現ベクターでトランスフェクトされたＰＢＳ処置細胞；ＰＢＳ、パリビズマブ、Ｒ３＿ＤＣ２３、Ｒ３＿Ｃ４およびＳ３０９＝ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク発現ベクターと組み合わせたＧＦＰ発現ベクターをトランスフェクトされ、それぞれの構築物で処置された細胞。
【図１６－１】ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３はＨＲ２領域の膜近傍部位でスパイクタンパク質に結合する。完全にインタクトなフューリン切断部位を有する武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質でシュードタイプ化された複製－コンピテントＧＦＰ発現ＶＳＶウイルスを使用して、Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＳＳ２細胞においてウイルス逃避選択が実施された。１０μｇ／ｍｌのＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３の存在下でシンシチウム形成を示したウェルから、限界希釈法を使用して単一プラークが単離された。得られた逃避バリアントのスパイクタンパクコード配列がシーケンシングされ、ＷＴウイルスの配列に対してアラインされた。選択されたウイルスはそれぞれ、単一のアミノ酸置換を含有した。（Ａ）Ｒ３＿ＤＣ２３結合領域の配列。ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３からのウイルス逃避選択は、ＨＲ２内の限られた膜近傍領域内の４つの位置における５つの異なるＡＡ置換に関連する。示された配列（配列番号８８）は、ステムヘリックスおよびヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメインから構成されるスパイクステム領域（アミノ酸１１４０～１２１１）に対応する。太字と下線のアミノ酸は、単離された９つの逃避バリアントにおいて変異した位置を示す。太字と下線のＡｓｐ（Ｎ）とＬｅｕ（Ｌ）の間のＡｓｎ（Ｎ）はＮ－グリコシル化部位である。
【図１６－２】（Ｂ）Ｒ３＿ＤＣ２３結合領域の構造の詳細。左の図は全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のモデルを表し、膜貫通領域（ＴＭ）およびＨＲ２が示されている（Ｃａｓａｌｉｎｏら（２０２０）ＡＣＳ　Ｃｅｎｔ　Ｓｃｉ．６：１７２２～１７３４頁）。中央と右の画像は、ＨＲ２ドメインをそれぞれ表面と漫画で拡大したものである（２ＦＸＰ、Ｈａｋａｎｓｓｏｎ－ＭｃＲｅｙｎｏｌｄｓら（２００６）Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２８１：１１９６５～７１頁）。表面表示画像では、棒はモデル化された糖部分を表し、ＴＭは灰色で着色され、選択された変異が３つのプロトマーに局在する位置は黒色で示されている。中央の画像では、矢印がそれぞれプロトマー１内のＮ１１９２とＱ１２０１の変異位置をピンポイントで示している。他の２つの目に見える逃避変異（黒色で示されている）は、それぞれプロトマー３および２に局在する。漫画で示されたプロトマーの１つでは、変異が観察された位置が棒として黒色で示されている。
【図１７】ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３は、サルベコウイルス間で高度に保存されているＨＲ２ドメインの部位でスパイクタンパク質に結合する。Ｌｅｔｋｏら（２０２０、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　５：５　６２～５６９頁）によって研究され、ＢｔＫＹ７２クレード３のサルベコウイルスのアミノ酸配列が追加された、クレード１、２および３のサルベコウイルスのセットのスパイクステム領域のアミノ酸配列をアラインして、その保存性を可視化した：武漢＿ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、ＷＩＶ１、Ｒｓ４０８４、ＳＨＣ０１４、Ｒｓ７３２７、Ｒｓ４２３１、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ＿ウルバニ、竜泉－１４０、ＨＫＵ３－８、ＨＫＵ３－１３、Ｒｓ４２３７、Ｒｓ４２４７、Ａｓ５６２６、Ｒｐ３、２７９、Ｒｓ４０８１、雲南２０１１、Ｈｕｂ２０１３、陝西２０１１、ＹＮ２０１３およびＲｆ４０９８（配列番号８８）；ＬＹＲａ１１（配列番号８９）；２７３－２００５、Ｒｆ１、ＨｅＢ２０１３およびＪＬ２０１２（配列番号９０）；ＧＸ２０１３（配列番

号９１）；ＺＣ４５（配列番号９２）；ＺＸＣ２１（配列番号９３）；ＢＭ４８－３１（配列番号９４）；およびＢｔＫＹ７２（配列番号９５）。灰色でマークされた直鎖配列（配列番号８６に示されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ２武漢株スパイクタンパク質のアミノ酸１１９２～１２０１に対応する）は、単離されたＲ３＿ＤＣ２３逃避バリアントにおいて変異した位置を含む。太字と下線のアミノ酸は、単離されたＲ３＿ＤＣ２３逃避バリアントにおいて変異したものである。配列はそれぞれのサルベコウイルスのクレード（右に示される）に従って群分けされている。

【図１８】ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３のＦｃ融合体は、細胞表面に発現したスパイクタンパク質と効率的に結合する。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現する細胞に対するＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）および対照抗体パリビズマブの結合のフローサイトメトリー解析。グラフは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（６１４Ｇ－ｄｅｌ１８）発現ベクター（スパイクＤ６１４Ｇ）と組み合わせたＧＦＰ発現ベクター（Ａ）または対照発現ベクター（空のベクター）と組み合わせたＧＦＰ発現ベクター（Ｂ）をトランスフェクトされたＧＦＰ発現細胞へのＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）またはパリビズマブの結合を検出するために使用されたＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（ＡＦ）６３３がコンジュゲートした抗ヒトＩｇＧの平均蛍光強度（ＭＦＩ）を示す。

【図１９－１】Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇスパイクタンパク質、またはオミクロンＢＡ．１およびＢＡ．２のスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスを強力に中和する。ＶｅｒｏＥ６細胞は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質６１４Ｇ、またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１、オミクロンＢＡ．２バリアントのスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスで形質導入され、このレポーターウイルスは、異なる濃度のＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）（Ｎ＝３）、パリビズマブ（Ｎ＝１）、ＣＢ６（Ｎ＝１）または一価のＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３（Ｎ＝１）と共にプレインキュベートされた。１５時間後、ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計を用いて測定された。（Ａ）グラフは、ＶＨＨ希釈系列（Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）に対してＮ＝３±ＳＤ）の平均ＧＦＰ蛍光強度を、いずれも各希釈系列に含まれる非感染対照細胞および処置されなかった感染細胞のＧＦＰ蛍光強度値に対してそれぞれ正規化されたものを示す。

【図１９－２】（Ｂ）各ＶＨＨ希釈系列について、線形回帰曲線フィッティング（可変勾配を伴うｌｏｇ（阻害剤）対正規化された応答）を使用してＩＣ５０が計算された。グラフは、試験された各抗体形式のＩＣ５０計算値（Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）に対してＮ＝３±ＳＤ）を示す。

【図２０】ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３のアミノ酸配列および本明細書で使用される様々なＣＤＲアノテーションの例示。ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３（配列番号８）の配列に対応する灰色の標識付きボックス内のＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴおよびＭａｃＣａｌｌｕｍによるＣＤＲアノテーション。

【図２１】Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃによる予防的処置は、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスを致死的ＳＣ２感染から保護する。Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、３＊１０^{2}ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇバリアントウイルスによる気管内感染の２０時間前に、１００μｇのＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃまたはアイソタイプ対照抗体（パリビズマブ）を腹腔内注射されるか、または未処置のまま放置された。動物は体重変化を測定し、人道的エンドポイントについてスコア化することによって、毎日モニターされた。（Ａ）グラフは、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ｎ＝３±ＳＥＭ）、パリビズマブ（ｎ＝２±ＳＥＭ）で処置したマウスまたは未処置マウス（ｎ＝６±ＳＥＭ）の平均相対的体重変化を示す。Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃで処置されたマウスは、パリビズマブで処置されたマウス（ｐ＜０．０５）または未処置マウス（ｐ＜０．０１）と比較して、体重減少が有意に少なかった（Ｓｉｄａｋの多重比較検定による混合効果解析）。（Ｂ）グラフは、示された群の動物生存部分のカプラン・マイヤー曲線を示す。安楽死は、マウスが０日目に定義された体重の２５％超を失った場合、または人道的エンドポイントが高スコアに達した場合に実施された。

【図２２】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１および－２　Ｓ２サブユニットに特異的なＶＨＨの同定

（Ａ）示された組換えスパイクタンパク質またはその断片に結合するために、抗ＨＩＳ ＩｇＧ（Ｃ）が直接コーティングされたか（ＤＣ）またはコーティングされた抗ＨＩＳ ＩｇＧを介して捕捉された（Ｃ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に関する３（Ｒ３）または４（Ｒ４）のバイオパニング後に単離されたＶＨＨクローンの大腸菌ペリプラズム抽出物（ＰＥ）のスクリーニング。ヒートマップは、各ＰＥ試料（１０倍希釈）について、対照抗原（ＢＳＡ）に関する対応するＰＥ試料のＥＬＩＳＡ ＯＤ ４５０シグナルに対する、示された抗原に関するＥＬＩＳＡ ＯＤ ４５０シグナルの比率を示す。ＲＢＤに結合するＶＨＨを発現する大腸菌細胞から調製されたペリプラズム抽出物は対照として使用された。ペリプラズム抽出物を調製するために使用された緩衝液（ＴＥＳ）は陰性対照として使用された。（Ｂ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクでシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子の中和について、抗ＨＩＳ ＩｇＧが直接コーティングされたか（ＤＣ）またはコーティングされた抗ＨＩＳ ＩｇＧを介して捕捉された（Ｃ）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に関する３（Ｒ３）または４（Ｒ４）のバイオパニング後に単離されたＶＨＨクローンの大腸菌ペリプラズム抽出物（ＰＥ）のスクリーニング。ヒートマップは、各ＰＥ試料（１００倍希釈）について、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子の中和レベルを各ＰＥ試料について示す。

【図２３】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ６１４Ｇ、ＢＡ．１、ＢＡ．２、ＢＡ．５、ＢＱ１．１およびＭＥＲＳのスパイクタンパク質を発現する細胞へのＳ２を標的とするＶＨＨの結合。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＲＢＤに結合するＶＨＨ７２－Ｓ５６ＡおよびＳ３０９が陽性対照として使用され、ＧＦＰに結合するＶＨＨ ＧＢＰが陰性対照として使用された。ＭＥＲＳスパイクの発現はＭＥＲＳ特異的ＶＨＨ５５の結合によって確認された（データは示さず）。グラフは、トランスフェクト（ＧＦＰ＋）細胞のＭＦＩと非トランスフェクト（ＧＦＰ－）細胞のＭＦＩの比率を示す。

【図２４】Ｓ２に結合するＶＨＨによる、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ６１４Ｇ、ＢＡ２、ＢＡ．５、ＸＢＢ、ＢＱ１．１およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子の中和。グラフは、少なくとも２つの独立した中和アッセイから計算された平均（線）および個々の（点）ＩＣ５０値を示す（Ｅ）。

【図２５】Ｓ２を標的とするＶＨＨは、複製コンピテントＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２シュードタイプウイルスを強力に中和する。Ｖｅｒｏ Ｅ６（Ａ）またはＶｅｒｏ Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２（Ｂ）細胞は、示されたＶＨＨの希釈系列と共にプレインキュベートされたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＶＳＶ－Ｓでシュードタイプ化された複製コンピテントＧＦＰレポーターウイルスで感染させた。ＶＨＨ７２－Ｓ５６Ａは陽性対照として含まれ、ＧＦＰ結合タンパク質（ＧＢＰ）は陰性対照として含まれた。各希釈の２回の技術的反復の平均ＧＦＰ強度が示され、エラーバーは標準偏差を表す。

【図２６－１】Ｓ２を標的とするＶＨＨはスパイクに媒介される膜融合を阻害する。（Ａ）Ｓ２を標的とするＶＨＨはスパイクタンパク質とＡＣＥ２との結合を妨害しない。グラフは、不活性化フューリン切断部位を含有するコーティングされた組換えスパイクタンパク質へのヒトＡＣＥ２－ｍｕＦｃの結合が、Ｒ３ＤＣ２３の希釈系列の存在下で試験されたＥＬＩＳＡのＯＤ ４５０シグナルを示す。ＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）が陰性対照として使用され、ＲＢＤの結合をめぐって両方ともＡＣＥ２と競合するＶＨＨ７２－Ｓ５６ＡおよびＣＢ６が陽性対照として使用された。（Ｂ）Ｓ２を標的とするＶＨＨはＳ１の脱落を誘導しない。パネルは、示されたＶＨＨ構築物と共に３０分間インキュベートしたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現するＲａｊｉ細胞（Ｒａｊｉスパイク）、または発現しないＲａｊｉ細胞（Ｒａｊｉ）の増殖培地（ＳＮ）および細胞溶解物（ＬＹＳ）の抗Ｓ１ウェスタンブロット解析を示す。ＣＢ６抗体およびＳ３０９抗体は、それぞれＳ１の脱落を惹起する、および惹起しないことが知られており、対照として使用された。ブロットの右側の下と上の三角形はそれぞれ、スパイクタンパク質のフューリンに媒介される切断後に生じたＳ１スパイクサブユニット、および細胞内の未切断スパイクタンパク質を示す。

【図２６－２】（Ｃ）Ｓ２を標的とするＶＨＨは、インタクトなフューリン切断部位を有

するスパイクタンパク質を発現する細胞へのヒトＡＣＥ２－ｍｕＦｃの結合を妨害しない。グラフは、Ｒ３ＤＣ２３の存在下でＧＦＰ－細胞のＭＦＩに対するＧＦＰ＋細胞のＭＦＩ（細胞に結合したＡＣＥ２－ｍｕＦｃの検出）の比率を示す。ＧＢＰは陰性対照として使用され、Ｓ１の脱落を誘導し、ヒトＡＣＥ２とＲＢＤへの結合をめぐって競合するＶＨＨ７２－Ｓ５６Ａは陽性対照として使用された。破線はスパイクタンパク質を発現していない細胞へのＡＣＥ２－ｍｕＦｃの結合を表す。点線は、抗体非存在下でのスパイク発現細胞へのＡＣＥ２－ｍｕＦｃの結合を表し、（Ｄ）Ｓ２を標的とするＶＨＨは、感染細胞によるシンシチアの形成を強力に妨げる。グラフは、武漢スパイクタンパク質でシュードタイプ化され、ＧＦＰ発現カセットを含有する複製ＶＳＶに感染して４時間後に、Ｒ３ＤＣ２３、ＧＢＰまたはＳ３０９の希釈系列で処置したＶｅｒｏ　Ｅ６細胞のウェルの平均±ＳＤ（Ｎ＝２）ＧＦＰ蛍光を示す。左の画像は、感染後４０時間における示された試料のＧＦＰ発現を示す。

【図２６－３】（Ｅ）生細胞の画像化中に、Ｒ３ＤＣ２３、ＧＢＰまたはＰＢＳ存在下でのスパイク発現細胞によるシンシチウム形成の定量化。グラフは、ＧＦＰとスパイク発現ベクターの同時トランスフェクション、またはＧＦＰ発現ベクターのみ（スパイクなし）のトランスフェクションの４時間後に、示されたＶＨＨで処置したウェルの平均±ＳＤ（Ｎ＝３）ＧＦＰ＋面積を示す。

【図２７－１】ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３はＨＲ２領域の膜近傍部位でスパイクタンパク質に結合する。（ＡおよびＢ）Ｒ３ＤＣ２３存在下で、Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２およびＶｅｒｏ　Ｅ６細胞上でのウイルス逃避バリアントＮ１１９２Ｄ、Ｌ１１９７Ｐ、Ｌ１２００Ｐ、Ｑ１２０１ＲおよびＱ１２０１Ｋの複製。グラフは、モック感染細胞およびＲ３ＤＣ２３非存在下での感染細胞のＧＦＰ蛍光で正規化したＧＦＰの平均±ＳＥＭ（Ｎ＝４）レベルを示す。

【図２７－２】ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３はＨＲ２領域の膜近傍部位でスパイクタンパク質に結合する。（ＡおよびＢ）Ｒ３ＤＣ２３存在下で、Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２およびＶｅｒｏ　Ｅ６細胞上でのウイルス逃避バリアントＮ１１９２Ｄ、Ｌ１１９７Ｐ、Ｌ１２００Ｐ、Ｑ１２０１ＲおよびＱ１２０１Ｋの複製。グラフは、モック感染細胞およびＲ３ＤＣ２３非存在下での感染細胞のＧＦＰ蛍光で正規化したＧＦＰの平均±ＳＥＭ（Ｎ＝４）レベルを示す。（Ｃ）武漢およびＮ１１９２Ｄ、Ｌ１１９７Ｐ、Ｌ１２００Ｐ、Ｑ１２０１ＲまたはＱ１２０１Ｋスパイクバリアントを発現する細胞へのＲ３ＤＣ２３の結合。グラフは、１０μｇ／ｍｌのＶＨＨ５５または１μｇ／ｍｌのＳ３０９を有する、示された濃度のＲ３ＤＣ２３で染色したトランスフェクト（ＧＦＰ＋）細胞のＭＦＩと非トランスフェクト（ＧＦＰ－）細胞のＭＦＩとの比率を示す。

【図２７－３】（Ｄ）感染させたＶｅｒｏ　Ｅ６細胞の生細胞画像化によって測定した、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２武漢（親型）または選択した逃避バリアントでシュードタイプ化された複製コンピテントＶＳＶのウイルス複製の動力学。グラフは、感染後の示された時点における感染細胞のウェルあたりの平均±ＳＥＭ（Ｎ＝５）ＧＦＰ＋面積を示す。（Ｅ）ＨＲ２コイルドコイル構造（ＰＤＢ：２ＦＸＰ）の表現であり、逃避バリアントで置換が観察された位置が示されている（Ｎ１１９２、Ｌ１１９７、Ｌ１２００およびＱ１２０１）。６ＸＶＶ＿１＿１＿１においてモデル化されたＮ１１９４でコンジュゲートされたグリカンは棒で示される。破線はウイルス膜を表す。左のパネルにおけるアルファヘリックスの中央の長いコイルドコイルは、（Ａ）における下線の配列に対応する。右のパネルは、Ｎ１１９２、Ｌ１１９７、Ｌ１２００およびＱ１２０１を有するＨＲ２コイルドコイルの上面図を表す。Ｎ１１９４グリコシル化部位が示され、６ＸＶＶ＿１＿１＿１においてモデル化されたＮ－グリカンの最初のＧｌｃＮａｃを棒で表す（参考文献は６ｖＳＢ＿１＿１＿２と同じ）。

【図２７－４】（Ｆ）示されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質バリアントを発現する細胞へのＲ３ＤＣ２３の結合。グラフは、１０μｇ／ｍｌのＧＢＰまたは１μｇ／ｍｌのＳ３０９を有する、示された濃度のＲ３ＤＣ２３で染色したトランスフェクト（ＧＦＰ＋）細胞のＭＦＩと非トランスフェクト（ＧＦＰ－）細胞のＭＦＩとの比率を示す。

（ＧおよびＨ）ＨＤＸ－ＭＳによる組換えスパイクタンパク質上のＲ３ＤＣ２３エピトープの同定。パネルは、２つのペプチドのＨＤＸ－ＭＳ取り込みプロットを示す：ペプチド（１１８７～１１９９）（左パネル）およびペプチド（１２００～１２０５）（右パネル）は、Ｒ３ＤＣ２３の結合時に重水素化から高度に保護される。ペプチド（１１８７～１１９９）の１１９４位の残基はグリコシル化されており、Ｇｕｔｔｍａｎ、ＳｃｉａｎおよびＬｅｅ（２０１１、ＡＣＳ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）が指摘したように、糖鎖は骨格と同様にアミド部位で重水素を取り込み保持できるため、グリコシル化ペプチドは骨格の交換可能な部位の数（１１部位）よりも多くの重水素を取り込んでいる。（Ｈ）Ｗｏｏｄｓプロットは、各示されたペプチド（ｘ軸の残基番号によって示される）について、ａｐｏスパイクとＲ３ＤＣ２３に結合したＳ－２Ｐスパイクの間で獲得された重水素数の差を、示された時点について示している。

【図２８－１】Ｒ３＿ＤＣ２３－ＨＲ２複合体のＸ線構造。（Ａ）左：全長プレフュージョンＳタンパク質（６ＶＳＢ＿１＿１＿２；Ｗｏｏら（２０２０　Ｊ．Ｐｈｙｓ．Ｃｈｅｍ　Ｂ　１２４：７１２８～７１３７頁））のモデルとＲ３＿ＤＣ２３－ＨＲ２複合体との重ね合わせであり、すべて分子表面を表し、Ｎ－グリカンは棒状に表して示されている。標識されたＳタンパク質領域は、細胞質ドメイン（ＣＰ）、膜貫通ドメイン（ＴＭ）、ヘプタッドリピート２（ＨＲ２）、Ｓ２ステムヘリックス（ＳＨ）、ヘプタッドリピート１（ＨＲ１）、セントラルヘリックスおよびコネクタードメイン（ＣＨ－ＣＤ）である。Ｎ末端ドメイン（ＮＴＤ）と受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）と包含するＳ１領域は、ポストフュージョン移行前にタンパク質分解によって除去される。右：タンパク質分解処理されたポストフュージョンＳタンパク質（７Ｅ９Ｔ；Ｔａｉら（２０２１　ＰＮＡＳ　１１８：ｅ２１１２７０３１１８））のモデル。

【図２８－２】（Ｂ）プレフュージョンＨＲ２コイルドコイルと重ね合わせたＲ３＿ＤＣ２３－ＨＲ２複合体の側面図と軸方向図（挿入図）。Ｎ１１９２－Ｙ１２０６にまたがるＨＲ２結合エピトープが棒で示されている。

【図２８－３】（Ｃ）隣接した結合エピトープを形成する単一のＶＨＨおよび２つのＨＲ２コピー（ｉおよびｉｉ）を包含するＢのボックス領域のクローズアップ。逃避変異体の位置を示す（Ｎ１１９２、Ｌ１１９７、Ｑ１２０１）。（Ｄ）ポストフュージョンＳタンパク質のＨＲ１－ＨＲ２領域の軸方向図とＲ３－ＤＣ２３－ＨＲ２複合体との重ね合わせ。

【図２８－４】（Ｅ）Ｒ３＿ＤＣ２３－ＨＲ２複合体におけるパラトープ－エピトープ接触の構造図。２つのＨＲ２ヘリックス（ｉおよびｉｉ）に結合した単一のＲ３＿ＤＣ２３コピーのクローズアップ図であり、パラトープとエピトープの主要な相互作用残基は棒で示されている。Ｈ結合および塩架橋の候補は破線で示されている。逃避変異体の位置が示されている（Ｎ１１９２、Ｌ１１９７、Ｌ１２００、Ｑ１２０１）。

【図２９】Ｒ３ＤＣ２３はＨＲ２コイルドコイル内の四級エピトープに結合する。左と右のパネルは、それぞれ三量体全長スパイク（Ｓ－２Ｐ）および単量体ＳＵＭＯ－ＨＲ３がハーフウェル９６ウェルＥＬＩＳＡプレートにコーティングされたＲ３ＤＣ２３の結合（ＯＤ　４５０ｎｍ）を、ｘ軸に示されているように異なる量で示す。陰性対照としてＧＦＰ結合ＶＨＨ（ＧＢＰ）を使用した。

【図３０－１】Ｒ３ＤＣ２３のＦｃ融合体は広範囲のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを強力に中和する。（Ａ）一価のＲ３ＤＣ２３、Ｒ３Ｃ４およびＲ４ＤＣ２０、ならびに半減期延長ＹＴＥ変異を含有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合した対応するヒト化対応物（ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ、ｈｕＲ３Ｃ４－ＦｃおよびｈｕＲ４ＤＣ２０－Ｆｃ）によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４ＧおよびＢＡ．５スパイクＶＳＶシュードタイプの中和。記号は、感染細胞によるＧＦＰ蛍光で測定した平均±ＳＤ（Ｎ＝３）の相対感染を表す。（Ｂ）ヒト化Ｒ３ＤＣ２３（ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ）と非ヒト化Ｒ３ＤＣ２３（Ｒ３ＤＣ２３－Ｆｃ）のＦｃ融合によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４ＧスパイクＶＳＶシュードタイプの中和。

【図３０－２】（Ｃ）グラフは、示されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントのスパイクタ

ンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶを使用する少なくとも２回の独立した中和アッセイから計算されたＩＣ５０値の中央値（線）および個々のＩＣ５０値（菱形）を示す。（Ｄ）Ｓ２結合ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃおよび／またはＲ３ＤＣ２３　ＶＨＨによる真正ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４ＧおよびＢＡ．１ウイルスの中和。グラフは、各ＶＨＨ希釈液についてカウントされたプラーク数の平均±ＳＥＭ（Ｒ３ＤＣ２３およびｈｕＲ３ＤＣ２３－ＦｃではＮ＝４およびＳ３０９ではＮ＝２）を示す。（Ｅ）臨床的に有効なＶＨＨ－Ｆｃ　ＸＶＲ０１１のものと比較したＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ、ｈｕＲ３Ｃ４－ＦｃおよびｈｕＲ４ＤＣ２０－Ｆｃの分析的疎水性相互作用クロマトグラフィー。見かけの疎水性はＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０　ＨＰＬＣで（ＮＨ４）２ＳＯ４溶出勾配に対して評価され、短い保持時間は見かけの疎水性が低いことを示す。パネルは各示されたＶＨＨ－Ｆｃ構築物の二重曲線を示す。

【図３１－１】ヒト化Ｒ３ＤＣ２３　Ｆｃ融合体のＬＳ変異体は、広範なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを強力に中和し、ハムスターにおいてウイルス複製を制御する。（Ａ）ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ重複のＬＳバリアントとＹＴＥバリアントの分析的疎水性相互作用クロマトグラフィー。見かけの疎水性はＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０　ＨＰＬＣで（NH_4）$_2SO_4$溶出勾配に対して評価され、短い保持時間は見かけの疎水性が低いことを示す。各ＶＨＨ－Ｆｃについて重複した曲線を示す。（Ｂ）ｈｕＲ３ＤＣ２３－ＦｃのＬＳとＹＴＥの両バリアントは、分析ＳＥＣから単一の（重なり合った）ピークとして溶出する。ゲルろ過標準物質（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）のモル量マーカーは灰色で示されている。曲線および網掛けは、三連の実行の平均およびＳＤを示す。

【図３１－２】（Ｃ）ＳＰＲで決定したｐＨ　６．０におけるｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳのＦｃＲｎ結合。センサーチップにｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳを低密度で固定化した後、２５０～０．９７ｎＭのヒトＦｃＲｎの２倍希釈系列を溶液中に注入した（灰色の曲線）。１：１結合モデルがフィットした（黒色の曲線）。表９にサポートデータを示す。（Ｄ～Ｅ）シリアンゴールデンハムスターにおけるｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳによるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２武漢感染の処置。雄のシリアンゴールデンハムスターに０日目にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（武漢株）を経鼻感染させ、感染４時間後に１０または２ｍｇ／ｋｇのｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳ、１０ｍｇ／ｋｇのベブテロビマブ（陽性対照）または１０ｍｇ／ｋｇのパリビズマブ（陰性対照）のいずれかの腹腔内処置を受けさせた。動物は４日目に安楽死させ、感染性ウイルス（Ｄ）とウイルスＲＮＡ（Ｅ）を４日目に肺組織で測定した。横棒はＴＣＩＤ５０／グラム（左パネル）およびＲＮＡコピー数／グラム（右パネル）肺組織の中央値を示す。点線の横線はＬＬＯＤを示す。＊高用量（１０ｍｇ／ｋｇ）群の２匹の動物は、Ｒ３ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ＿ＬＳ処置に曝露されていないことが実験的に確認された。データは一元配置ＡＮＯＶＡおよびダンの多重比較検定で解析した（＊＊＊Ｐ＜０．０００１）。（＃）血清中にｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳが検出されなかったか、または非常に低レベルであったハムスターに対応するデータポイントは統計解析から除外した。

【図３１－３】（Ｄ～Ｅ）シリアンゴールデンハムスターにおけるｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳによるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２武漢感染の処置。雄のシリアンゴールデンハムスターに０日目にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（武漢株）を経鼻感染させ、感染４時間後に１０または２ｍｇ／ｋｇのｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳ、１０ｍｇ／ｋｇのベブテロビマブ（陽性対照）または１０ｍｇ／ｋｇのパリビズマブ（陰性対照）のいずれかの腹腔内処置を受けさせた。動物は４日目に安楽死させ、感染性ウイルス（Ｄ）とウイルスＲＮＡ（Ｅ）を４日目に肺組織で測定した。横棒はＴＣＩＤ５０／グラム（左パネル）およびＲＮＡコピー数／グラム（右パネル）肺組織の中央値を示す。点線の横線はＬＬＯＤを示す。＊高用量（１０ｍｇ／ｋｇ）群の２匹の動物は、Ｒ３ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ＿ＬＳ処置に曝露されていないことが実験的に確認された。データは一元配置ＡＮＯＶＡおよびダンの多重比較検定で解析した（＊＊＊Ｐ＜０．０００１）。（＃）血清中にｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳが検出されなかったか、または非常に低レベルであったハムスターに対応するデータポイントは統計解析から除外した。

【図３２－１】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に対するＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＬＳ）の結合の特異性。２．５μｇ／ｍＬのＲ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）は、ヒト形質膜タンパク質セルアレイにおいて、６１０１個の全長ヒト形質膜タンパク質および細胞表面に係留された分泌タンパク質に加え、トランスフェクトＨＥＫ２９３細胞上で発現された３９６個のヒトヘテロダイマーに対する結合について評価された。ライブラリースクリーニングの初期ヒットの固定細胞確認スクリーンが示されている。（Ａ）２．５μｇ／ｍＬでのＲ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）の結合。（Ｂ）１μｇ／ｍＬでのリツキシマブの結合。（Ｃ）ＩｇＧ１アイソタイプ対照の結合。（Ｄ）二次抗体（一次抗体の代わりにＰＢＳ）の結合。Ｒｅｐ：複製。

【図３２－２】ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に対するＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＬＳ）の結合の特異性。２．５μｇ／ｍＬのＲ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）は、ヒト形質膜タンパク質セルアレイにおいて、６１０１個の全長ヒト形質膜タンパク質および細胞表面に係留された分泌タンパク質に加え、トランスフェクトＨＥＫ２９３細胞上で発現された３９６個のヒトヘテロダイマーに対する結合について評価された。ライブラリースクリーニングの初期ヒットの固定細胞確認スクリーンが示されている。（Ａ）２．５μｇ／ｍＬでのＲ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）の結合。（Ｂ）１μｇ／ｍＬでのリツキシマブの結合。（Ｃ）ＩｇＧ１アイソタイプ対照の結合。（Ｄ）二次抗体（一次抗体の代わりにＰＢＳ）の結合。Ｒｅｐ：複製。

【図３３】Ｓ１およびＳ２を標的とするＶＨＨを含む多特異的構築物。（Ａ、Ｂ、Ｃ）Ｓ２を標的とするＶＨＨ（Ｃ２３）（ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３のヒト化形態）およびＳ１を標的とするＶＨＨ（１１７）（ＶＨＨ３．１１７のヒト化形態）は、１０ＧＳリンカーを介してＦｃドメイン（ヒトＦｃ（ＬＳ））に融合した１０（Ａ）、２０（Ｂ）または３０（Ｃ）のＧＳリンカーが介在した、二特異性タンデムＶＨＨｘ－ＶＨＨｙ－Ｆｃ構築物の模式図。（Ｄ）１０ＧＳリンカーを介してＦｃドメイン（ヒトＦｃ（ＬＳ））のＮ末端に融合したＳ２を標的とするＶＨＨ（Ｃ２３）（ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３のヒト化形態）、および１５ＧＳリンカーを介してＣ末端に融合したＳ１を標的とするＶＨＨ（１１７）（ＶＨＨ３．１１７のヒト化形態）を有するＶＨＨｘ－Ｆｃ－ＶＨＨｙ構築物の模式図。（Ｅ）１０ＧＳリンカーを介してＦｃドメイン（ヒトＦｃ（ＬＳ））に融合した、２０ＧＳリンカーが介在したＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合するＳ１を標的とするＶＨＨ（８３）（ＶＨＨ３．８３のヒト化バージョン）およびＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合するＳ１を標的とするＶＨＨ（１１７）（ＶＨＨ３．１１７のヒト化形態）を有するタンデムＶＨＨｘ－ＶＨＨｙ－Ｆｃ構築物の模式図。（Ｆ）１０ＧＳリンカーを介してＦｃドメイン（ヒトＦｃ（ＬＳ））に融合した、２０ＧＳリンカーが介在したＳ２を標的とするＶＨＨ（Ｃ２３）（ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３のヒト化形態）、ＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合するＳ１を標的とするＶＨＨ（１１７）（ＶＨＨ３．１１７のヒト化形態）およびＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合するＳ１を標的とするＶＨＨ（８３）（ＶＨＨ３．８３のヒト化バージョン）を有する三重特異性タンデムＶＨＨｘ－ＶＨＨｙ－ＶＨＨｚ－Ｆｃ構築物の模式図。

【図３４】Ｓ１およびＳ２を標的とするＶＨＨを含む組成物。Ｓ１およびＳ２を標的とする結合剤を含む組成物（ＸＶＲ０１２）の概略図。この組成物は、Ｓ２を標的とするＶＨＨ－Ｆｃ構築物（ＸＶＲ０１３）（ヒトＦｃドメインに融合したＲ３＿ＤＣ２３のヒト化形態）、およびＳ１を標的とするＶＨＨｘ－Ｆｃ－ＶＨＨｙ構築物（ＸＶＲ０１４）を含み、この構築物は、ヒトＦｃドメインに融合したＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能なＶＨＨ（１１７）（ＶＨＨ３．１１７のヒト化形態）およびＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能なＶＨＨ（８３）（ＶＨＨ３．８３のヒト化形態）を含む。

【図３５】シリアンゴールデンハムスターＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷モデルにおけるＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４のｉｎ　ｖｉｖｏ有効性。シリアンゴールデンハムスターにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（武漢株）を経鼻感染させた。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２

負荷の４時間後に、分子としてのＸＶＲ０１２（４および２０ｍｇ／ｋｇ）、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４（２および１０ｍｇ／ｋｇ）、パリビズマブ（１０ｍｇ／ｋｇ、陰性対照）およびベブテロビマブ（１０ｍｇ／ｋｇ、陽性対照）が腹腔内注射によって投与された。肺におけるウイルス複製（Ａ）および肺組織におけるウイルスＲＮＡ負荷（Ｂ）がグラフに示されている。各群について、中央値が９５％信頼区間と共に報告されている。点線の横線は検出下限（ＬＬＯＤ）を示す。

【図３６】ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４に媒介されるＡＤＣＣ応答。ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４の抗体依存性細胞細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を評価するために、ＦｃγＲＩＩＩａレポーターアッセイが実施された。ＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２スパイクタンパク質標的細胞株を発現するＣＨＯ－Ｋ１が標的細胞として、Ｊｕｒｋａｔ　ＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６）Ｖ１７６－ＮＦＡＴ－ＲＥ　Ｌｕｃがレポーター細胞として使用された。３回の独立したアッセイが実施された。アッセイではエフェクターと標的細胞との比率を４０：１とし、試料はＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４では３０μｇ／ｍＬから、ＸＶＲ０１２では６０μｇ／ｍＬから開始する８点希釈系列で、３つの独立した複製として評価した（１回につき３つのアッセイプレート）。アイソタイプ対照は３０μｇ／ｍｌの単一濃度で評価された。アッセイプレートは、ＳｔｅａｄｙＧｌｏ（発光終点）を添加する前に一晩（２１時間±１時間）インキュベートされた。生の発光値は、試験試料対照ウェル（応答）および陰性対照ウェル（試験試料の非存在下で標的細胞株を含むウェル）の平均値として表される。平均値（Ｎ＝３±ＳＤ）は、ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４について報告される。

【図３７】シリアンゴールデンハムスターＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷モデルにおけるＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４のｉｎ　ｖｉｖｏ予防有効性。シリアゴールデンハムスターに、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２負荷のおよそ２４時間前に、１０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４と１ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３とのカクテル（ＸＶＲ０１２）、１ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３または１０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４が腹腔内注射により投与された。肺におけるウイルス負荷がグラフに示されている。各群では、６匹の動物が含まれ、中央値が９５％信頼区間と共に示されている。グラフ中の点線の横線は検出下限（ＬＬＯＤ）を示す。

【図３８】シリアンゴールデンハムスターＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷モデルにおけるＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４のｉｎ　ｖｉｖｏ治療有効性。シリアンゴールデンハムスターにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（武漢株）を感染させた。５ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４と０．５ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３、１０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４と１ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３、もしくは２０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４と２ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３（ＸＶＲ０１２）とのカクテル；０．５、１もしくは２ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３；または５、１０もしくは２０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷の４時間後に腹腔内注射により投与された。対照動物は、１０ｍｇ／ｋｇのパリビズマブ（陰性対照）を受け、１群の動物は、１０ｍｇ／ｋｇのベブテロビマブ（陽性対照として使用された）を受けた。肺におけるウイルス負荷がグラフに示されている。各群では、６匹の動物が含まれ、中央値が９５％信頼区間と共に示されている。グラフ中の点線の横線は検出下限（ＬＬＯＤ）を示す。

【図３９－１】Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃによる予防的処置は、致死性のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に対してＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスを保護する。３×10^2ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇバリアントウイルスによる気管内感染の２０時間前に、１００μｇのＲ３＿ＤＣ２３－ＦｃがＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスに投与され、１００μｇのアイソタイプ対照抗体（パリビズマブ）が第２群のＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスおよび非許容的野生型（ＷＴ）マウスに投与された。動物は体重変化を測定し、人道的エンドポイントについてスコア化することによって、毎日モニターされた。（Ａ）グラフは、示された群の動物生存部分のカプラン・マイヤー曲線を示す。安楽死は、マウスが０日目に定義された体重の２５％超を失った場合、または２５の人道的エンドポイントについて高スコアに達した場合に実施された。Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃで処置されたＫ１８－ｈＡＣＥ２マウス（ｎ＝５

）は、パリビズマブで処置されたＫ１８－ｈＡＣＥ２マウス（ｎ＝５）と比較して、致死から有意に保護された（ｐ＝０．００１６、ログランク、マンテルコックス検定）。
【図３９－２】（Ｂ）グラフは、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ｎ＝５±ＳＥＭ）もしくはパリビズマブ（ｎ＝５±ＳＥＭ）で処置されたＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスおよびパリビズマブで処置されたＷＴマウス（ｎ＝５±ＳＥＭ）の平均相対的体重を示す。４日目以降、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃで処置されたマウスは、パリビズマブで処置されたマウスと比較して体重減少が有意に少なかった（ｐ＜０．００１）（２元配置ＡＮＯＶＡ、チューキーの多重比較検定）。
【図４０－１】Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃによる予防的処置は、感染Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスの肺におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のウイルス複製を減少させる。３×１０^{2}ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇバリアントウイルスによる気管内感染の２０時間前に、１００μｇのＲ３＿ＤＣ２３－ＦｃがＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスに投与され、１００ｕｇのアイソタイプ対照抗体（パリビズマブ）が第２群のＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスおよび非許容的野生型（ＷＴ）マウスに投与された。動物は体重変化を測定し、人道的エンドポイントについてスコア化することによって、毎日モニターされた。（Ａ）グラフは、パリビズマブで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウス（ｎ＝４）およびパリビズマブで処置したＷＴマウス（ｎ＝５）と比較した、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃで処置したＫ１８マウス（ｎ＝５）の動物生存部分のカプラン・マイヤー曲線を示す。
【図４０－２】（Ｂ）グラフは、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ｎ＝５±ＳＥＭ）もしくはパリビズマブ（ｎ＝４±ＳＥＭ）で処置されたＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスおよびパリビズマブで処置されたＷＴマウス（ｎ＝５±ＳＥＭ）の平均相対的体重を示す。５日目以降、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃで処置されたＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスは、パリビズマブで処置されたＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスと比較して体重減少が有意に少なかった（ｐ＜０．０１）（２元配置ＡＮＯＶＡ、チューキーの多重比較検定）。（Ｃ）グラフは、感染の５日後に犠牲となった示された群のマウスの肺におけるウイルス力価の中央値および個体値を示す。Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスおよびパリビズマブで処置したＷＴマウスは、パリビズマブで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスと比較して、肺におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスの複製が有意に少なかった（ｐ＜０．０００５、クラスカル・ウォリス検定、ダンの多重比較検定）。
【図４０－３】（Ｄ）グラフは、感染の５日後に　　殺された示された群のマウスの肺におけるウイルスＲＮＡの中央値および個々のレベルを示す。Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスおよびパリビズマブで処置したＷＴマウスは、パリビズマブで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスと比較して、肺におけるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスの複製が有意に少なかった（ｐ＜０．００５、クラスカル・ウォリス検定、ダンの多重比較検定）。
【図４１】ＢＬＩによるＳ－２Ｐ：Ｒ３＿ＤＣ２３相互作用。Ｓ－２Ｐ三量体をバイオレイヤー干渉法のバイオセンサーに固定化し、溶液中で２０ｎＭのＲ３＿ＤＣ２３モノマーと会合させた。三連の実験の生データ（参照減算なし）。
【発明を実施するための形態】
【００１８】
本明細書で使用される場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、「その（ｔｈｅ）」は、文脈上明らかにそうでない場合を除き、単数形と複数形の両方の参照を含む。
【００１９】
「含むこと（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、および「から構成される（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ　ｏｆ）」という用語は、本明細書で使用される場合、「含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、または「含有すること（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎ）」と同義であり、包含的またはオープンエンドであり、追加の記載されていないメンバー、要素または方法ステップを除外しない。この用語は、特許用語において十分に確立された意味を享受する「

からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」および「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」も包含する。

【００２０】

端点による数値範囲の記載は、記載された端点だけでなく、それぞれの範囲に含まれるすべての数値と分数を含む。

【００２１】

「約（ａｂｏｕｔ）」または「およそ（ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｅｌｙ）」という用語は、パラメータ、量、時間的持続時間などの測定可能な値に言及する際に本明細書で使用される場合、開示された本発明において実施するのに適切である限りにおいて、指定された値の±１０％以下、好ましくは±５％以下、より好ましくは±１％以下、さらにより好ましくは±０．１％以下の変動などの、指定された値の変動および指定された値からの変動を包含することを意味する。修飾語「約」が指す値自体も、具体的に、好ましくは開示されていることを理解されたい。

【００２２】

「１つまたは複数の」または「少なくとも１つの」という用語は、１つもしくは複数のメンバーまたはメンバーの群のうちの少なくとも１つのメンバーなど、それ自体明確であるのに対し、さらなる例示によって、この用語は、とりわけ、前記メンバーのうちのいずれか１つ、または前記メンバーのうちの任意の２つ以上、例えば、前記メンバーのうちの任意の３つ以上、４つ以上、５つ以上、６つ以上または７つ以上など、および最大すべての前記メンバーへの言及を包含する。別の例では、「１つまたは複数の」または「少なくとも１つの」は、１、２、３、４、５、６、７またはそれより多くを指す場合がある。

【００２３】

本明細書における発明の背景に関する考察は、発明の文脈を説明するために含まれる。これは、言及された資料のいずれかが、特許請求の範囲のいずれかの優先日時点で、いずれかの国において公開されていた、公知であった、または共通の一般知識の一部であったことの自認として受け取られるべきではない。

【００２４】

本開示全体を通じて、様々な刊行物、特許および公開された特許明細書は、識別可能な引用によって参照される。本明細書において引用されるすべての文書は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。特に、本明細書において特に言及されるこのような文書の教示またはセクションは、参照により組み込まれる。

【００２５】

別段に定義されない限り、技術用語および科学用語を含む、本発明を開示する際に使用されるすべての用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。さらなる指針として、本発明の教示をよりよく理解するために用語の定義が含まれる。特定の用語が本発明の特定の態様または本発明の特定の実施形態に関連して定義される場合、このような意味合いは、特に定義されない限り、本明細書全体にわたって、すなわち本発明の他の態様または実施形態の文脈においても適用されることを意味する。

【００２６】

以下の文章では、本発明の異なる態様または実施形態がより詳細に定義される。このように定義された各態様または実施形態は、反対のことが明確に示されない限り、他の態様または実施形態と組み合わされてもよい。特に、好ましいかまたは有利であることが示された任意の要件は、好ましいかまたは有利であると示された他の要件（複数可）と組み合わされてもよい。

【００２７】

本明細書全体を通して「一実施形態」、「ある実施形態」への言及は、実施形態に関連して記載される特定の要件、構造、または特徴が、本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。よって、本明細書全体を通して様々な箇所で「一実施形態では」または「ある実施形態では」という表現が出現するが、必ずしもすべてが同じ実施形態

を指す訳ではないが、その可能性はある。さらに、特定の要件、構造または特徴は、１つまたは複数の実施形態において、本開示から当業者にとって明らかであるように、任意の好適な方法で組み合わされ得る。さらに、本明細書に記載のいくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれるいくつかの要件を含むが、他の要件は含まず、異なる実施形態の要件の組合せは、本発明の範囲内にあることを意味し、当業者に理解されるように、異なる実施形態を形成する。例えば、添付の特許請求の範囲において、特許請求された実施形態のいずれかは任意の組合せで使用され得る。

【００２８】

本発明のある特定の代表的な実施形態を例示する実験セクションによって裏付けられるように、本発明者らは、サルベコウイルススパイクタンパク質、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質のＳ２サブユニットなどのサルベコウイルススパイクタンパク質Ｓ２サブユニットに特異的に結合するＶＨＨを同定した。ＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４Ｇバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　アルファバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．５バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２．７５．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．４．６バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＦ．７バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＱ．１．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢ．１．５バリアントなどのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１を強力に中和することが見出された。これらのＶＨＨは、ヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメインのＳ２アミノ酸、より詳細には、ウイルス膜に近位のＨＲ２ドメインのＣ末端領域内のアミノ酸と相互作用し、これらのアミノ酸は複数のクレードのサルベコウイルスのスパイクタンパク質内に非常に高度に保存されていることが判明した。

【００２９】

したがって、一態様は、サルベコウイルスを中和することが可能な結合剤、特に抗体およびその抗原結合断片であって、サルベコウイルスのスパイクタンパク質のヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメインに特異的に結合することを特徴とする結合剤、特に抗体および抗体断片に関する。

【００３０】

ある態様は、サルベコウイルスを中和することが可能な結合剤であって、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｙ１２０６までの領域に対応するサルベコウイルスのスパイクタンパク質の領域または領域内に特異的に結合することを特徴とする結合剤を提供する。

【００３１】

「結合剤」とは、一般に、少なくとも１つの他の分子に結合することが可能な分子に関し、前記結合は、好ましくは、定義された結合部位、ポケットまたはエピトープ上などでの特異的結合である。結合剤は、あらゆる性質またはタイプのものであってもよく、その起源に依存しない。結合剤は、化学的に合成されても、天然に存在しても、組換産生されても（および任意に精製されても）よいだけではなく、設計されても、合成によって生成されても（および任意に精製されても）よい。したがって、前記結合剤は、例えば、低分子、化学物質、ペプチド、ポリペプチド、抗体、またはそれらの誘導体、とりわけ、ペプチド模倣体、抗体模倣体、活性断片、化学誘導体などであってもよい。結合剤の機能的断片または結合剤の機能的部分は、その結合剤と機能的に同等である結合剤の断片または部分を指す。特に、本明細書に記載されている結合剤の機能的断片または部分は、理想的には、本明細書の他の箇所で広範に概説されているその結合剤の機能的要件（１）～（２１）のうちの１つまたは複数を保持する。

【００３２】

「抗体」という用語は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン（Ｉｇ）分子または免

疫グロブリン（Ｉｇ）ドメインを含む分子、およびその多量体を指す。「抗体」は、インタクトな免疫グロブリンまたはインタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分であり得る。この用語は、天然に、組換えにより、半合成的にまたは合成的に産生された抗体を包含する。したがって、例えば、抗体は、自然界に存在しても、または自然界から単離されてもよく、例えば、細胞もしくは組織によって天然にもしくは内因性に産生もしくは発現されても、任意にそこから単離されてもよく；または抗体は、組換え体であってもよく、すなわち、組換えＤＮＡ技術によって産生されてもよく、および／もしくは部分的もしくは全体的に、化学的もしくは生化学的に合成されてもよい。

【００３３】

「単離された」または「精製された」とは、本来の状態で通常付随する成分を実質的または本質的に含まない物質を意味する。例えば、「単離されたポリペプチド」または「精製されたポリペプチド」は、単離されるべきまたは精製されるべき目的のポリペプチドを含む分子の混合物から、任意の好適な手段によって単離または精製されたポリペプチドを指す。単離または精製された目的のポリペプチドは、例えば、免疫グロブリン、抗体またはナノボディであってもよく、混合物は、免疫グロブリン、抗体もしくはナノボディを産生する細胞、および／または免疫グロブリン、抗体もしくはナノボディが分泌される培養培地（細胞によって分泌される他の分子と共に存在する可能性が高い）に存在するような混合物または分子であり得る。

【００３４】

「抗体断片」、「抗原結合断片」、「機能的抗体断片」および「活性抗体断片」という用語は、それ自体が抗原決定基、またはエピトープに対して高い親和性を有し、このような特異性を説明する１つまたは複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含有する、任意の抗体の一部を指す。「抗体断片」および「抗原結合断片」および「活性抗体断片」および「機能的抗体断片」という用語は、本明細書で使用される場合、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質などのサルベコウイルススパイクタンパク質、特にサルベコウイルススパイクタンパク質のＳ２サブユニット、より詳細にはサルベコウイルススパイクタンパク質（のＳ２サブユニット）のＨＲ２ドメインに特異的に結合することが可能な免疫グロブリンドメインまたは抗原結合ドメインを含むタンパク質またはペプチドを指す。非限定的な例としては、免疫グロブリンドメイン、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ）’２、ｓｃＦｖ、重－軽鎖二量体、免疫グロブリン単一可変ドメイン、ナノボディ（またはＶＨＨ抗体）、ドメイン抗体、および完全軽鎖または完全重鎖などの単鎖構造が挙げられる。

【００３５】

「免疫グロブリン（Ｉｇ）ドメイン」、またはより詳細には「免疫グロブリン可変ドメイン」（「ＩＶＤ」と略称され、本明細書において「可変ドメイン」とも称される）という用語は、当技術分野および本明細書の以下において、それぞれ「フレームワーク領域１」または「ＦＲ１」；「フレームワーク領域２」または「ＦＲ２」；「フレームワーク領域３」または「ＦＲ３」；および「フレームワーク領域４」または「ＦＲ４」と称される４つの「フレームワーク領域」から本質的になる免疫グロブリンドメインを意味し、これらのフレームワーク領域は、当該技術分野および本明細書の以下において、それぞれ「相補性決定領域１」または「ＣＤＲ１」；「相補性決定領域２」または「ＣＤＲ２」；および「相補性決定領域３」または「ＣＤＲ３」と称される３つの「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」によって分断されている。よって、免疫グロブリン可変ドメインの一般的な構造または配列は、以下のように示すことができる：ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４。これは、免疫グロブリン可変ドメイン（ＩＶＤ）、特にその中のＣＤＲ、さらにより詳細にはその中のＣＤＲ３であり、抗原結合部位またはエピトープ結合部位を有することによって、抗原に対する特異性を抗体に付与する。典型的には、従来の免疫グロブリンでは、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は相互作用して抗原結合部位を形成する。この場合、ＶＨとＶＬの両方の相補性決定領域（ＣＤＲ）が抗原結合部位に（必ずしも均等にではないが）寄与する、すなわち、合計６個のＣＤＲが抗原結合部位の形成に関与することになる。上記の定義を考慮すると、従

来の４鎖抗体（当技術分野において公知である、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤまたはＩｇＥ分子など）、このような従来の４鎖抗体に由来するＦａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ジスルフィド連結したＦｖまたはｓｃＦｖ断片などのＦｖ断片、またはダイアボディ（すべて当技術分野において公知である）の抗原結合ドメインは、軽鎖および重鎖可変ドメインなどの（関連する）免疫グロブリンドメインの対によって、すなわち、それぞれの抗原のエピトープに共同で結合する免疫グロブリンドメインのＶＨ－ＶＬ対によって、抗原のそれぞれのエピトープに結合する。

【００３６】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」（「ＩＳＶＤ」と略される）は、「単一可変ドメイン」という用語と同等であり、抗原結合部位が単一の免疫グロブリンドメイン上に存在し、それによって形成される分子を定義する。このことは、２つの免疫グロブリンドメイン、特に２つの可変ドメインが相互作用して抗原結合部位を形成する「従来の」免疫グロブリンまたはその断片とは異なる免疫グロブリン単一可変ドメインを設定する。「免疫グロブリン単一可変ドメイン」（または「ＩＳＶＤ」）は、本明細書で使用される場合、ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４の形式に従った４つのフレームワーク領域（ＦＲ）および３つの相補的決定領域（ＣＤＲ）を含むアミノ酸配列を有するタンパク質またはペプチドを指す。免疫グロブリン単一可変ドメインの抗原結合部位は、単一のＶＨ／ＶＨＨまたはＶＬドメインによって形成される。したがって、免疫グロブリン単一可変ドメインの抗原結合部位は、３つ以下のＣＤＲによって形成される。このように、単一可変ドメインが単一抗原結合ユニット（すなわち、単一抗原結合ドメインが、機能的抗原結合ユニットを形成するために別の可変ドメインと相互作用する必要がないように、単一可変ドメインから本質的になる機能的抗原結合ユニット）を形成することが可能である限り、単一可変ドメインは、軽鎖可変ドメイン配列（例えば、ＶＬ－配列）もしくはその好適な断片；または重鎖可変ドメイン配列（例えば、ＶＨ－配列またはＶＨＨ配列）もしくはその好適な断片であってもよい。ある特定の実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、重鎖可変ドメイン配列（例えば、ＶＨ－配列またはＶＨＨ－配列）であり；より詳細には、免疫グロブリン単一可変ドメインは、従来の４鎖抗体由来の重鎖可変ドメイン配列または重鎖抗体由来の重鎖可変ドメイン配列であり得る。例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインは、（単一）ドメイン抗体（または（単一）ドメイン抗体としての使用に好適なアミノ酸配列）、従来の抗体（「ｄＡｂ」とも呼ばれる）の重（ＶＨ）鎖または軽（ＶＬ）鎖の可変ドメイン（またはｄＡｂとしての使用に好適なアミノ酸配列）、またはナノボディ（本明細書で定義され、ＶＨＨを含むがこれらに限定されない）；またはそれらのいずれか１つの好適な断片であり得る。

【００３７】

実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、Ｎａｎｏｂｏｄｙ（本明細書において定義される）またはその好適な断片であってもよい。注：Ｎａｎｏｂｏｄｙ（登録商標）、Ｎａｎｏｂｏｄｉｅｓ（登録商標）およびＮａｎｏｃｌｏｎｅ（登録商標）は、Ａｂｌｙｎｘ Ｎ．Ｖ．（ａ Ｓａｎｏｆｉ Ｃｏｍｐａｎｙ）の登録商標である。Ｎａｎｏｂｏｄｉｅｓの一般的な説明については、以下のさらなる説明、および国際公開第２００８／０２００７９号などに記載されているような本明細書で引用される先行技術を参照されたい。「ＶＨＨドメイン」は、ＶＨＨ、ＶＨＨドメイン、ＶＨＨ抗体断片、およびＶＨＨ抗体としても知られており、元来、「重鎖抗体」（すなわち、「軽鎖を欠く抗体」の；Ｈａｍｅｒｓ－Ｃａｓｔｅｒｍａｎら、１９９３、Ｎａｔｕｒｅ ３６３：４４６～４４８頁）の抗原結合免疫グロブリン（Ｉｇ）（可変）ドメインとして記載されている。「ＶＨＨドメイン」という用語は、これらの可変ドメインを、従来の４鎖抗体中に存在する重鎖可変ドメイン（本明細書では「ＶＨドメイン」と称される）、および従来の４鎖抗体中に存在する軽鎖可変ドメイン（本明細書では「ＶＬドメイン」と称される）と区別するために選択された。ＶＨＨおよびＮａｎｏｂｏｄｙのさらなる詳細については、Ｍｕｙｌｄｅｒｍａｎｓによる総説（２００１．Ｒｅｖ Ｍｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ７４：２７７～３０２頁）、および一般的な背景技術として言及した以下の特許出願を参照され

たい：国際公開第９４／０４６７８号、同第９５／０４０７９号、同第９６／３４１０３号、同第９４／２５５９１号、同第９９／３７６８１号、同第００／４０９６８号、同第００／４３５０７号、同第００／６５０５７号、同第０１／４０３１０号、同第０１／４４３０１、欧州特許第１１３４２３１号、国際公開第０２／４８１９３号、同第９７／４９８０５号、同第０１／２１８１７号、同第０３／０３５６９４号、同第０３／０５４０１６号、同第０３／０５５５２７、同第０３／０５０５３１号、同第０１／９０１９０号、同第０３／０２５０２０号（＝欧州特許第１４３３７９３号）、同第０４／０４１８６７号、同第０４／０４１８６２号、同第０４／０４１８６５号、同第０４／０４１８６３号、同第０４／０６２５５１号、同第０５／０４４８５８号、同第０６／４０１５３号、同第０６／０７９３７２号、同第０６／１２２７８６号、同第０６／１２２７８７号および同第０６／１２２８２５号。これらの文献に記載されているように、Ｎａｎｏｂｏｄｙ（特に、ＶＨＨ配列および部分的にヒト化されたＮａｎｏｂｏｄｙ）は、特に、フレームワーク配列の１つまたは複数における１つまたは複数の「ホールマーク残基」の存在によって特徴付けることができる。

【００３８】

本発明による結合剤またはサルベコウイルス結合剤（互換的に使用され得る）は、一態様では、任意の個々の機能／実施形態によって、または以下に記載される任意の数の個々の機能／実施形態の任意の組合せによって機能的に記載され得、括弧内「（ｎ）」に任意の数「ｎ」が与えられる。これらの個々の機能の数値順序はランダムであり、個々の機能に何ら優先順位を課すものではなく、同様に、このランダムな数値順序は、個々の機能の２つ以上の任意の組合せに何ら優先順位を課すものではない。本明細書における結合剤またはサルベコウイルス結合剤は、これらの個々の機能のそれぞれを発揮するので、このような組合せはさらに任意であると考えられるべきではない。

【００３９】

よって、本発明は、（１）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１などのサルベコウイルスに特異的に結合し、本明細書においてサルベコウイルス結合剤またはサルベコウイルス抗体および抗体断片とも称され得る結合剤、特に抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある特定の実施形態では、結合剤（２）は、中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）に結合しない。

【００４０】

「結合」とは、直接的であれ間接的であれ、あらゆる相互作用を意味する。直接的相互作用は、２つの結合パートナー間の接触（例えば、物理的または化学的）を意味する。間接的相互作用は、相互作用パートナーが２分子を超える複合体において相互作用するあらゆる相互作用を意味する。相互作用は完全に間接的であってもよい（例えば、２つの分子が１つまたは複数の架橋分子の助けを借りて同じ複合体の一部となっているが、架橋分子の非存在下では結合しない）。相互作用は、部分的に直接的であっても、部分的に間接的であってもよく、２つの相互作用パートナーの間には直接的な接触が依然としてあるが、このような接触は、例えば安定しておらず、１つまたは複数のさらなる分子との相互作用によって安定化される。

【００４１】

「結合の特異性」または「結合特異性」または「特異的に結合する」とは、分子Ａが、ある特定の濃度（例えば、目的のタンパク質またはプロセスを阻害または中和するのに十分な濃度）において、目的の標的（例えば、タンパク質）に、他の標的（目的の標的ではない）に結合することが可能な（可能であれば）親和性よりも高い親和性（例えば、少なくとも２倍、５倍、または少なくとも１０倍高い親和性、例えば、少なくとも２０倍、５０倍、または１００倍以上高い親和性）で結合する状況を指す。特異的結合は排他的結合を意味しない。しかし、特異的結合は、バインダーがその標的の１つまたはいくつかに対して、ある種の増大した親和性または優先性を有することを意味する。結合の排他性とは、バインダーが目的の標的のみに結合する状況を指す。「親和性」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、１つの分子（例えば、リガンド、化学物質、タンパク質ま

たはペプチド、抗体または抗体断片）が別の分子（例えば、（標的）タンパク質またはペプチド）に結合して、単一分子モノマーの平衡を、２分子の（特異的）（非共有結合による）結合によって形成される複合体へとシフトさせる程度を指す。２つ以上の結合パートナー間の非共有結合的相互作用または結合は、ファンデルワールス相互作用、水素結合、塩架橋などの相互作用に関与し得る。「解離定数」または「結合定数」（K_D）は、２つの分子間の親和性を説明するために一般的に使用され、複合体形成の速度定数（「k_{on}」値と呼ばれる）の、前記複合体の解離の速度定数（「k_{off}」または「k_{dis}」値）に対する比によって計算されることが多い。分子の別の分子に対する、例えば、抗体もしくは抗体断片の抗原に対する、またはリガンドの受容体に対する結合親和性の測定は、当業者に公知であり、例えば、リアルタイム、ラベルフリー生体層干渉測アッセイ、例えば、Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＲＥＤ９６システム（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）、または表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）、例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）、または溶液親和性ＥＬＩＳＡを含む。

【００４２】

「コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）」および、より一般的な名称である「コロナウイルス（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）」という用語は、ウイルスの１つのファミリーを指し、ウイルス表面に存在し、ビリオンにクラウン様形状を与える大きなスパイクタンパク質分子からその名称が付けられた。コロナウイルス科は以下の４つの属を含む：アルファコロナウイルス（Ａｌｐｈａｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）、ベータコロナウイルス（Ｂｅｔａｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）、ガンマコロナウイルス（Ｇａｍｍａｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）およびデルタコロナウイルス（Ｄｅｌｔａｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）。コロナウイルスは大型のエンベロープ陽性鎖ＲＮＡウイルスの多様なファミリーを代表し、広範な動物、多種多様な脊椎動物種、およびヒトに感染する。コロナウイルスのスパイク（Ｓ）タンパク質は、宿主受容体との結合と、それに続くウイルス膜と宿主細胞膜との融合に必須であり、その結果、ウイルスのヌクレオカプシドが宿主細胞の細胞質内に効果的に放出される（Ｌｅｔｋｏら（２０２０）Ｎａｔ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ５：５６２～５６９頁）。

【００４３】

人獣共通感染症の起源と推定される４種のコロナウイルスがヒトに常在している：ＨＣｏＶ－ＮＬ６３およびＨＣｏＶ－２２９Ｅ（α－コロナウイルス）ならびにＨＣｏＶ－ＯＣ４３およびＨＣｏＶ－ＨＫＵ１（β－コロナウイルス）。さらに、β－コロナウイルスによって引き起こされる重症呼吸器疾患の３つのエピソードは２０００年以降に起こっており、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１によって引き起こされる重症急性呼吸器症候群ウイルス（ＳＡＲＳ）は、人獣共通感染症起源から出現し（中間種としてハクビシンを介したコウモリ）、２００４年に消滅した（Ｄｒｏｓｔｅｎら ２００３、Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３４８：１９６７～１９７６年）。８０００を超えるＳＡＲＳ症例が報告され、死亡率はおよそ１０％であった。２０１２年には、中東呼吸器症候群（ＭＥＲＳ）がアラビア半島で出現した。ＭＥＲＳはＭＥＲＳ－ＣｏＶによって引き起こされ、２５００を超える症例で確認されており、症例致死率は３４％である（ｄｅ Ｇｒｏｏｔら．２０１３、Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｖｉｒｏｌ ８７：７７９０～７７９２頁）。２０１９年末から始まった、武漢市（中国）で報告された重症後天性肺炎の症例は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１との遺伝的関係から、現在では重症急性呼吸器症候群コロナウイルス２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）として知られる新たなβ－コロナウイルスによるものであり、第３の人獣共通感染症ヒトコロナウイルスの出現であった（Ｃｈｅｎら（２０２０）Ｌａｎｃｅｔ ３９５：５０７～５１３頁）。重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ）および中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）感染症と同様に、患者は、発熱、呼吸困難、および最も重症の場合には両側肺浸潤を含むウイルス性肺炎の症状を呈した（Ｇｒａｌｉｎｓｋｉら（２０２０）Ｖｉｒｕｓｅｓ １２：１３５頁）。

【００４４】

「サルベコウイルス」という用語は、本明細書で使用される場合、ベータコロナウイル

ス属内の亜属を指し、重症急性呼吸器症候群関連コロナウイルス種（ＳＡＲＳコロナウイルス、ＳＡＲＳ関連コロナウイルス、および重症急性呼吸器症候群コロナウイルスとしても知られる、ＳＡＲＳｒ－ＣｏＶまたはＳＡＲＳ－ＣｏＶであり、これらは本明細書において同義語として使用される）を含む。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ種に属する株の非限定的な例は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を含む。

【００４５】

入手可能な最初のゲノム配列により、新規ヒト病原体ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２はＳＡＲＳウイルスと同じコロナウイルス科サルベコウイルス亜属に分類された。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２はＳＡＲＳ－ＣｏＶ（系統Ｂ）およびＭＥＲＳ－ＣｏＶ（系統Ｃ）と同じベータコロナウイルス属に属するが、ゲノム解析の結果、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２とＳＡＲＳ－ＣｏＶとの類似性がより高いことが明らかになり、系統Ｂのメンバーとしての分類が支持される（ウイルスの分類に関する国際委員会より）。

【００４６】

他のベータコロナウイルスの中でも、このウイルスは、病原性と感染性を高めることが知られる別個の要件である多塩基性切断部位の固有の組合せが特徴である。Ｒｈｉｎｏｌｏｐｈｕｓ　ａｆｆｉｎｉｓカブトコウモリからサンプリングされたコウモリサルベコウイルス、Ｂａｔ　ＣｏＶ　ＲａＴＧ１３は、ほぼすべてのゲノム領域でＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２とクラスターを形成し、およそ９６％のゲノム配列同一性（スパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）では９３％を超える類似性）を有することが報告され、別の哺乳動物種は中間宿主として作用し得る。中間宿主であることが疑われるものの１つである、マレーセンザンコウは、アンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）受容体への結合を促進すると考えられる変異を含有し、９７％のアミノ酸配列類似性を実証する受容体結合ドメインにおいてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２と高い類似性を示すコロナウイルスを保有する。

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１と－２は両方、ヒト細胞上の受容体としてアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）を使用する。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１よりも高い親和性でＡＣＥ２に結合する（Ｗｒａｐｐら（２０２０）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３６７：１２６０～１２６３頁）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１および例えばＡｂｄｅｌｒａｈｍａｎら（２０２０．Ｆｒｏｎｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１１：５５２９０９）において概説されるいくつかのＳＡＲＳ関連コロナウイルス（ＳＡＲＳｒ－ＣｏＶ）とは識別される。

【００４７】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２とは、武漢市（中国）から始まり、世界的に発生した重篤な後天性肺炎の原因として同定された、新たに出現したサルベコウイルスを指す。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の長期にわたる世界的な拡散は、免疫逃避の選択圧と共に、ウイルスの宿主への適応をもたらし、新たなＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントの生成をもたらした。具体的には、スパイクＳ１サブユニットに位置する変異を含め、スパイク糖タンパク質の複数の変異が進化し、現在も進化を続けている。例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントは、Ｎ４３９、Ｋ４１７、Ｓ４７７、Ｌ４５２、Ｔ４７８、Ｅ４８４、Ｐ３８４、Ｎ５０１およびＤ６１４（配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクアミノ酸配列に対して）から選択される１つまたは複数の位置における変異を含み得る。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントのさらなる非限定的な例は、Ｎ５０１ＹバリアントなどのＮ５０１位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アルファバリアント）；Ｎ５０１ＹおよびＥ４８４ＫバリアントなどのＮ５０１位およびＥ４８４位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アルファ＋Ｅ４８４Ｋバリアント）；Ｋ４１７Ｎ、Ｅ４８４ＫおよびＮ５０１ＹバリアントなどのＫ４１７位、Ｅ４８４位およびＮ５０１位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えばＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ベータバリアント）；Ｐ３８４Ｌ、Ｋ４１７Ｎ、Ｅ４８４ＫおよびＮ５０１ＹバリアントなどのＰ３８４位、Ｋ４１７位、Ｅ４８４位およびＮ５０１位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えばＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ベータ＋Ｐ３８４ＬバリアントＬ４５２ＲおよびＥ４８４Ｑバリアントなどの４５２位およ

びＥ４８４位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えばＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２カッパバリアント）；Ｌ４５２ＲおよびＴ４７８Ｋバリアントなどの Ｌ４５２位およびＴ４７８位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２デルタバリアント）；Ｌ４５２Ｒバリアントなどの Ｌ４５２位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２イプシロンバリアント）；Ｋ４１７Ｔバリアントなどの Ｋ４１７位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ガンマバリアント）；Ｄ６１４Ｇバリアントなどの Ｄ６１４位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４Ｇバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．１バリアントまたはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２バリアント）；Ｋ１４７Ｅ、Ｗ１５２Ｒ、Ｆ１５７Ｌ、Ｉ２１０Ｖ、Ｇ２５７Ｓ、Ｄ３３９Ｈ、Ｇ４４６ＳおよびＮ４６０Ｋバリアントなどの Ｋ１４７位、Ｗ１５２Ｒ位、Ｆ１５７位、Ｉ２１０位、Ｇ２５７位、Ｄ３３９位、Ｇ４４６およびＮ４６０位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．２．７５バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．２．７５．２バリアント）；Ｒ３４６Ｔ、Ｆ４８６ＳおよびＤ１１９９Ｎバリアントなどの Ｒ３４６位、Ｆ４８６位およびＤ１１９９位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．２．７５．２バリアント）；Ｈ６９－、Ｖ７０－、Ｌ４５２ＲおよびＦ４８６Ｖバリアントなどの Ｈ６９位、Ｖ７０位、Ｌ４５２位およびＦ４８６位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えばＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．４／ＢＡ．５バリアント）；Ｒ３４６ＴおよびＮ６５８Ｓバリアントなどの Ｒ３４６位およびＮ６５８位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．４．６バリアント）；Ｒ３４６Ｔバリアントなどの Ｒ３４６位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＦ．７バリアント）；Ｒ３４６Ｔ、Ｋ４４４ＴおよびＮ４６０Ｋバリアントなどの Ｒ３４６位、Ｋ４４４位およびＮ４６０位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＱ．１．１バリアント）；Ｖ８３Ａ、Ｙ１４４－、Ｈ１４６Ｑ、Ｑ１８３Ｅ、Ｖ２１３Ｅ、Ｒ３４６Ｔ、Ｌ３６８Ｉ、Ｖ４４５Ｐ、Ｇ４４６Ｓ、Ｎ４６０Ｋ、Ｆ４８６ＳおよびＦ４９０Ｓバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢバリアント）またはＶ８３Ａ、Ｙ１４４－、Ｈ１４６Ｑ、Ｑ１８３Ｅ、Ｖ２１３Ｅ、Ｒ３４６Ｔ、Ｌ３６８Ｉ、Ｖ４４５Ｐ、Ｇ４４６Ｓ、Ｎ４６０Ｋ、Ｆ４８６ＰおよびＦ４９０Ｓバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢ．１．５バリアント）などのＶ８３位、Ｙ１４４位、Ｈ１４６位、Ｑ１８３位、Ｖ２１３位、Ｒ３４６位、Ｌ３６８位、Ｖ４４５位、Ｇ４４６位、Ｎ４６０位、Ｆ４８６位、およびＦ４９０位に変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを含む。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のアルファバリアント（Ｂ．１．１．１．７系統としても知られる）は、２０２０年後半に英国で初めて検出され、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の懸念されるバリアントとして最初に報告されたもののうちの１つであった。これは、Ｎ５０１Ｙ変異およびＤ６１４Ｇ変異を含め、スパイクタンパク質にいくつかの変異を含有した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のオミクロンバリアントは南アフリカとボツワナで最初に同定され、２０２１年１１月２４日に新規バリアントとして世界保健機関（ＷＨＯ）に報告された（Ｆａｎら　２０２２．Ｓｉｇｎａｌ　Ｔｒａｎｓｄｕｃｔ　Ｔａｒｇｅｔ　Ｔｈｅｒ．７：１４１頁）。オミクロンバリアントは単一の株ではなく、ＢＡ．１、ＢＡ．２、およびＢＡ．３を含む少なくとも３つの系統に進化した。ＢＡ．１系統では最大６０の変異が同定されており、そのうち３８がスパイク（Ｓ）タンパク質に、１がエンベロープ（Ｅ）タンパク質に、２が膜（Ｍ）タンパク質に、６がヌクレオカプシド（Ｎ）タンパク質に生じている。ＢＡ．２系統は５７の変異を有し、そのうち３１がＳタンパク質にあり、Ｎ末端はＢＡ．１とは大きく異なっている。「ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２」という用語は、本明細書で使用される場合、武漢で同定された原株とそのバリアントの両方を網羅する。

【００４８】

結合剤、特に抗体および抗体断片は、（３）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質などのサルベコウイルスのスパイクタンパク質に特異的に結合するかまたは結合し、特に結合剤、特に抗体および抗体断片は、（４）サルベコウイルススパイクタンパク質のＳ２サブユニット、またはＳ２サブユニットの一部に特異的に結合するかまたは結合し、より詳細には、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（２２）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｙ１２０６に位置するＳ２サブユニットの領域、好ましくはアミノ酸Ｎ１１９２からアミノ酸Ｙ１２０６に位置する領域、またはアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｌ１２０３に位置する領域、より好ましくは、アミノ酸Ｎ１１９２からアミノ酸Ｌ１２０３に位置する領域、さらにより好ましくは、アミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｌ１２０３に位置する領域、最も好ましくは、アミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｑ１２０１に位置する領域に特異的に結合するかもしくは結合するか、またはその範囲内に特異的に結合するかもしくは結合する。ある特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（２３）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｙ１２０６、好ましくはアミノ酸Ｎ１１９２からアミノ酸Ｙ１２０６、またはアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｌ１２０３まで、より好ましくはアミノ酸Ｎ１１９２からアミノ酸Ｌ１２０３まで、さらにより好ましくはアミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｌ１２０３まで、最も好ましくはアミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｑ１２０１までの領域に対応するサルベコウイルスのスパイクタンパク質またはサルベコウイルススパイクタンパク質のＳ２サブユニット領域に特異的に結合するかもしくは結合するか、またはその領域内に特異的に結合するかもしくは結合する。より詳細には、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（５）サルベコウイルススパイクタンパク質（のＳ２サブユニット）のヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメイン、またはＨＲ２ドメインの一部に特異的に結合するかまたは結合する。ある特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（６）ウイルス膜に近位のＨＲ２ドメインの領域、好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の、アミノ酸Ａ１１７４からアミノ酸Ｅ１２０２に位置する領域、より好ましくはアミノ酸Ｉ１１７９からアミノ酸Ｅ１２０２に位置する領域、さらにより好ましくはアミノ酸Ｄ１１８４からアミノ酸Ｅ１２０２に位置する領域、またより好ましくはアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｅ１２０２に位置する領域、またはアミノ酸Ｖ１１８９からアミノ酸Ｅ１２０２に位置する領域、なおより好ましくはアミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｅ１２０２に位置する領域、最も好ましくはアミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｑ１２０１に位置する領域に特異的に結合するかもしくは結合するか、またはその領域内に特異的に結合するかもしくは結合し、あるいは（７）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｙ１２０６までの領域に対応するＨＲ２ドメインの（またはＳ２サブユニットの）領域、好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｅ１１８８からアミノ酸Ｙ１２０３までの領域に対応するＨＲ２ドメインの（またはＳ２サブユニットの）領域、より好ましくは、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ａ１１９０からアミノ酸Ｌ１２０３までの領域に対応するＨＲ２ドメインの（またはＳ２サブユニットの）領域、例えば、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｋ１１９１からアミノ酸Ｅ１２０２までの領域に対応するＨＲ２ドメインの（またはＳ２サブユニットの）領域：または配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｎ１１９２からアミノ酸Ｑ１２０１までの領域に対応するＨＲ２ドメインの（またはＳ２サブユニットの）領域（例えば、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｎ１１９２からアミノ酸Ｑ１２０１までの領域）、さらにより好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｌ１２０３までの領域に対応するＨＲ２ドメインの（またはＳ２サブユニットの）領域、最も好ましくは、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｎ１１９４からアミノ酸Ｑ１２０１までの

領域に対応するＨＲ２ドメインの（またはＳ２サブユニットの）領域、例えば配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｓ１１９６からアミノ酸Ｑ１２０１までの領域に対応するＨＲ２ドメインの（またはＳ２サブユニットの）領域に特異的に結合するかまたは結合するか、またはその領域内に特異的に結合するかもしくは結合する。特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（８）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９２、Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｌ１１９７、Ｄ１１９９、Ｌ１２００、Ｑ１２０１およびＥ１２０２のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つまたはすべて、好ましくは、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９、Ｑ１２０１およびＥ１２０２のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つまたはすべて、より好ましくは、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つまたはすべて、最も好ましくは、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１のうちの少なくとも１つまたは両方に特異的に結合するかまたは結合する。実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（２４）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９２、Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｌ１１９７、Ｄ１１９９、Ｌ１２００、Ｑ１２０１およびＥ１２０２に対応する、サルベコウイルスのスパイクタンパク質またはサルベコウイルスのＳ２サブユニットもしくはＨＲ２ドメインの、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つまたはすべてのアミノ酸残基、好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９、Ｑ１２０１およびＥ１２０２に対応する少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つまたはすべてのアミノ酸残基、より好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１に対応する少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つまたはすべてのアミノ酸残基、最も好ましくは、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１に対応する少なくとも１つまたは両方のアミノ酸残基に特異的に結合するかまたは結合する。特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（２５）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１、または配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の前記アミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質のアミノ酸残基、任意に、配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１、または配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の前記アミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質のアミノ酸残基に特異的に結合するかまたは結合する。

【００４９】

特定の実施形態では、（２６）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９２、Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｌ１１９７、Ｄ１１９９、Ｌ１２００、およびＱ１２０１およびＥ１２０２のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つまたはすべて、好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９、Ｑ１２０１およびＥ１２０２のうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つまたはすべて、より好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１のうち

の少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つまたはすべて、最も好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１のうちの少なくとも１つまたは両方は、スパイクタンパク質への結合剤、特に抗体および抗体断片の結合に不可欠である。実施形態では、（２７）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９２、Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｌ１１９７、Ｄ１１９９、Ｌ１２００、Ｑ１２０１およびＥ１２０２に対応するサルベコウイルスのスパイクタンパク質またはサルベコウイルススパイクタンパク質のＳ２サブユニットもしくはＨＲ２ドメインの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つまたはすべてのアミノ酸残基、好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９、Ｑ１２０１およびＥ１２０２に対応する少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つまたはすべてのアミノ酸残基、より好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１に対応する少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つまたはすべてのアミノ酸残基、最も好ましくは配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１に対応する少なくとも１つまたは両方のアミノ酸残基は、スパイクタンパク質への結合剤、特に抗体および抗体断片の結合に不可欠である。特定の実施形態では、（２８）配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１、または配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の前記アミノ酸残基Ｓ１１９６およびＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質のアミノ酸残基、任意に配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１、または配列番号８６に定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の前記アミノ酸残基Ｎ１１９４、Ｓ１１９６、Ｄ１１９９およびＱ１２０１に対応するスパイクタンパク質のアミノ酸残基は、スパイクタンパク質への結合剤、特に抗体および抗体断片の結合に不可欠である。

【００５０】

結合部位の評価は、結合剤、特に抗体もしくは抗体断片と、スパイクタンパク質、もしくはＳ２サブユニット、もしくはＨＲ２ドメインを含むペプチドとの複合体の結晶構造を決定すること、例えば実施例において示されている結晶構造決定法を適用することによって、ならびに／またはウイルス逃避バリアント／変異体の選択および解析、例えば、実施例において示されているウイルス逃避選択法を適用することによって、ならびに／または、結合剤の存在下および非存在下で組換えスパイクタンパク質（またはＳ２サブユニットまたはＨＲ２含有ペプチド）に関する水素－重水素交換を分析すること、例えば、実施例において示されている質量分析（ＨＤＸ－ＭＳ法）によってモニターされる水素－重水素交換法を適用することによって、評価され得る。

【００５１】

有利なことに、これらのアミノ酸残基は、異なるクレードのサルベコウイルス間、特にクレード１、クレード２、およびクレード３のサルベコウイルス間で保存されている。好ましい実施形態では、結合剤、特に抗体または抗体断片は、（９）サルベコウイルススパイクタンパク質のＲＢＤに結合しない。

【００５２】

結合剤、特に抗体および抗体断片（２９）は、スパイクタンパク質の四級エピトープに特異的に結合するかまたは結合する。特に、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（３０）三量体ＨＲ２ドメイン（または三量体Ｓ２サブユニットまたは三量体スパイクタンパク質）に特異的に結合するかまたは結合する。特に、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（３１）三量体ＨＲ２ドメイン（または三量体Ｓ２サブユニットまたは三量体スパイクタンパク質）内の四級エピトープに特異的に結合するかまたは結合する。より詳細には、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（３２）２つの隣接するＨＲ２ドメインまたはヘリッ

クス内に位置する四級エピトープに特異的に結合するかまたは結合する。特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（３３）１つのＨＲ２ドメインまたはヘリックス内の本明細書に記載される１つまたは複数の相互作用アミノ酸残基、および隣接するＨＲ２ドメインまたはヘリックス内の本明細書に記載される１つまたは複数の相互作用アミノ酸残基を含むかまたはそれからなる四級エピトープに特異的に結合するかまたは結合する。特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（３４）三量体スパイクタンパク質内の四級エピトープに特異的に結合するかまたは結合し、ここで、三量体スパイクタンパク質の２つのモノマーなどの少なくとも２つからの本明細書に記載されるアミノ酸残基、特に１つまたは複数の相互作用アミノ酸残基は、前記四級エピトープに寄与する。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「四級エピトープ」という用語は、その構造が多量体複合体への複数のプロトマーまたはモノマーの配置に依存するか、またはそれによって増強される構造エピトープを指す。四級エピトープは、多量体複合体の単一のタンパク質（またはモノマー）中に位置することもあれば、複数のプロトマーにまたがり、それらの相互作用によって新たに形成されることもある。

【００５４】

四級エピトープまたは多量体タンパク質への特異的結合または結合は、単量体および／または（安定化された）多量体タンパク質への結合を酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイにより評価することによって、例えば実施例において示されているＥＬＩＳＡアッセイを適用することによって評価することができる。三量体スパイクタンパク質の安定化は、スパイクタンパク質をバクテリオファージＴ４由来の三量体タンパク質フィブリチンのフォルドンドメインに融合させることによって達成され得る。単量体タンパク質への結合と、１．０ｎｇ／ｍｍ^{2}以上、好ましくは１．２ｎｇ／ｍｍ^{2}以上、または１．５ｎｇ／ｍｍ^{2}以上の密度などの、高密度の単量体タンパク質のみでの、単量体タンパク質の密度との間の相関は、タンパク質の多量体構造への特異的結合または結合を示し得る。所与の密度の単量体タンパク質と多量体タンパク質では、単量体タンパク質と比較して多量体タンパク質への結合が増強されている場合は、多量体タンパク質への特異的結合または結合を示し得る。

【００５５】

いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、三量体スパイクタンパク質、特に三量体スパイクタンパク質内の四級エピトープに結合すると、本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片は、スパイクタンパク質のプレフュージョン構造を安定化し得る。より詳細には、結合剤はＨＲ２コイルドコイルを安定化またはロックし得る。このように、結合剤は、スパイク制御膜融合プロセスにおける重要な初期段階と考えられるＨＲ２コイルドコイルのほぐれを防止し得る；または、結合剤は、スパイクタンパク質のプレヘアピン中間体からポストフュージョン構造へのリフォールディングにおける重要なステップと考えられる、伸びたＨＲ１アルファヘリックスへのＨＲ２アルファヘリックスの移動を妨害またはブロックし得る；および／または、結合剤は、融合プロセスにとって極めて重要であると考えられる６つのヘリックスバンドル形成の完了を防止し得る。実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片（３５）は、サルベコウイルスのスパイクタンパク質のプレフュージョン構造を安定化することが可能である。実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片（３６）は、ＨＲ２コイルドコイルを安定化することが可能である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、構造タンパク質として、スパイク（Ｓ）タンパク質、エンベロープ（Ｅ）タンパク質、膜（Ｍ）タンパク質、およびヌクレオカプシド（Ｎ）タンパク質を含有する。さらに、１６種の非構造タンパク質（ｎｓｐ１～１６）が確認されており、これらは複製および宿主防御の改変に関与している。Ｎｓｐ１２タンパク質はＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（ＲｄＲｐ）に相当する。

【００５６】

ウイルス表面から突出し、ウイルスにクラウン様の外観を与えるホモ三量体を形成する

膜貫通糖タンパク質であるスパイクタンパク質またはＳタンパク質は、本発明において特に興味がもたれる。スパイクタンパク質は、２つのサブユニット：Ｓ１およびＳ２を有する。

【００５７】

Ｓ１サブユニットは、Ｎ末端ドメイン（ＮＴＤ）、受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）、ならびにサブドメイン１および２（ＳＤ１、ＳＤ２）を含む。Ｓ１サブユニットは宿主受容体結合に関与する。スパイクタンパク質は、Ｓ１サブユニットに存在する受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）を介してヒト宿主細胞受容体アンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）に結合する。

【００５８】

Ｓ２サブユニットは、ウイルスおよび宿主細胞の膜の融合ならびにウイルスの侵入に関与しており、複数のドメイン：Ｓ２’プロテアーゼ切断部位（融合に必要な宿主プロテアーゼによる切断）、融合ペプチド（ＦＰ）、ヘプタッドリピート１（ＨＲ１）ドメイン、セントラルヘリックス（ＣＨ）ドメイン、コネクタードメイン（ＣＤ）、ヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメイン、膜貫通（ＴＭ）ドメイン、および細胞質側末端（ＣＴ）ドメインを含む（Ｗａｎｇ ら．（２０２０）．Ｆｒｏｎｔ Ｃｅｌｌ Ｉｎｆｅｃｔ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ １０：５８７２６９頁）。

【００５９】

Ｓタンパク質は通常、プレフュージョン構造で存在する。前記プレフュージョンコンフォメーションでは、生合成中にＳ１－Ｓ２フューリン切断部位で切断されたＳ１とＳ２が互いに非共有結合のままであり、Ｓ１とＳ２が非切断のままであるＳＡＲＳ－ＣｏＶとは異なる。Ｓタンパク質の閉じた状態（ＰＤＢ：６ＶＸＸ）では、三量体中の３つのＲＢＤドメインは三量体から突出していないが、開いた状態（ＰＤＢ：６ＶＹＢ）、すなわち「アップ」構造では、ＲＢＤの１つが３量体から突出している。三角形の断面を有するＳ－三量体エクトドメインの長さは約１６０オングストロームであり、一方、Ｓ１ドメインはＶ字形態である。プロトマーあたり２２個のＮ－連結型グリコシル化部位のうち１６個がグリコシル化されているようである（Ｗａｌｌｓ ら（２０２０）Ｃｅｌｌ １８０：２８１～２９２頁）。

【００６０】

Ｓタンパク質のＳ１サブユニットは、そのＲＢＤ領域を介してＡＣＥ２と結合し、エンドソームの形成を促進し、ウイルス融合活性を誘発する。Ｓ１－ＡＣＥ２結合後、Ｓは膜貫通プロテアーゼセリンサブタイプ２（ＴＭＰＲＳＳ２）またはエンドソームカテプシンなどの細胞内プロテアーゼによって切断され、Ｓ２サブユニットに位置する融合ペプチド（ＦＰ）を露出させる。ＦＰは宿主細胞膜に挿入され、それによってウイルス膜と宿主細胞膜との間の距離を縮める。ＳタンパクのＨＲ１ドメインは宿主細胞膜に非常に近位にあるのに対し、ＨＲ２ドメインはウイルス膜側により近接する。次いで、ＨＲ２はＨＲ１に折り返され、それにより、２つのＨＲドメインは融合コアの反平行形式で６つのヘリックス構造を形成する。ウイルス膜は宿主細胞膜に向かって引っ張られながら強固に結合し、２つの膜が融合してウイルスゲノムが宿主細胞内に放出される（Ｈｕａｎｇ ら．（２０２０）Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｌｏｇｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ ４１：１１４１～１１４９頁）。

【００６１】

本明細書において同義語として使用される「スパイクタンパク質」、「Ｓ」または「Ｓタンパク質」は、サルベコウイルスのスパイクタンパク質を指し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＳタンパクおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１ Ｓタンパクなどの特定のＳタンパクを指すことができる。「スパイクタンパク質」および「ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質」という用語は、異なるサルベコウイルスまたはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２単離株から単離されたサルベコウイルスまたはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のタンパク質バリアント、および組換えサルベコウイルスまたはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質、またはその断片を含む。用語はまた、例えばヒスチジンタグ、マウスもしくはヒト

Ｆｃ、またはシグナル配列に接続されたサルベコウイルススパイクタンパク質またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を包含する。

【００６２】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質の配列は、Ｇｅｎｂａｎｋ　受託番号ＱＨＱ８２４６４、バージョンＱＨＱ８２４６４．１の下に見出される／それと対応するかまたはそれに対応し、および配列番号８６としても本明細書において定義される：

【化１】

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFH
AIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCE
FQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNID
GYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAA
YYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFP
NITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVY
ADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLK
PFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPK
KSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGG
VSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSY
ECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEI
LPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTP
PIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGL
TVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIA
NQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAE
VQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSA
PHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFV
SGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNE
VAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCC
KFDEDDSEPVLKGVKLHYT

【００６３】

ここで、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ＨＲ２ドメインは、配列番号８６のアミノ酸１１６９～１２０２と対応し／それに対応し、以下の（配列番号８７）：
ＩＳＧＩＮＡＳＶＶＮＩＱＫＥＩＤＲＬＮＥＶＡＫＮＬＮＥＳＬＩＤＬＱＥ（配列番号８７）
に示されている。

【００６４】

ここで、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質ＴＭドメインは、配列番号８６のアミノ酸１２１４～１２３７と対応する／それに対応する。

【００６５】

本明細書で使用される場合、ＨＲ２ドメインの「ウイルス膜に近位の」領域は、ＨＲ２ドメイン内の、ウイルス膜から４０アミノ酸以内の領域を指す。

【００６６】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質の配列は、Ｇｅｎｂａｎｋ　受託番号ＮＰ＿８２８８５１．１の下に見出され得／それと対応するかまたはそれに対応し、および配列番号１１１としても本明細書において定義される。ここで、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイ

クタンパク質ＨＲ２ドメインは、配列番号１１１のアミノ酸１１５１～１１８４と対応し／それに対応し、配列番号８７に示されている。本明細書で言及されるアミノ酸およびアミノ酸番号付けは、配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に対するものであり／それに対応し、他のサルベコウイルスのスパイクタンパク質またはスパイクタンパク質断片、ドメインまたは領域における対応するアミノ酸は、複数のアミノ酸配列を整列させることによって容易に決定することができる。

【００６７】

本明細書において互換的に使用される「アンジオテンシン変換酵素２」、「ＡＣＥ２」または「ＡＣＥ－２」は、ジペプチジルカルボキシジペプチダーゼのファミリーに属する哺乳動物タンパク質を指し、ＥＣ：３．４．１７．２３として分類されることもある。ヒトＡＣＥ２遺伝子のゲノム位置は、ｃｈｒＸ：１５，５６１，０３３－１５，６０２，１５８（ＧＲＣｈ３８／ｈｇ３８；マイナス鎖）、あるいはｃｈｒＸ：１５，５７９，１５６－１５，６２０，２７１（ＧＲＣｈ３７／ｈｇ１９；マイナス鎖）上にある。ＡＣＥ２は、少なくともヒトコロナウイルスＳＡＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、およびＮＬ６３／ＨＣｏＶ－ＮＬ６３（ニューヘイブンコロナウイルスとしても知られている）に対するレセプターとして作用する。ヒトＡＣＥ２タンパク質のＵｎｉＰｒｏｔＫＢ識別子：Ｑ９ＢＹＦ１。アイソフォーム１（識別子：Ｑ９ＢＹＦ１－１）がカノニカル配列として選択されている。ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＣ＿０００００２３．１１におけるヒトＡＣＥ２遺伝子の参照ＤＮＡ配列。ＧｅｎＢａｎｋ　ＮＭ＿００１３７１４１５．１およびＮＭ＿０２１８０４．３におけるヒトＡＣＥ２の参照ｍＲＮＡ配列。

【００６８】

本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片のさらなる機能的特徴は、それらが、（１０）サルベコウイルスを中和することが可能である、特に（１１）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のいずれか一方または両方、好ましくは両方を中和することが可能であるということである。

【００６９】

本明細書で使用される場合、「中和結合剤」または「中和抗体」（または「サルベコウイルス、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２および／またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１を中和することが可能な結合剤または抗体」）は、サルベコウイルス、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２および／またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１に結合する結合剤または抗体を指し、サルベコウイルス、またはＳＡＲＳ－ＣｏＶー２またはＳＡＲＳ－ＣｏＶー１の能力を阻害または抑制し、宿主において感染を開始および／または永続させる。中和結合剤または抗体は、例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２もしくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１などのサルベコウイルスの宿主受容体、特にＡＣＥ２への結合を；ならびに／または、例えば、Ｓ１の脱落を誘導することによって、および／もしくはウイルス融合を妨害することによって、ウイルス侵入を妨害し得る。現在、本発明による結合剤および抗体が、どのようにサルベコウイルス感染を中和、阻害、遮断または抑制するのかは完全には明らかではない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片は、（４４）Ｓ１の脱落をモジュレートまたは妨害しない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片は、（１２）Ｓ１の脱落を誘導しない。ある特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（４５）Ｓ１の脱落を防止しない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片は、（１３）スパイク媒介性のシンシチア形成を阻害することが可能である。その結果、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（１４）ウイルス融合を阻害することが可能であり得、いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、このため、サルベコウイルスが宿主細胞への感染プロセスを完了することができない可能がある。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片は、（４６）ＨＲ１のアンフォールディングを防止しない。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片は、（４７）ＨＲ１のＨＲ２上へのフォールディング（例えば、Ｓ２の６つのヘリックスバンドルの形成中のように）を妨げない。それらの作用機序とは無関係に、本発明による結合剤、特に抗体お

よび抗体断片は、サルベコウイルス感染を強力に中和することが可能である。

【００７０】

中和活性は、限定されないが、シュードウイルス中和アッセイおよびプラーク低減試験を含む、当業者に公知の標準中和アッセイを使用して測定され得る。このような中和アッセイを実施するための例示的な方法は、本明細書の実施例に記載される。中和活性はまた、サルベコウイルス、またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１感染の１つまたは複数の指標、例えば、サルベコウイルススパイクタンパク質を発現する細胞とサルベコウイルス受容体ＡＣＥ２を発現する細胞との間のシンシチア形成を測定することによって評価することができる。

【００７１】

特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（１５）１００ｎｇ／ｍｌ以下、好ましくは５０ｎｇ／ｍｌ以下または２０ｎｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１０ｎｇ／ｍｌ以下、さらにより好ましくは１ｎｇ／ｍｌ以下の半減最大阻害濃度または５０％阻害濃度（IC_{50}）で、サルベコウイルス、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２および／またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１を中和することが可能であり、これらの濃度は、好ましくは、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）－サルベコウイルススパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイなどのサルベコウイルススパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイで決定され、より好ましくは、ＶＳＶ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイまたはＶＳＶ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイなどのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質および／またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイにおいて決定される。特に、シュードウイルス中和アッセイは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントスパイクタンパク質またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質などのサルベコウイルスのスパイクタンパク質を含有するシュードタイプ化ＶＳＶ－ｄｅｌＧウイルスに基づいてもよい。結合剤または抗体の中和活性に関連して本明細書で使用される場合、「５０％阻害濃度」または「IC_{50}」は、サルベコウイルスの５０％中和に必要とされる結合剤または抗体の濃度などの量を指す。

【００７２】

特定の実施形態では、結合剤、特に抗体および抗体断片は、（１６）Ｄ６１４Ｇバリアントなどの６１４位（配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクアミノ酸配列に対して）の変異を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントなどの少なくとも１つのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アルファバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．５バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２．７５．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．４．６バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＦ．７バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＱ．１．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢバリアントおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢ．１．５バリアントの少なくともいずれか１つまたは複数、好ましくはすべてを中和することが可能である。特定の実施形態では、結合剤、特に本明細書に記載の抗体および抗体断片は、好ましくはＶＳＶ－ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　バリアントスパイクシュードウイルス中和アッセイなどのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントスパイクシュードウイルス中和アッセイにおいて決定した場合、１００　ｎｇ／ｍｌ以下、好ましくは５０　ｎｇ／ｍｌ以下、または２０　ｎｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１０　ｎｇ／ｍｌ以下、さらにより好ましくは１　ｎｇ／ｍｌ以下のIC_{50}で、（１７）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アルファバリアントを中和することが可能である、（１８）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．１バリアントを中和することが可能である、（１９）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＡ．２バリアントを中和することが可能である、（３７）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＡ．５バリアントを中和することが可能である、（３８）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＡ．２．７５．２バリアントを中和することが可能である、（３９）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２

オミクロン　ＢＡ．４．６バリアントを中和することが可能である、（４０）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロン　ＢＦ．７バリアントを中和することが可能である、（４１）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＱ．１．１バリアントを中和することが可能である、（４２）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢバリアントを中和することが可能である、および／または（４３）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢ．１．５バリアントを中和することが可能である。

【００７３】

本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片は、（１４）ウイルス融合を阻害することが可能であることをさらに特徴とする。特定の実施形態では、本明細書に記載の結合剤、特に抗体および抗体断片は、（１３）スパイク媒介性のシンシチアの形成を阻害することが可能であり、より詳細には、それらは（２０）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２および／またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質などのサルベコウイルススパイクタンパク質を発現する細胞と、サルベコウイルス（Ｓａｒｂｏｃｏｖｉｒｕｓ）宿主受容体、特にＡＣＥ２受容体を発現する細胞との間のシンシチアの形成を阻害することが可能である。

【００７４】

本明細書で使用される場合、「ウイルス融合」とは、ウイルス膜と宿主細胞膜との融合を指す。ウイルス融合アッセイは当業者に周知であり、このような方法を実施するための例示的な方法は、本明細書の実施例に記載されている。当業者には明らかなように、完全な阻害は必要とされず、当業者は、ウイルス融合またはスパイク媒介性のシンシチア形成を有意に阻害する結合剤、抗体および抗体断片を同定することができる。好ましくは、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体および抗体断片は、（２１）少なくとも５０％の阻害、好ましくは少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％または少なくとも９０％の阻害を誘導し得る。

【００７５】

特定の実施形態では、本明細書の上記に記載されているサルベコウイルス結合剤、特にサルベコウイルス抗体または抗体断片の機能的特徴のいくつかは、このような結合剤、抗体または抗体断片を特徴付けるように組み合わされ、例えば、サルベコウイルススパイクタンパク質ＨＲ２　ドメインに結合するかまたは特異的に結合し、かつサルベコウイルス、特にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２武漢株、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４Ｇバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　アルファバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．５バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２．７５．２バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．４．６バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＦ．７バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＱ．１．１バリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢバリアント、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＸＢＢ．１．５バリアント）およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のうちの少なくとも一方または両方を中和することが可能であり、好ましくは、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）－サルベコウイルススパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイにおいて決定下場合、５０％阻害濃度（IC_{50}）が１００ｎｇ／ｍｌ以下、好ましくは１０ｎｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１ｎｇ／ｍｌ以下でサルベコウイルスを中和することが可能である。このような結合剤、抗体または抗体断片は、サルベコウイルススパイクタンパク質を発現する細胞とアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）受容体を発現する細胞との間のスパイク媒介性シンシチア形成を阻害することが可能であること、および／またはウイルス融合を阻害することが可能であること、および／または中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）と結合しないことをさらに特徴とし得る。

【００７６】

本明細書に記載の結合剤はまた、ポリペプチド性（ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｉｃ）結合剤（すなわち、ペプチド性、ポリペプチド性もしくはタンパク質性の部分を含む結合剤、またはペプチド、ポリペプチド、タンパク質もしくはタンパク質ドメインを含む結合剤）ま

たはポリペプチド結合剤（すなわち、結合剤がペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質である）として構造的に定義され得る。

【００７７】

「タンパク質」、「ポリペプチド」、および「ペプチド」という用語は、アミノ酸残基のポリマー、ならびにそのバリアントおよび合成類似体を指すために本明細書で互換的に使用され、アミノ酸の連続する線状の配置は一緒に、「アミノ酸配列」または「タンパク質配列」をもたらす／形成する。「ペプチド」はまた、例えば酵素（例えばトリプシン）消化後に、元のタンパク質に由来する部分的なアミノ酸配列と呼ばれることもある。これらの用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーだけでなく、１つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体などの合成の天然に存在しないアミノ酸であるアミノ酸ポリマーにも適用される。また、官能基またはタンパク質の共有結合による付加（例えば、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化、メチル化、脂質化およびニトロシル化）、またはタンパク質分解処理などの１つまたは複数の翻訳後修飾を含むタンパク質も含まれる。アミノ酸配列と改変に基づいて、ポリペプチドの原子質量もしくは重量または分子質量または重量は（キロ）ダルトン（ｋＤａ）で表される。タンパク質のさらなる改変には、Ｈｉｓタグやｓｏｒｔａｇのようなタグの付加が含まれる。例えば、ソルタギング（ｓｏｒｔａｇｇｉｎｇ）（ソルターゼに媒介されるペプチド転移；Ｐｏｐｐら．２００７、Ｎａｔ　Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏｌ　３：７０７～７０８頁）によって、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２を中和する多腕ＰＥＧナノボディが構築された（Ｍｏｌｉｎｅｒ－Ｍｏｒｒｏ　ら．２０２０、Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ　１０：１６６１頁））。

【００７８】

「タンパク質ドメイン」は、タンパク質中の別個の機能的および／もしくは構造的単位またはタンパク質の別個の機能的部分および／もしくは構造的部分である。通常、タンパク質ドメインは特定の機能または相互作用を担い、タンパク質の全体的な（生物学的）役割に貢献する。ドメインは種々の生物学的背景に存在し得、類似のドメインは、類似または異なる機能を有する異なるタンパク質中に見られることもある。タンパク質ドメインは、例えば、いくつかの分子内システイン（例えば、システインノットタンパク質）によって拘束されている場合、硬い３次元構造を有することもあれば、例えば、結合したリガンドの有無または例えば、翻訳後修飾の有無によって、異なる３Ｄ構造をとることもあり、または、あまり定義されていない、より流動的な３Ｄ構造を有することもある。

【００７９】

アミノ酸は、定義された３文字または１文字コード命名法によって本明細書で示され、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ　Ｊｏｉｎｔ　Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ　ｏｎ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ（Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ　ａｎｄ　Ｓｙｍｂｏｌｉｓｍ　ｆｏｒ　Ａｍｉｎｏ　Ａｃｉｄｓ　ａｎｄ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ．Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１３８：９～３７頁（１９８４））においても以下の通り与えられる：アラニン（ＡまたはＡｌａ）、システイン（ＣまたはＣｙｓ）、アスパラギン酸（ＤまたはＡｓｐ）、グルタミン酸（ＥまたはＧｌｕ）、フェニルアラニン（ＦまたはＰｈｅ）、グリシン（ＧまたはＧｌｙ）、ヒスチジン（ＨまたはＨｉｓ）、イソロイシン（ＩまたはＩｌｅ）、リジン（ＫまたはＬｙｓ）、ロイシン（ＬまたはＬｅｕ）、メチオニン（ＭまたはＭｅｔ）、アスパラギン（ＮまたはＡｓｎ）、プロリン（ＰまたはＰｒｏ）、グルタミン（ＱまたはＧｌｎ）、アルギニン（ＲまたはＡｒｇ）、セリン（ＳまたはＳｅｒ）、スレオニン（ＴまたはＴｈｒ）、バリン（ＶまたはＶａｌ）、トリプトファン（ＷまたはＴｒｐ）、およびチロシン（ＹまたはＴｙｒ）。

【００８０】

より詳細には、本明細書に記載の結合剤は、本明細書において定義される免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）のいずれかに含まれる相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むポリペプチド性またはポリペプチド結合剤として構造的に定義され得る。好ましい実施形態では、ポリペプチド性またはポリペプチド結合剤は、（単離された）抗体または抗体断片である。

【００８１】
ある特定の実施形態では、本発明による結合剤、特に抗体および抗体断片は、本明細書において定義される免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）に含まれる少なくともＣＤＲ３を含む、ポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体および抗体断片として構造的に定義され得る。他の実施形態では、本発明による結合剤、特に抗体および抗体断片は、本明細書において定義される免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）に含まれるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３のうちの少なくとも２つ（例えば、ＣＤＲ１およびＣＤＲ３、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３、ＣＤＲ１およびＣＤＲ２）、またはＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３の３つすべてを含む、ポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体および抗体断片として構造的に定義され得る。このようなＣＤＲは、本明細書の以下に示されているように、ＶＨＨ　Ｒ３＿Ｃ４（配列番号１によって定義される／に記載される）、ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ１６（配列番号２によって定義される／に記載される）、ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２０（配列番号３によって定義される／に記載される）、ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２（配列番号４によって定義される／に記載される）、ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ２０（配列番号５によって定義される／に記載される）、ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ９（配列番号６によって定義される／に記載される）、ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ６（配列番号７によって定義される／に記載される）、ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３（本明細書においてＶＨＨ　Ｒ３ＤＣ２３またはＲ３ＤＣ２３とも呼ばれる；配列番号８によって定義される／に記載される）、ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ９（配列番号９によって定義される／に記載される）、またはＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ１３（配列番号１０によって定義される／に記載される）のいずれかに含まれてもよい：

【００８２】
ＶＨＨ　Ｒ３＿Ｃ４：
【化２】
QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWSGGTIYYADSVKG
RFTISRDNDKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRASGLYDYWGQGTQVTVSS
（ 配列番号 1）

【００８３】
ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ１６：
【化３】
QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWSGGTIYYADSVKG
RFTISRDNAQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSSWYRNSGLYDYWGQGTQVTVSS
（ 配列番号 2）

【００８４】
ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２０：
【化４】
QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWSGGTIYYADSVKG
RFTISRDNAQNTVNLQMNSLEPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRNSGLYDYWGQGTQVTVSS
（ 配列番号 3）

【００８５】
ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２：

【化５】

QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASMRWSGGTKYYSDSVKG
RFSISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRNSGLYDYWGQGTQVTVSS
（　配列番号 4）

【００８６】
ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ２０：
【化６】

QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASMRWSGGTMNYADSVKG
RFTISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRNSGLYDYWGQGTQVTVSS
（　配列番号 5）

【００８７】
ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ９：
【化７】

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRIFSTYTMGWFRQAPGMEREFVAAIRWSGSTVYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAARVSKANYGTLWYRASGLYDYWGQGTQVTVSS
（　配列番号 6）

【００８８】
ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ６：
【化８】

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRILSTFTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWNGGTKNYADSVKG
RFTISRDNANSVVYLQMNSTKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRTPSLYDYWGQGTQVTVSS
（　配列番号 7）

【００８９】
ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３：
【化９】

QVQLQESGGGLVQAGDSLTLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWGAGTIYYADSMKG
RFTISRDSAKNTVDLQMNSTKPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWYQDSRRYDYWGQGTQVTVSS
（　配列番号 8）

【００９０】
ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ９：
【化１０】

QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASMRWSGGTMYYSDSVKG
RFTISRDNDKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRNSGLYDYWGQGTQVTVSS
（　配列番号 9）

【００９１】
ＶＨＨ　Ｒ４＿ＤＣ１３：

【化１１】

QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASMRWSGGTVYYSDSVKG
RFTISRDNDKNTVNLQMNNLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSFWYRNSDLYDYWGQGTQVTVSS
（　配列番号 10）

【００９２】

任意のＩＶＤまたはＩＳＶＤのアミノ酸残基の番号付けには、異なる番号付けスキームが適用され得る。例えば、ラクダ科動物のＶＨＨドメインに適用されるように、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ　＆　Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（２００１．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　３０９：６５７～７０頁）によって与えられたすべての重鎖（ＶＨ）および軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に対しては、ＡＨｏ番号付けスキームに従って番号付けを実施することができる。ＶＨドメインのアミノ酸残基の番号付けのための別の方法は、ＶＨＨドメインにも類似の方法で適用することができ、当技術分野で公知である。例えば、ＲｉｅｃｈｍａｎｎおよびＭｕｙｌｄｅｒｍａｎｓ（１９９９．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２３１：２５～３８頁）によってラクダ科動物のＶＨＨドメインに適用されるＫａｂａｔ番号付けシステムを使用することによって、ＦＲおよびＣＤＲ配列を描写することができる。ＶＨドメインおよびＶＨＨドメインに関して当技術分野で周知であるように、各ＣＤＲのアミノ酸残基の総数は変動する可能性があり、Ｋａｂａｔ番号付けによって示されるアミノ酸残基の総数と一致しない場合がある（すなわち、Ｋａｂａｔ番号付けに従った１つまたは複数の位置が実際の配列で占有されていない場合があり、または実際の配列がＫａｂａｔ番号付けによって許容される数よりも多くのアミノ酸残基を含有する場合がある）ことに留意すべきである。このことは、一般に、Ｋａｂａｔに従う番号付けが、実際の配列におけるアミノ酸残基の実際の番号付けに対応しても対応しなくてもよいことを意味する。ＶＨドメインおよびＶＨＨドメインのアミノ酸残基の総数は、通常１１０～１２０の範囲内であり、１１２～１１５であることが多い。しかし、より小さく配列も長い配列も本明細書に記載の目的に適し得ることに留意すべきである。

【００９３】

抗体／免疫グロブリン配列中のＣＤＲ領域の決定は、一般に、適用されるアルゴリズム／方法論に依存する。例えば、ＣＤＲ領域の決定は、ＭａｃＣａｌｌｕｍら（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９６）２６２、７３２～７４５頁）、ＡｂＭ（ＡｂＭは、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｌｔｄ．の抗体モデリングパッケージであり、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｓ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌに記載されている）、Ｃｈｏｔｈｉａ（ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋ、１９８７；Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．１９６：９０１～１７頁）、Ｍａｒｔｉｎ（Ａｂｈｉｎａｎｄａｎ、およびＭａｒｔｉｎ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　４５（２００８）３８３２～３８３９頁；ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆ．ｏｒｇ．ｕｋ／ａｂｓ／ｉｎｆｏ．ｈｔｍｌに示されている）、Ｋａｂａｔ（Ｋａｂａｔら、１９９１；第５版、ＮＩＨ　ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　９１～３２４２頁）、またはＩＭＧＴ（ＬｅＦｒａｎｃ、２０１４；Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ．５（２２）：１～２２頁）に記載されている接触解析および結合部位トポグラフィーに従ってなされ得る。前記アノテーションは、免疫グロブリンドメイン含有タンパク質におけるＣＤＲおよびフレームワーク領域（ＦＲ）の描写をさらに含み、よって、過度の負担なく任意の抗体／免疫グロブリンタンパク質配列上にこれらのアノテーションを適用することができる当業者に公知の方法およびシステムである。例として、図２０は、ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３（配列番号８）のアミノ酸配列に適用された異なるアノテーションスキームまたは方法を例示する。

【００９４】

同じ抗体／免疫グロブリン配列に異なる方法を適用すると、異なるＣＤＲアミノ酸配列が生じる場合があり、その差異はＣＤＲ配列の長さおよび／または抗体／免疫グロブリン／ＩＶＤ配列内のＣＤＲ配列の描写に存在する場合がある（ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３につ

いて図２０に例示されているように）。したがって、本明細書に記載されているＩＳＶＤ結合剤、特に抗体および抗体断片のＣＤＲは、本明細書において特徴付けられるＩＳＶＤに存在するＣＤＲ配列として記載され得る。あるいは、これらのＣＤＲは、周知の方法論に従って、例えば、Ｋａｂａｔ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ａＨｏ、ＭａｃＣａｌｌｕｍら１９９６、ＡｂＭ、またはＩＭＧＴの番号付けスキームまたは方法のいずれか１つ、例えば、好ましくはＭａｒｔｉｎ番号付けスキームまたは方法に従って、決定または描写された（本明細書に記載されている）ＩＳＶＤ中に存在するＣＤＲ配列として記載することができる。

【００９５】

ＶＨＨまたはＮｂは、多くの場合、アミノ酸配列に従って異なるファミリーに分類されるか、またはさらにはスーパーファミリーに分類され、Ｂ細胞成熟の間に同じ前駆細胞に由来するクローン的に関連する配列をクラスター化する（Ｄｅｓｃｈａｇｈｔら．２０１７、Ｆｒｏｎｔ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　８：４２０頁）。この分類は、多くの場合、ＶＨＨまたはＮｂのＣＤＲ配列に基づいており、例えば、各ＶＨＨまたはＮｂファミリーは、ＣＤＲ３領域の配列同一性閾値を有する（クローン的に）関連する配列のクラスターとして定義される。本明細書で定義される単一のＶＨＨファミリー内では、ＣＤＲ３配列はこのように、アミノ酸組成において同一または非常に類似しており、好ましくはＣＤＲ３配列において少なくとも８０％の同一性、または少なくとも８５％の同一性、または少なくとも９０％の同一性を有し、その結果、同じ結合部位に結合し、機能的効果などの同じ効果を有する同じファミリーのＶＨＨまたはＮｂが得られる。

【００９６】

上記で概説したように、免疫グロブリンタンパク質配列中のアミノ酸を番号付けするための多くのシステムまたは方法（Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ）が存在し、これらのタンパク質配列中のＣＤＲおよびフレームワーク領域（ＦＲ）の描写を含む。これらのシステムまたは方法は、当業者に公知であり、よって、当業者は、過度の負担なしに、これらのシステムまたは方法を任意の免疫グロブリンタンパク質配列に適用することができる（ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３について図２０に例示されるように）。

【００９７】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号６３、４６、６９または７７のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ１を含むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号６４、４７、７０、７３または７８のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ２を含むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号４８、６７、７４または７９のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ３を含むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号６３、４６、６９または７７のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号６４、４７、７０、７３または７８のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号４８、６７、７４または７９のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ３を含むことを特徴とし得る。

【００９８】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、以下を含み得る：

－　配列番号６３によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号６４によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号６７によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または

－　配列番号６９によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号７０によって定

義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号６７によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号６３によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号６４によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号４８によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号４６によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号４７によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号４８によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号６３によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号７３によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号７４によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号７７によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号７８によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号７９によって定義される／に記載されるＣＤＲ３。
【００９９】

【表１－１】

表 1: ある特定の実施形態による VHH における CDR の配列

アノテーション方法	CDR1	CDR2	CDR3
AbM	GRXXSTXTMG 配列中、3 位の X は、P、I、A、L または V であり;4 位の X は、F、L、I または M であり; 7 位の X は、Y、F または W である(配列番号 63)	XXRWXXXTXX 配列中、1 位の X は、A、G、S または T であり; 2 位の X は、M、I、L または V であり; 5 位の X は、S、N、T、Q または G であり; 6 位の X は、G、A または P であり;7 位の X は、G または S であり; 9 位の X は、I、L、M、K、V または R であり; 10 位の X は、Y、W、N、S、F、Q または T である(配列番号 64)	AXVSKANYGXXWYXXXXXYD 配列中、2 位の X は、Y、W、R または K であり; 10 位の X は、S、N または T であり; 11 位の X は、L、I、S、N、F、M、V または T であり;14 位の X は、R、Q、K または N であり; 15 位の X は、A、G、N、S、T、D または E であり;16 位の X は、S、P、A、G または T であり; 17 位の X は、G、A、D、S、R、T、K、E であり; 18 位の X は、L、I、R、V、M または K である(配列番号 67)
Chothia	GRXXSTXTM 配列中、3 位の X は、P、I、A、L または V であり;4 位の X は、F、L、I または M であり; 7 位の X は、Y、F または W である(配列番号 69)	WXXX 配列中、2 位の X は、S、N、T、Q または G であり; 3 位の X は、G、A または P であり;4 位の X は、G または S である(配列番号 70)	AXVSKANYGXXWYXXXXXYD 配列中、2 位の X は、Y、W、R または K であり; 10 位の X は、S、N または T であり; 11 位の X は、L、I、S、N、F、M、V または T であり;14 位の X は、R、Q、K または N であり; 15 位の X は、A、G、N、S、T、D または E であり;16 位の X は、S、P、A、G または T であり; 17 位の X は、G、A、D、S、R、T、K、E であり; 18 位の X は、L、I、R、V、M または K である(配列番号 67)
Martin	GRXXSTXTMG 配列中、3 位の X は、P、I、A、L または V であり;4 位の X は、F、L、I または M であり; 7 位の X は、Y、F または W である(配列番号 63)	XXRWXXXTXX 配列中、1 位の X は、A、G、S または T であり; 2 位の X は、M、I、L または V であり; 5 位の X は、S、N、T、Q または G であり; 6 位の X は、G、A または P であり;7 位の X は、G または S であり; 9 位の X は、I、L、M、K、V または R であり; 10 位の X は、Y、W、N、S、F、Q または T である(配列番号 64)	AXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 配列中、2 位の X は、Y、W、R または K であり; 10 位の X は、S、N または T であり; 11 位の X は、L、I、S、N、F、M、V または T であり;14 位の X は、R、Q、K または N であり; 15 位の X は、A、G、N、S、T、D または E であり;16 位の X は、S、P、A、G または T であり; 17 位の X は、G、A、D、S、R、T、K、E であり; 18 位の X は、L、I、R、V、M または K である(配列番号 48)

【０１００】

【表１－２】

アノテーション方法	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	TXTMG 配列中、2 位のXは、YまたはFまたはWである(配列番号 46)	XXRWXXXTXXYXDSXKG 配列中、1 位の X は、A、G、S または T であり; 2 位の X は、M、I、L、または V であり; 5 位の X は、S、N、T、Q または G であり; 6 位の X は、G、A または P であり; 7 位の X は、G または S であり; 9 位の X は、I、L、M、K、V または R であり; 10 位の X は、Y、W、N、S、F、Q または T であり; 12 位の X は、A、G、S、N、T または V であり; 15 位の X は、V または M である(配列番号 47)	AXVSKANYGXXWYXXXXXXYDY 配列中、2 位の X は、Y、W、R または K であり; 10 位の X は、S、N または T であり; 11 位の X は、L、I、S、N、F、M、V または T であり; 14 位の X は、R、Q、K または N であり; 15 位の X は、A、G、N、S、T、D または E であり; 16 位の X は、S、P、A、G または T であり; 17 位の X は、G、A、D、S、R、T、K、E であり; 18 位の X は、L、I、R、V、M または K である(配列番号 48)
IMGT	GRXXSTXTMG 配列中、3 位の X は、P、I、A、L または V であり; 4 位の X は、F、L、I または M であり; 7 位の X は、Y、F または W である(配列番号 63)	XRWXXXTX 配列中、1 位の X は、M、I、L または V であり; 4 位の X は、S、N、T、Q または G であり; 5 位の X は、G、A または P であり; 6 位の X は、G または S であり; 8 位の X は、I、L、M、K、V または R である(配列番号 73)	XAAXVSKANYGXXWYXXXXXXYDY 配列中、1 位の X は、A、G、S、T、V または N であり; 4 位の X は、Y、W、R または K であり; 12 位の X は、S、N または T であり; 13 位の X は、L、I、S、N、F、M、V または T であり; 16 位の X は、R、Q、K または N であり; 17 位の X は、A、G、N、S、T、D または E であり; 18 位の X は、S、P、A、G または T であり; 19 位の X は、G、A、D、S、R、T、K、E であり; 20 位の X は、L、I、R、V、M または K である(配列番号 74)
MacCallum	STXTMG 配列中、3 位の X は、Y または F または W である(配列番号 77)	FVAXXRWXXXTXX 配列中、4 位の X は、A、G、S または T であり; 5 位の X は、M、I、L または V であり; 8 位の X は、S、N、T、Q または G であり; 9 位の X は、G、A または P であり; 10 位の X は、G または S であり; 12 位の X は、I、L、M、K、V または R であり; 13 位の X は、Y、W、N、S、F、Q または T である(配列番号 78)	XAAXVSKANYGXXWYXXXXXY 配列中、1 位の X は、A、G、S、T、V または N であり; 4 位の X は、Y、W、R または K であり; 12 位の X は、S、N または T であり; 13 位の X は、L、I、S、N、F、M、V または T であり; 16 位の X は、R、Q、K または N であり; 17 位の X は、A、G、N、S、T、D または E であり; 18 位の X は、S、P、A、G または T であり; 19 位の X は、G、A、D、S、R、T、K、E であり; 20 位の X は、L、I、R、V、M または K である(配列番号 79)

【０１０１】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号６５、７１、４９または８０のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ１を含むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号６６、７２、５０、７５または８１のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ２を含むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号５１、６８、７６または８２のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ３を含

むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号６５、７１、４９または８０のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号６６、７２、５０、７５または８１のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号５１、６８、７６または８２のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ３を含むことを特徴とし得る。

【０１０２】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、以下を含み得る：

－　配列番号６５によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号６６によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号６８によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または

－　配列番号７１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号７２によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号６８によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または

－　配列番号６５によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号６６によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号５１によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または

－　配列番号４９によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号５０によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号５１によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または

－　配列番号６５によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号７５によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号７６によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または

－　配列番号８０によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号８１によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号８２によって定義される／に記載されるＣＤＲ３。

【０１０３】

【表２－１】

表 2: 示されている様々なアノテーション方法論を用いることによる本明細書に記載されているある特定の実施形態の VHH における CDR の定義/配列の例

アノテーション方法	CDR1	CDR2	CDR3
AbM	GRXXSTXTMG 配列中、3 位の X は、P または I であり; 4 位の X は、F または L であり; 7 位の X は、Y または F である(配列番号 65)	XXRWXXXTXX 配列中、1 位の X は、A、G、S または T であり; 2 位の X は、M、I、L または V であり; 5 位の X は、S、N、T、Q または G であり; 6 位の X は、G、A または P であり; 7 位の X は、G または S であり; 9 位の X は、I、L、M、K、V または R であり; 10 位の X は、Y、W、N、S、F、Q または T である(配列番号 66)	AXVSKANYGXXWYXXXXXYD 配列中、2 位の X は、Y または R であり; 10 位の X は、S または T であり; 11 位の X は、L、S または F であり; 14 位の X は、R または Q であり; 15 位の X は、A、N、T または D であり; 16 位の X は、S または P であり; 17 位の X は、G、D、S または R であり; 18 位の X は、L または R である(配列番号 68)
Chothia	GRXXSTXTM 配列中、3 位の X は、P または I であり; 4 位の X は、F または L であり; 7 位の X は、Y または F である(配列番号 71)	WXXX 配列中、2 位の X は、S、N、T、Q または G であり; 3 位の X は、G、A または P であり; 4 位の X は、G または S である(配列番号 72)	AXVSKANYGXXWYXXXXXYD 配列中、2 位の X は、Y または R であり; 10 位の X は、S または T であり; 11 位の X は、L、S または F であり; 14 位の X は、R または Q であり; 15 位の X は、A、N、T または D であり; 16 位の X は、S または P であり; 17 位の X は、G、D、S または R であり; 18 位の X は、L または R である(配列番号 68)
Martin	GRXXSTXTMG 配列中、3 位の X は、P または I であり; 4 位の X は、F または L であり; 7 位の X は、Y または F である(配列番号 65)	XXRWXXGTXX 配列中、1 位の X は、A または S であり; 2 位の X は、M、I または V であり; 5 位の X は、S または N であり; 6 位の X は、G または A であり; 9 位の X は、I、M、K または V であり; 10 位の X は、Y または N である(配列番号 66)	AXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 配列中、2 位の X は、Y または R であり; 10 位の X は、S または T であり; 11 位の X は、L、S または F であり; 14 位の X は、R または Q であり; 15 位の X は、A、N、T または D であり; 16 位の X は、S または P であり; 17 位の X は、G、D、S または R であり; 18 位の X は、L または R である(配列番号 51)
Kabat	TXTMG 配列中、2 位の X は、Y または F である(配列番号 49)	XXRWXXGTXXYXDSXKG 配列中、1 位の X は、A または S であり; 2 位の X は、M、I または V であり; 5 位の X は、S または N であり; 6 位の X は、G または A であり; 9 位の X は、I、M、K または V であり; 10 位の X は、Y または N であり; 12 位の X は、A または S であり; 15 位の X は、V または M である(配列番号 50)	AXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 配列中、2 位の X は、Y または R であり; 10 位の X は、S または T であり; 11 位の X は、L、S または F であり; 14 位の X は、R または Q であり; 15 位の X は、A、N、T または D であり; 16 位の X は、S または P であり; 17 位の X は、G、D、S または R であり; 18 位の X は、L または R である(配列番号 51)

【０１０４】

【表２－２】

アノテーション方法	CDR1	CDR2	CDR3
IMGT	GRXXSTXTMG 配列中、3 位のXは、PまたはIであり;4 位のXは、FまたはLであり;7位のXは、YまたはF である(配列番号 65)	XRWXXGTX 配列中、1 位のXは、M、IまたはV であり;4 位のXは、SまたはNであり;5 位のXは、GまたはAであり;8 位のXは、I、M、Kまたは V である(配列番号 75)	XAAXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 配列中、1 位のXは、AまたはGであり;4 位のXは、YまたはRであり;12 位のXは、SまたはTであり;13 位のXは、L、SまたはFであり;16 位のXは、RまたはQであり;17 位のXは、A、N、TまたはDであり;18 位のXは、SまたはPであり;19 位のXは、G、D、SまたはRであり;20 位のXは、LまたはRである(配列番号 76)
MacCallum	STXTMG 配列中、3 位のXは、YまたはFである(配列番号 80)	FVAXXRWXXXTXX 配列中、4 位のXは、A、G、SまたはTであり;5 位のXは、M、I、LまたはVであり;8 位のXは、S、N、T、QまたはGであり;9 位のXは、G、AまたはPであり;10 位のXは、GまたはSであり;12 位のXは、I、L、M、K、VまたはRであり;13 位のXは、Y、W、N、S、F、QまたはTである(配列番号 81)	XAAXVSKANYGXXWYXXXXXY 配列中、1 位のXは、AまたはGであり;4 位のXは、YまたはRであり;12 位のXは、SまたはTであり;13 位のXは、L、SまたはFであり;16 位のXは、RまたはQであり;17 位のXは、A、N、TまたはDであり;18 位のXは、SまたはPであり;19 位のXは、G、D、SまたはRであり;20 位のXは、LまたはRである(配列番号 82)

【０１０５】

ある特定の好ましい実施形態では、本明細書に記載されている結合剤またはサルベコウイルス結合剤、特に抗体もしくは抗体断片またはサルベコウイルス抗体もしくは抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれかに存在するＣＤＲ１を含むことを特徴とし得、ここで、ＣＤＲ１は、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる。ある特定の好ましい実施形態では、本明細書に記載されている結合剤またはサルベコウイルス結合剤、特に抗体もしくは抗体断片またはサルベコウイルス抗体もしくは抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれかに存在するＣＤＲ２を含むことを特徴とし得、ここで、ＣＤＲ２は、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる。ある特定の好ましい実施形態では、本明細書に記載されている結合剤またはサルベコウイルス結合剤、特に抗体もしくは抗体断片またはサルベコウイルス抗体もしくは抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれかに存在するＣＤＲ３を含むことを特徴とし得、ここで、ＣＤＲ３は、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる。ある特定の好ましい実施形態では、本明細書に記載されている結合剤またはサルベコウイルス結合剤、特に抗体もしくは抗体断片またはサルベコウイルス抗体もしくは抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、それぞれ独立して配列番号１～１０のいずれかに存在するＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含むことを特徴とし得、ここで、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３は、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる。

【０１０６】

ある特定の好ましい実施形態では、本明細書に記載されている結合剤またはサルベコウイルス結合剤、特に抗体もしくは抗体断片またはサルベコウイルス抗体もしくは抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３の組合せを含むことを特徴とし得、ここで、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３は、配列番号１～１０に記載される配列のうちの特定の１つに存在し、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３は、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる。

【０１０７】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号５２、５３、５４、１１または１２のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ１を含むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号５５～６２または１３～２０のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ２を含むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号２１～２７のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ３を含むことを特徴とし得る。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号５２、５３、５４、１１または１２のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号５５～６２または１３～２０のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２１～２７のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ３を含むことを特徴とし得る。

【０１０８】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、以下を含み得る：

－　配列番号５２～５４のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号５５～６２のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号２１～２７のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または

－　配列番号１１または１２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号１３～２０のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号２１～２７のいずれか１つによって定義される／に記載されるＣＤＲ３。

【０１０９】

【表３】

表 3: 示されている様々なアノテーション方法論を用いることによる本明細書に記載されているある特定の実施形態の VHH における CDR、特に Kabat または Martin のシステムまたは方法に従って決定された VHH R3__C4、VHH R4__DC16、VHH R3__DC20、VHH R3__DC2、VHH R4__DC20、VHH R4__DC9、VHH R4__DC6、VHH R3__DC23、VHH R3__DC9、および VHH R4__DC13 のいずれかに含まれる CDR の定義/配列の例

アノテーション方法	CDR1	CDR2	CDR3
Martin	GRPFSTYTMG (配列番号 52)、GRIFSTYTMG (配列番号 53)または GRILSTFTMGW (配列番号 54)	AMRWSGGTIY (配列番号 55)、SMRWSGGTMY (配列番号 56)、SMRWSGGTKY (配列番号 57)、SMRWSGGTMN (配列番号 58)、SMRWSGGTVY (配列番号 59)、AIRWSGSTVY (配列番号 60)、AMRWNGGTKN (配列番号 61)または AVRWGAGTIY (配列番号 62)	AYVSKANYGSLWYRASGLYDY (配列番号 21)、AYVSKANYGSSWYRNSGLYDY (配列番号 22)、AYVSKANYGSLWYRNSGLYDY (配列番号 23)、AYVSKANYGSFWYRNSDLYDY (配列番号 24)、ARVSKANYGTLWYRASGLYDY (配列番号 25)、AYVSKANYGSLWYRTPSLYDY (配列番号 26)または AYVSKANYGSLWYQDSRRYDY (配列番号 27)
Kabat	TYTMG (配列番号 11)または TFTMG (配列番号 12)	AMRWSGGTIYYADSVKG (配列番号 13)、SMRWSGGTMYYSDSVKG (配列番号 14)、SMRWSGGTKYYSDSVKG (配列番号 15)、SMRWSGGTMNYADSVKG (配列番号 16)、SMRWSGGTVYYSDSVKG (配列番号 17)、AIRWSGSTVYYADSVKG (配列番号 18)、AMRWNGGTKNYADSVKG (配列番号 19)または AVRWGAGTIYYADSMKG (配列番号 20)	AYVSKANYGSLWYRASGLYDY (配列番号 21)、AYVSKANYGSSWYRNSGLYDY (配列番号 22)、AYVSKANYGSLWYRNSGLYDY (配列番号 23)、AYVSKANYGSFWYRNSDLYDY (配列番号 24)、ARVSKANYGTLWYRASGLYDY (配列番号 25)、AYVSKANYGSLWYRTPSLYDY (配列番号 26)または AYVSKANYGSLWYQDSRRYDY (配列番号 27)

【０１１０】

例えば、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在する相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むものとして定義することができ、ここでＣＤＲはＫａｂａｔに従って定義される。ある特定の実施形態では、結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、以下の３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）のセットのうちの１つを含む：

－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号１３によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号２１によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または

－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号１３によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２２によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号１３によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２３によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号１４によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２３によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号１２によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２３によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号１６によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号２３によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号１７によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２４によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；
－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号１８によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２５によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；
－　配列番号１２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号１９によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２６によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；
－　配列番号１１によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号２０によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２７によって定義される／に記載されるＣＤＲ３。

【０１１１】

特定の実施形態では、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在する相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むものとして定義することができ、ここでＣＤＲはＭａｒｔｉｎに従って定義される。ある特定の実施形態では、結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、以下の３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）のセットのうちの１つを含む：

－　配列番号５２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号５５によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号２１によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号５２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号５５によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２２によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号５２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号５５によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２３によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号５２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号５７によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２３によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号５２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号５８によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２３によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号５３によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号６０によって定

義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２５によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；または
－　配列番号５４によって定義される／に記載されるＣＤＲ１；配列番号６１によって定義される／に記載されるＣＤＲ２；および配列番号２６によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；
－　配列番号５３によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号６２によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２７によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；
－　配列番号５２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号５６によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２３によって定義される／に記載されるＣＤＲ３；
－　配列番号５２によって定義される／に記載されるＣＤＲ１、配列番号５９によって定義される／に記載されるＣＤＲ２、および配列番号２４によって定義される／に記載されるＣＤＲ３。

【０１１２】

さらなる実施形態では、本発明によるポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体および抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに含まれる１つまたは複数のフレームワーク領域（ＦＲ）、またはこのようなＦＲのバリアントを含み得る。より詳細には、このような結合剤、抗体もしくは抗体断片、またはＩＳＶＤは、それぞれ独立して、配列番号１～１０のいずれか１つに含まれるＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４領域のうちの少なくとも１つ、例えば１つ、２つ、３つ、またはすべて、またはこのようなＦＲのバリアントを含み得る。例えば、このような結合剤、抗体もしくは抗体断片、またはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに含まれるＦＲ１およびＦＲ２領域、ＦＲ１およびＦＲ３領域、ＦＲ１およびＦＲ４領域、ＦＲ２およびＦＲ３領域、ＦＲ２およびＦＲ４領域、ＦＲ３およびＦＲ４領域、ＦＲ１、ＦＲ２およびＦＲ３領域、ＦＲ１、ＦＲ２およびＦＲ４領域、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４領域、またはＦＲ１、ＦＲ３およびＦＲ４領域、またはこのようなＦＲのバリアントを含み得る。ある特定の好ましい実施形態では、このような結合剤、抗体もしくは抗体断片、またはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに含まれるＦＲ１領域もしくはＦＲ４領域もしくはＦＲ２およびＦＲ３領域、またはこのようなＦＲのバリアントを含む。これらのタンパク質配列におけるＦＲの描写には、本明細書の他の箇所に記載され、ＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３について図２０に例示され、かつ当業者に公知の、免疫グロブリンタンパク質配列におけるアミノ酸の番号付けのためのシステムまたは方法のいずれか１つが適用され得る。一例として、ＭａｒｔｉｎまたはＫａｂａｔの方法論を採用して本明細書に記載されているある特定の具体的なＶＨＨにおけるＦＲの配列が表４に示されている。

【０１１３】

【表４】

表 4: Kabat または Martin の方法論を用いることによる本明細書に記載されているある特定の実施形態の VHH における FR の配列の例

アノテーション方法	FR1	FR2	FR3	FR4
Kabat	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFS (配列番号 28)、QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFS (配列番号 29)、QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRIFS (配列番号 30)、QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRILS (配列番号 31)、QVQLQESGGGLVQAGDSLTLSCAVSGRIFS (配列番号 32)	WFRQAPGKEREFVA (配列番号 33)、WFRQAPGMEREFVA (配列番号 34)	RFTISRDNDKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 35)、RFTISRDNAQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 36)、RFTISRDNAQNTVNLQMNSLEPEDTAVYYCAA (配列番号 37)、RFTISRDNDKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 38)、RFSISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 39)、RFTISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 40)、RFTISRDNDKNTVNLQMNNLKPEDTAVYYCAA (配列番号 41)、RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 42)、RFTISRDNANSVVYLQMNSTKPEDTAVYYCAA (配列番号 43)、RFTISRDSAKNTVDLQMNSTKPEDTAVYYCGA (配列番号 44)	WGQGTQVTVSS (配列番号 45)
Martin	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVS (配列番号 97)、QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVS (配列番号 98)、QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS (配列番号 99)、QVQLQESGGGLVQAGDSLTLSCAVS (配列番号 100)	WFRQAPGKEREFVA (配列番号 33)、WFRQAPGMEREFVA (配列番号 34)	YADSVKGRFTISRDNDKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 101)、YADSVKGRFTISRDNAQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 102)、YADSVKGRFTISRDNAQNTVNLQMNSLEPEDTAVYYCAA (配列番号 103)、YSDSVKGRFTISRDNDKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 104)、YSDSVKGRFSISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 105)、YADSVKGRFTISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 106)、YSDSVKGRFTISRDNDKNTVNLQMNNLKPEDTAVYYCAA (配列番号 107)、YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA (配列番号 108)、YADSVKGRFTISRDNANSVVYLQMNSTKPEDTAVYYCAA (配列番号 109)、YADSMKGRFTISRDSAKNTVDLQMNSTKPEDTAVYYCGA (配列番号 110)	WGQGTQVTVSS (配列番号 45)

【０１１４】

本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するフレームワーク領域１（ＦＲ１）を含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲ１は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義されるか、あるいは配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ１と比較して、少なくとも９０％もしくは９５％同一であるか、または最大３個、例えば１個、２個もしくは３個のアミノ酸置換、欠失もしくは付加、例えば好ましくは保存的置換および／もしくはヒト化置換を有するバリアントＦＲ１を含むことを特徴とし得、ここで、

ＦＲ１は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義される。

【０１１５】

本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するフレームワーク領域２（ＦＲ２）を含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲ２は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義されるか、あるいは配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ２と比較して、少なくとも８５％もしくは９０％同一であるか、または最大２個、例えば１個もしくは２個のアミノ酸置換、欠失もしくは付加、例えば好ましくは保存的置換および／もしくはヒト化置換を有するバリアントＦＲ２を含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲ２は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義される。

【０１１６】

本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するフレームワーク領域３（ＦＲ３）を含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲ３は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義されるか、あるいは配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ３と比較して、少なくとも８０％、８５％、９０％もしくは９５％同一であるか、または最大９個、例えば１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個もしくは９個のアミノ酸置換、欠失もしくは付加、例えば好ましくは保存的置換および／もしくはヒト化置換を有するバリアントＦＲ３を含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲ３は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義される。

【０１１７】

本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するフレームワーク領域４（ＦＲ４）を含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲ４は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義されるか、あるいは配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ４と比較して、少なくとも９０％同一であるか、または最大１個のアミノ酸置換、欠失もしくは付加、例えば好ましくは保存的置換および／もしくはヒト化置換を有するバリアントＦＲ４を含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲ４は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義される。

【０１１８】

さらなる実施形態では、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、それぞれ独立して、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ１または本明細書の上記に定義されるバリアントＦＲ１；配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ２または本明細書の上記に定義されるバリアントＦＲ２；配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ３または本明細書の上記に定義されるバリアントＦＲ３；および配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ４または本明細書の上記に定義されるバリアントＦＲ４を含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義される。

【０１１９】

特定の実施形態では、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか

１つに存在するフレームワーク領域（ＦＲ）のうちの少なくとも１つ、または２つ、３つもしくはすべてのうちの特定の組合せ、あるいは前記ＦＲまたは本明細書の上記に定義されているＦＲのいずれかのバリアントを含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲは、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる。

【０１２０】

特定の実施形態では、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するフレームワーク領域（ＦＲ）のうちの少なくとも１つ、または２つ、３つもしくはすべてのうちの特定の組合せを含むことを特徴とし得、ここで、ＦＲは、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる。

【０１２１】

さらなる実施形態では、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、それぞれ独立して、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ１；配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ２；配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ３；および配列番号１～１０のいずれか１つに存在するＦＲ４を含むものとして定義することができ、ここで、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義される。

【０１２２】

さらなる実施形態では、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０に示される配列のいずれかの同じ配列中に存在するＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４を含むものとして定義することができ、ここで、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４は、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義される。

【０１２３】

なおさらに特定の実施形態では、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在する４つすべてのフレームワーク領域（ＦＲ）を含むものとして定義することができ、ここでＦＲは、ＡｂＭ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴまたはＭａｃＣａｌｌｕｍのいずれか１つに従って定義される。

【０１２４】

例えば、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するフレームワーク領域（ＦＲ）を含むものとして定義することができ、ここでＦＲは、Ｍａｒｔｉｎに従って定義される。ある特定の実施形態では、結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、フレームワーク領域（ＦＲ）の以下のセットのうちの１つを含む：

－　配列番号９７によって定義される／に記載されるＦＲ１；配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２；配列番号１０１によって定義される／に記載されるＦＲ３および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または

－　配列番号９７によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号１０２によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または

－　配列番号９７によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号１０３によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または

－　配列番号９８によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義

される／に記載されるＦＲ２、配列番号１０４によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号９８によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号１０５によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号９８によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号１０６によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号９８によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号１０７によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号９９によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３４によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号１０８によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号９９によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号１０９によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号１００によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２；配列番号１１０によって定義される／に記載されるＦＲ３；および配列番号２９によって定義される／に記載されるＦＲ４。

【０１２５】

例えば、本明細書に記載されているポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０のいずれか１つに存在するフレームワーク領域（ＦＲ）を含むものとして定義することができ、ここでＦＲは、Ｋａｂａｔに従って定義される。ある特定の実施形態では、結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、フレームワーク領域（ＦＲ）の以下のセットのうちの１つを含む：

－　配列番号２８によって定義される／に記載されるＦＲ１；配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２；配列番号３５によって定義される／に記載されるＦＲ３および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号２８によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号３６によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号２８によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号３７によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号２９によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号３８によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号２９によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号３９によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号２９によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号４０によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号２９によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号４１によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号３０によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３４によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号４２によって定義される／に記載されるＦＲ３、

および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号３１によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２、配列番号４３によって定義される／に記載されるＦＲ３、および配列番号４５によって定義される／に記載されるＦＲ４；または
－　配列番号３２によって定義される／に記載されるＦＲ１、配列番号３３によって定義される／に記載されるＦＲ２；配列番号４４によって定義される／に記載されるＦＲ３；および配列番号２９によって定義される／に記載されるＦＲ４。

【０１２６】

特定の実施形態では、ポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片は、個々に、配列番号１～１０のいずれか１つによって定義されるかもしくはそれに記載される１つもしくは複数のＩＳＶＤ、または配列番号１～１０の群から選択されるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなる１つもしくは複数のＩＳＶＤを含む。

【０１２７】

さらなる実施形態では、前記ポリペプチド性またはポリペプチド結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細にはＩＳＶＤは、配列番号１～１０の群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の同一性、または配列番号１～１０の群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９５％の同一性を有するアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。このような非同一性または可変性は、好ましくは、ＦＲアミノ酸残基における非同一性または可変性に限定される。特に、このような非同一性または可変性は、配列番号１～１０のいずれかによって定義されるかまたはそれに記載されるＩＳＶＤのヒト化バリアントを得るために導入され得る。特に、このようなヒト化バリアントは、元のＩＳＶＤの機能的オルソログであってもよく、ここで機能的特徴は、本明細書の上記に広範に概説した機能的特徴（１）～（４７）のうちの１つまたは複数である。

【０１２８】

「野生型」または「ネイティブ」という用語は、天然に存在する供給源から単離された遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団において最も頻繁に観察される、よって、遺伝子または遺伝子産物の「正常型」または「野生型」形態として任意に設計される遺伝子である。対照的に、「改変された」、「変異体」、「操作された」または「バリアント」という用語は、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した場合、配列における改変（例えば、置換、変異もしくはバリエーション、欠失または付加）、翻訳後修飾および／または生物学的もしくは機能的特性の改変（すなわち、特性の変化）を示す遺伝子または遺伝子産物を指す。天然に存在する変異体またはバリアントが単離され得ることに留意されたい；これらは、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した場合、変化した特徴を有するという事実によって同定される。変化した特徴は、配列レベルにのみ存在し得るか、または野生型遺伝子または遺伝子産物と比較して、変異体またはバリアントに生物学的特性および／または機能的特性の変化を付加的に与えることもできる。保存的アミノ酸置換は、タンパク質またはポリペプチドに導入することができ、それにより、このような置換はタンパク質の活性に本質的または実質的な影響を及ぼさないことが理解される。好ましい保存的置換は、参照により本明細書に組み込まれる、Ｄａｙｈｏｆｆら、Ａｔｌａｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ、５、３４５～３５２頁（１９７８年および補追）において許容された点突然変異について定義された基準を満たすものである。保存的置換の例は、以下の群を含むがこれらに限定されない置換である：（ａ）バリン、グリシン；（ｂ）グリシン、アラニン；（ｃ）バリン、イソロイシン、ロイシン；（ｄ）アスパラギン酸、グルタミン酸；（ｅ）アスパラギン、グルタミン；（ｆ）セリン、スレオニン；（ｇ）リジン、アルギニン、メチオニン；および（ｈ）フェニルアラニン、チロシン。目的のタンパク質の「ホモログ（複数可）」は、目的の未改変（例えば、ネイティブ、野生型）タンパク質に対するアミノ酸置換、欠失、および／または挿入を有し、それ（ら）が由来する未改変タンパク質と本質的または実質的に同様の生物学的および機能的活性を有するタンパク質を包含する。

【０１２９】

「配列同一性（の）パーセント」は、最適にアラインされた２つの（アミノ酸または核酸）配列を比較ウィンドウに対して比較し、両方の配列において同一のアミノ酸またはヌクレオチド残基が出現する位置の数を決定して一致した位置の数を得、一致した位置の数を比較ウィンドウにおける位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除算し、その結果に１００を乗じて（アミノ酸または核酸）配列同一性のパーセントを得ることによって計算される。

【０１３０】

ドメイン抗体およびＮａｎｏｂｏｄｙ（登録商標）（ＶＨＨドメインを含む）などの免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト化され、すなわち、最も近いヒト生殖系列配列との配列同一性の程度を増加させることができる。特に、Ｎａｎｏｂｏｄｙ（登録商標）（ＶＨＨドメインを含む）などのヒト化免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト化置換（本明細書でさらに定義される）であるおよび／またはそれに対応する少なくとも１つのアミノ酸残基（特に、少なくとも１つのフレームワーク残基）が存在する免疫グロブリン単一可変ドメインであり得る。潜在的に有用なヒト化置換は、天然に存在するＶＨＨ配列のフレームワーク領域の配列を、１つまたは複数の密接に関連するヒトＶＨ配列の対応するフレームワーク配列と比較することによって確認することができ、その後、このようにして決定された潜在的に有用なヒト化置換（またはその組合せ）のうちの１つまたは複数を、（本明細書にさらに記載されている、それ自体公知の任意の方法で）前記ＶＨＨ配列に導入することができ、得られたヒト化ＶＨＨ配列を、標的に対する親和性、安定性、発現の容易さおよびレベル、ならびに／または他の所望の特性について試験することができる。このようにして、限定された程度の試行錯誤によって、他の好適なヒト化置換（またはそれらの好適な組合せ）は当業者によって決定され得る。また、前述したことに基づいて、（ＶＨＨドメインを含む）Ｎａｎｏｂｏｄｙ（登録商標）などの免疫グロブリン単一可変ドメイン（のフレームワーク領域）は、部分的にヒト化されていても、完全にヒト化されていてもよい。

【０１３１】

ヒト化免疫グロブリン単一可変ドメイン、特にＮａｎｏｂｏｄｙ（登録商標）は、対応する天然に存在するＶＨＨドメインと比較して、免疫原性の低下などいくつかの利点を有する場合がある。ヒト化とは、ヒト患者における投与時の免疫原性がわずかであるか、または存在しないように変異させたことを意味する。ヒト化置換は、結果として生じるヒト化アミノ酸配列および／またはＩＳＶＤもしくはＶＨＨが、抗原結合能などの親（非ヒト化）ＶＨＨの好ましい特性を依然として保持するように選択されるべきである。本明細書において提供される説明に基づいて、当業者は、一方ではヒト化置換によって提供される好ましい特性と、他方では天然に存在するＶＨＨドメインの好ましい特性との間に、所望のまたは好適なバランスを最適化または達成するヒト化置換またはヒト化置換の好適な組合せを選択することができるであろう。このような方法は当業者に知られている。ヒトコンセンサス配列をヒト化の標的配列として使用することができるが、他の手段も当技術分野で知られている。１つの代替手段は、当業者が、例えば、これらに限定されないが、ＩＧＨＶ３対立遺伝子のアライメントなどのいくつかのヒト生殖系列対立遺伝子をアラインし、標的配列中のヒト化に適した残基の同定のために前記アライメントを使用する方法を含む。また、標的配列に対して最も相同の高いヒト生殖系列対立遺伝子のサブセットは、好適なヒト化残基を同定するための出発点としてアラインされてもよい。あるいは、ＶＨＨが解析され、ヒト対立遺伝子における最も近いホモログが同定され、ヒト化構築物の設計に使用される。ラクダ科のＶＨＨに適用されるヒト化技術は、特定のアミノ酸を単独または組み合わせて置き換えることを含む方法によって実施され得る。前記置き換えは、文献、既知のヒト化努力、および天然のＶＨＨ配列と比較したヒトのコンセンサス配列、または目的のＶＨＨ配列に最も類似したヒト対立遺伝子から知られているものに基づいて選択され得る。国際公開第０８／０２００７９号の表Ａ－５～Ａ－８に与えられるＶＨＨエントロピーおよびＶＨＨ変動性のデータからわかるように、フレームワーク領域におけるいくつかのアミノ酸残基は、ヒトとラクダ科の間で他のアミノ酸残基よりも保存されてい

る。一般に、広義の本発明はこれらに限定されないが、いかなる置換、欠失または挿入（または付加）も、好ましくは保存度の低い位置で行われる。また、一般に、アミノ酸置換は、アミノ酸の欠失または挿入よりも好ましい。例えば、ラクダ科の単一ドメイン抗体のヒト様分類は、ヒト由来または他の種由来の従来の抗体に典型的に見られる疎水性のＦＲ２残基を含有するが、二本鎖抗体のＶＨに存在する保存されたトリプトファン残基を置換する１０３位の他の置換によって、この親水性の損失を補う。このように、これら２つの分類に属するペプチドはヒトＶＨフレームワーク領域と高いアミノ酸配列相同性を示し、前記ペプチドは、それによる望ましくない免疫応答を予測することなく、かつさらなるヒト化を付加せず、ヒトに直接投与されてもよい。実際、ラクダ科のＶＨＨ配列の中には、ヒトＶＨフレームワーク領域と高い配列相同性を示すものがあり、したがって、前記ＶＨＨは、それによる免疫応答を期待することなく、かつヒト化の追加的な負担または必要なしに、患者に直接投与され得る。

【０１３２】

適切な変異、特に置換をヒト化中に導入して、既存の抗体（例えば、国際公開第２０１２／１７５７４１号および国際公開第２０１５／１７３３２５号を参照されたい）、例えば、１１、１３、１４、１５、４０、４１、４２、８２、８２ａ、８２ｂ、８３、８４、８５、８７、８８、８９、１０３、または１０８位のうちの少なくとも１つへの結合性が低下したポリペプチドを生成することができる。本発明のアミノ酸配列および／またはＶＨＨは、１つまたは複数のホールマーク残基（以下に定義される）、または１つもしくは複数の他のフレームワーク残基（すなわち、非ホールマーク残基）、またはそれらの任意の好適な組合せなどの任意のフレームワーク残基で好適にヒト化され得る。本明細書に記載されているアミノ酸配列、ＩＳＶＤもしくはＶＨＨまたはポリペプチドを発現するために使用される宿主生物に依存して、このような欠失および／または置換はまた、当業者の能力の範囲内であるように、翻訳後修飾のための１つまたは複数の部位（例えば、１つまたは複数のグリコシル化部位）が除去されるように設計され得る。あるいは、置換または挿入は、例えば部位特異的ペグ化を可能にするように、官能基（本明細書に記載される）の付着のための１つまたは複数の部位を導入するように設計され得る。

【０１３３】

場合によっては、３７、４４、４５および／または４７位の親水性を有する典型的なラクダ科のホールマーク残基のうちの少なくとも１つが置き換えられる（国際公開第２００８／０２００７９号の表Ａ－０３を参照されたい）。ヒト化の別の例は、１、５、１１、１４、１６、および／または２８位などのＦＲ１；７３、７４、７５、７６、７８、７９、８２ｂ、８３、８４、９３および／または９４位などのＦＲ３；ならびに１０、１０３、１０４、１０８、および／または１１１位などのＦＲ４における残基の置換を含む（国際公開第２００８／０２００７９号の表Ａ－０５～Ａ０８を参照されたい；すべてＫａｂａｔ方法論に従った番号付け）。特定の実施形態では、ヒト化抗体、特にヒト化ＩＳＶＤは、Ｋａｂａｔ番号付けに従って、１、５、１４、１６、１９、６３、７３、７９、８２ｃ、８３、および／または、好ましくは１０８位の残基の置換を含む。他の特定の実施形態では、ヒト化抗体、特にヒト化ＩＳＶＤは、Ｋａｂａｔ番号付けに従って、１、５、１４、１６、１９、６３、７３、７９、８３、および／または、好ましくは１０８位の残基の置換を含む。ヒト化は、典型的には、標的に対する結合親和性および／または効力に影響を与えることができる／与えることになるため、ＦＲの置換、欠失または付加にのみ関係し、ＣＤＲには関係しない。

【０１３４】

本明細書に記載のヒト化ＩＳＶＤの特定の非限定的な例は、以下を含む：

【０１３５】

ヒト化Ｒ３＿ＤＣ２３：

【化１２】

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWGAGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWYQDSRRYDYWGQGTLVTVSS
(　配列番号 127)

【０１３６】
ヒト化Ｒ３＿Ｃ４：
【化１３】

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRASGLYDYWGQGTLVTVSS
(　配列番号 128)

【０１３７】
ヒト化Ｒ４＿ＤＣ２０：
【化１４】

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASIRWSGGTTNYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRNSGLYDYWGQGTLVTVSS
(　配列番号 129)

【０１３８】
ある特定の実施形態では、抗体は、本明細書に記載されている１つまたは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されているそのバリアントもしくはヒト化形態）を含み、１つまたは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されているそのバリアントもしくはヒト化形態）は、Ｆｃドメインに結合または融合されている。
【０１３９】
「Ｆｃドメイン」とは、本明細書で使用される場合、従来の抗体の断片結晶化可能領域（Ｆｃ領域）を指し、Ｆｃ受容体と呼ばれる細胞表面受容体および補体系の一部のタンパク質と相互作用することが知られているテール領域である。前記Ｆｃドメインは、抗体の２つの重鎖の第２および第３の定常ドメインに由来する２つの同一のタンパク質断片から構成される。すべての従来の抗体はＦｃドメインを含み、したがって、Ｆｃドメインは、ＩｇＧ、ＩｇＡおよびＩｇＤ抗体のＦｃ領域に由来するかまたはそのバリアントであってもよく、さらにより詳細にはＩｇＧ１、ＩｇＧ２またはＩｇＧ４抗体のＦｃ領域に由来するＦｃドメインであってもよい。例えば、ＩｇＧ２のヒンジ領域は、ヒトＩｇＧ１のヒンジで置き換えられて、ＩＳＶＤ融合構築物を生じ得、その逆も同様である。さらに、Ｍ２５７Ｙ／Ｓ２５９Ｔ／Ｔ２６１Ｅ（ＹＴＥとしても知られる）またはＬＳバリアント（Ｎ４３４Ｓと組み合わせたＭ４２８Ｌ）などの半減期延長が知られているＦｃバリアントが使用されてもよい。これらの変異は、新生児受容体（ＦｃＲｎ）に対する従来の抗体のＦｃドメインへの結合を増加させる。好ましくは、ヒトＦｃドメインまたはヒト化Ｆｃドメインが使用されてもよい。ヒト化形態は、ＩｇＧ配列における他の置換の中でも、リジンのＣ末端欠失、ヒンジ領域における変更または切断、ＬＡＬＡ（Ｌ２３４ＡおよびＬ２３５Ａ）またはＬＡＬＡＰＧ（Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、およびＰ３２９Ｇ）変異などの当技術分野で公知のＩｇＧヒト化バリアントを含むが、これらに限定されない。
【０１４０】
「に融合した」という用語は、「に接続された」、「にコンジュゲートされた」、「にライゲーションされた」と互換的に本明細書で使用される場合、一態様では、例えば組換えＤＮＡ技術による「遺伝的融合」、および２つの核酸分子間に安定な共有結合による連結をもたらす「化学的および／または酵素的コンジュゲーション」を指す。「に挿入され

る」という用語も同様であり、２つの配列を遺伝的、酵素的または化学的に融合またはライゲーションすることによって、１つの核酸の断片が第２の核酸分子に挿入され得る。ペプチドまたはポリペプチドも同様に、ペプチド結合を介して、または一方のペプチドを第２のペプチドにおけるアミノ酸の側鎖に連結することによって、互いに融合または接続させることができる。

【０１４１】

リンカーは、本明細書で同定されるＩＳＶＤ（または本明細書に記載されているそのバリアントもしくはヒト化形態）などのＩＳＶＤを、ヒトＩｇＧ１　ＦｃドメインもしくはそのＬＳバリアント、またはそのＹＴＥバリアント、またはＩｇＧ２　ＦｃドメインなどのＦｃドメインに融合させるために使用され得る。リンカーの非限定的な例は、ｎ＝１～６（配列番号１２０）、好ましくは２～３（配列番号１２１～１２２）を有する（G_4S）$_n$などのＧｌｙ－Ｓｅｒリンカーを含む。

【０１４２】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている１つまたは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されているそのバリアントもしくはヒト化形態）を含む抗体は、２つ以上の同一またはバリアント一価ＩＳＶＤ（または本明細書に記載されているそのバリアントもしくはヒト化形態）を一緒に、例えば化学的または組換えＤＮＡ技術によって結合させることによって形成される「多価」および／または「多特異性」形態である。

【０１４３】

多価構築物の非限定的な例は、「２価」構築物、「３価」構築物、「４価」構築物などを含み、それぞれ２つ、３つ、または４つのＩＳＶＤを含む。多価構築物内に含まれるＩＳＶＤは、同一であっても異なっていてもよい。「多特異性抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、特に、２つ以上のＩＳＶＤの少なくとも１つが異なる特異性を有する多価抗体を指す。多特異性構築物の非限定的な例は、「二特異性」構築物、「三特異性」構築物、「四特異性」構築物などを含む。これをさらに例証するために、本発明の任意の多価および多特異的（本明細書で定義される）抗体は、２つ以上の異なる抗原、例えば、サルベコウイルス、および血清アルブミンまたはブドウ球菌タンパク質Ａ（ＳｐＡ）に対する半減期延長としてのもの、および／または特定の抗原の２つ以上の異なる部分、例えば、サルベコウイルススパイクタンパク質の２つ以上の異なる部分、領域、サブユニットまたはドメインを対象とし得る。

【０１４４】

特定の実施形態では、抗体、特に多価および／または多特異性の抗体は、本明細書に記載されているＩＳＶＤ（複数可）などの１つまたは複数の結合剤（または本明細書に記載されているそのバリアントまたはヒト化形態）、およびサルベコウイルススパイクタンパク質受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に結合可能なＩＳＶＤ（複数可）などの１つまたは複数の結合剤を含み得る。サルベコウイルススパイクタンパク質受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に結合可能なＩＳＶＤの非限定的な例は、ＰＣＴ／ＥＰ２０２１／０５２８８５、ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０５２９１９およびＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０６２９８０に記載されている。有利なことに、多価および／または多特異性の抗体において、スパイクタンパク質、特にＳ２サブユニット、より詳細にはＨＲ２ドメイン、およびＲＢＤの２つの異なる領域での相互作用を介してサルベコウイルススパイクタンパク質と結合することが可能な少なくとも２つのＩＳＶＤの組合せは、交差反応性およびサルベコウイルスによる感染の強力な阻止をもたらす場合があり、さらに変異ウイルスの出現を免れるリスクの低減を可能にする場合がある。

【０１４５】

ある特定のさらなる実施形態では、サルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合することが可能な１つまたは複数のＩＳＶＤは、ＶＨＨ７２エピトープ（またはＶＨＨ７２による特異的結合を受けるエピトープ）に結合するか、またはそれをめぐって競合することが可能である。ＶＨＨ７２エピトープは、Ｗｒａｐｐら（２０２０、Ｃｅｌｌ　１８４：１００４～１０１５頁；ＰＣＴ／ＥＰ２０２１／０５２８８５およびＰＣＴ／ＥＰ２

０２２／０６２９８０）に記載されている。本明細書において定義されるＶＨＨ７２エピトープは、配列番号８６に記載されるアミノ酸残基Ｓ３７１、Ｓ３７５、Ｔ３７６、またはＣ３７９のうちの少なくとも１つ以上、またはさらにより詳細には、ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２スパイクタンパク質の配列である配列番号８６に記載されるＬ３６８、Ｙ３６９、Ｓ３７１、Ｓ３７５、Ｔ３７６、Ｆ３７７、Ｋ３７８、Ｃ３７９およびＹ５０８のうちの少なくとも１つ以上を含むＲＢＤの構造エピトープを指す。特に、ＶＨＨ７２エピトープに結合可能なＩＳＶＤは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（配列番号８６）に、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１個、または配列番号８６に示されているＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｌ３６８、Ｙ３６９、Ｓ３７１、Ｓ３７５、Ｔ３７６、Ｆ３７７、Ｋ３７８、Ｃ３７９およびＹ５０８のすべてに特異的に結合することが可能であり得る。ＶＨＨ７２エピトープをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤは、配列番号８６に示されているスパイクタンパク質、またはＲＢＤへの結合に対してＶＨＨ７２と競合するＩＳＶＤを指す。「競合する」とは、ＶＨＨ７２エピトープをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤの存在下で、配列番号８６に示されているスパイクタンパク質、またはＲＢＤへのＶＨＨ７２の結合が、少なくとも３０％、または少なくとも５０％、好ましくは少なくとも８０％の強度で低下することを意味する。特に、ＶＨＨ７２エピトープをめぐって競合することが可能な、またはＲＢＤエピトープへのＶＨＨ７２結合と競合することが可能なＩＳＶＤは、配列番号８６に示されているＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２のスパイクタンパク質の残基Ｌ３６８、Ｙ３６９、Ｓ３７１、Ｓ３７５、Ｔ３７６、Ｆ３７７、Ｋ３７８、Ｃ３７９およびＹ５０８のうちの少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ以上を含むスパイクタンパク質上のエピトープに特異的に結合することが可能であり得、重複エピトープを提供する。実施形態では、ＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤは、（ｉ）ＲＢＤへの相互作用時にヒト受容体（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１および－２の場合、ＡＣＥ－２）結合をめぐって競合する、および／または（ｉｉ）本明細書において定義されるＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれと競合することが可能なＩＳＶＤと競合しないことを特徴とし得る。ＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤの非限定的な例は、ＰＣＴ／ＥＰ２０２１／０５２８８５およびＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０６２９８０に記載されている、ＶＨＨ７２ファミリーメンバー（ＶＨＨ７２（配列番号１２４）、ＶＨＨ２．５０、ＶＨＨ３．１７、ＶＨＨ３．７７、ＶＨＨ３．１１５、ＶＨＨ３．１４４およびＶＨＨＢＥ４を含む）、ならびにＶＨＨ７２（Ｓ５６Ａ）を含むバリアントおよびそのヒト化形態；ＶＨＨ３．８３ファミリーメンバー（ＶＨＨ３．８３（本明細書においてＶＨＨ８３とも呼ばれる）（配列番号１２５）を含む）ならびにそのバリアントおよびヒト化形態；ＶＨＨ３．３８ファミリーメンバーならびにそのバリアントおよびヒト化形態；ＶＨＨ３．５５ファミリーメンバーならびにそのバリアントおよびヒト化形態；ＶＨＨ３．３６ファミリーメンバーならびにそのバリアントおよびヒト化形態；ＶＨＨ３．１４９ファミリーメンバーならびにそのバリアントおよびヒト化形態；ならびにＶＨＨ３．２９ファミリーメンバーならびにそのバリアントおよびヒト化形態を含む。

【０１４６】

特定の実施形態では、抗体、特に多価抗体および／または多重特異性抗体は、本明細書に記載される１つまたは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）、ならびに配列番号１２５もしくは配列番号１２４に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、例えば配列番号１２５（例えばＶＨＨ８３）もしくは配列番号１２４（例えば、ＶＨＨ７２）に記載される配列を含むかもしくはそれからなるＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態を含んでもよく、ここで、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ、Ｍａｒｔｉｎ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、またはＣｈｏｔｈｉａに従ってアノテーションされる。

【０１４７】

ある特定のさらなる実施形態では、サルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合することが可能な１つまたは複数のＩＳＶＤは、ＶＨＨ３．１１７エピトープ（またはＶＨＨ３．１１７による特異的結合を受けるエピトープ）に結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能である。ＶＨＨ３．１１７エピトープは、ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０５２９１９に記載されている。特に、ＶＨＨ３．１１７エピトープに結合することが可能なＩＳＶＤは、配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ａｓｎ３９４（または一部のサルベコウイルスでは代替的にＳｅｒ３９４）、Ｔｙｒ３９６、Ｐｈｅ４６４、Ｓｅｒ５１４、Ｇｌｕ５１６、およびＡｒｇ３５５のうち少なくとも１つ、または優先順位の高くなる順に少なくとも２つ、少なくとも３つ、または少なくとも４つに結合または特異的に結合することが可能であり得：任意に、アミノ酸Ａｒｇ３５７（または一部のサルベコウイルスでは代替的にＬｙｓ３５７）および／またはＬｙｓ４６２（または一部のサルベコウイルスでは代替的にＡｒｇ４６２）および／またはＧｌｕ４６５（または一部のサルベコウイルスでは代替的にＧｌｙ４６５）および／またはＡｒｇ４６６および／またはＬｅｕ５１８とさらに結合または特異的に結合することが可能であり、例えば、アミノ酸Ａｒｇ３５７（または一部のサルベコウイルスでは代替的にＬｙｓ３５７）および／またはＬｙｓ４６２（または一部のサルベコウイルスでは代替的にＡｒｇ４６２）および／またはＧｌｕ４６５（または一部のサルベコウイルスでは代替的にＧｌｙ４６５）および／またはＡｒｇ４６６および／またはＬｅｕ５１８の少なくとも２つ、または優先順位の高くなる順に少なくとも３つもしくは４つすべてにさらに結合または特異的に結合することが可能であり得る。ＶＨＨ３．１１７エピトープをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤは、配列番号８６に示されているスパイクタンパク質、またはＲＢＤへの結合をめぐってＶＨＨ３．１１７と競合するＩＳＶＤを指す。「競合する」とは、ＶＨＨ３．１１７エピトープをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤの存在下で、配列番号８６に示されているスパイクタンパク質へのＶＨＨ３．１１７の結合が、少なくとも３０％、または少なくとも５０％、または好ましくは少なくとも８０％の強度で低下することを意味する。実施形態では、ＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤは、（ｉ）ＲＢＤとヒト受容体（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１および－２の場合はＡＣＥ－２）との結合を阻害しない、すなわち、ＩＳＶＤ自体がサルベコウイルスＲＢＤに結合している場合に、受容体とサルベコウイルスＲＢＤとの結合を可能にすること、もしくは代替的に、ＩＳＶＤ自体が、受容体が結合しているサルベコウイルスＲＢＤに結合できることを意味し、ならびに／または（ｉｉ）本明細書において定義されるＶＨＨ７２エピトープに結合するかもしくはそれをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤと競合しないことを特徴とし得る。ＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能なＩＳＶＤの非限定的な例としては、ＶＨＨ３．１１７ファミリーメンバー（ＶＨＨ３．１１７、３．４２、３．９２、３．９４、３．１８０を含む）ならびにそのバリアントおよびヒト化形態（ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０５２９１９に記載されている）；ＶＨＨ３．８９ファミリーメンバーならびにそのバリアントおよびヒト化形態（ＰＣＴ／ＥＰ２０２１／０５２８８５に記載されている）；ＶＨＨ３＿１８３ファミリーメンバーならびにそのバリアントおよびヒト化形態；ならびにＶＨＨ３Ｃ＿８０ファミリーメンバーならびにそのバリアントおよびヒト化形態（ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０６２９８０に記載されている）が挙げられる。

【０１４８】

特定の実施形態では、抗体、特に多価抗体および／または多重特異性抗体は、本明細書に記載される１つまたは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）、ならびに配列番号１２７に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、例えば配列番号１２７（例えば、ＶＨＨ３．１１７）に記載される配列を含むかもしくはそれからなるＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態を含んでもよく、ここで、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ、Ｍａｒｔｉｎ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、またはＣｈｏｔｈｉａに従ってアノテーションされる。

【０１４９】

さらに他のさらなる実施形態では、抗体、特に多価抗体および／または多重特異性抗体は、サルベコウイルススパイクタンパク質受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に結合可能な２つ以上のＩＳＶＤを含み、ここで、少なくとも１つのＩＳＶＤは、本明細書において定義されるＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能であり、および少なくとも１つのＩＳＶＤは、本明細書において定義されるＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能である。有利には、抗体中の少なくとも２つの非競合性ＲＢＤを標的とするＩＳＶＤ（ＲＢＤの２つの競合しない異なる領域での相互作用によってスパイクタンパク質のＲＢＤに結合することが可能である）および少なくとも１つのＳ２を標的とするＩＳＶＤの組合せは、交差反応性およびサルベコウイルスによる感染の強力な阻害をもたらし、有利には、変異逃避に対するリスクをさらに低減可能にする。

【０１５０】

特定の実施形態では、抗体、特に多価抗体および／または多重特異性抗体は、本明細書に記載される１つまたは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）、配列番号１２５または配列番号１２４に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、例えば配列番号１２５（例えばＶＨＨ８３）または配列番号１２４（例えば、ＶＨＨ７２）に記載される配列、またはそのバリアントもしくはヒト化形態を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤ、および配列番号１２６に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、例えば、配列番号１２６（例えば、ＶＨＨ３．１１７）に記載される配列、またはそのバリアントもしくはヒト化形態を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤを含んでもよく、ここで、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ、Ｍａｒｔｉｎ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、またはＣｈｏｔｈｉａに従ってアノテーションされる。

【０１５１】

本明細書に記載される多価抗体は、例えば、化学的に、もしくは組換えＤＮＡ技術によって、２つ以上のＩＳＶＤを直接的に、もしくはリンカーを介して接続させることによって、および／または２つ以上のＩＳＶＤ（のそれぞれ）をＦｃドメインと融合させることによって形成され得る。

【０１５２】

例えば、本明細書に記載される単一のＩＳＶＤ（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）は、例えば、配列番号９６または配列番号１１８において定義されるアミノ酸配列を含む構築物などの、ＩｇＧ　ＦｃドメインなどのＦｃドメインにそのＣ末端で融合させてもよく、その結果、前記ＩＳＶＤのうちの２つが、ＩｇＧ　Ｆｃ部分などのＦｃ部分のヒンジ領域においてジスルフィド架橋を介して重鎖のみの抗体型分子を形成する、二価形式のサルベコウイルス抗体が得られる。

【０１５３】

特定の実施形態では、本明細書に記載される１つまたは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）は、本明細書において定義されるサルベコウイルススパイクタンパク質に結合可能な１つまたは複数のＩＳＶＤに直接的に、またはリンカーを介して連結、融合または接続される。ＩＳＶＤに連結するための好適なリンカーの非限定的な例としては、$(G_4S)_n$などのペプチドリンカーが挙げられ、ここで、ｎ＝１、２、３、４、５または６である。このような多重特異性結合剤は、本明細書では「ヘッドトゥーテール融合」とも呼ばれ得る。

【０１５４】

さらなる実施形態では、本明細書に記載されるヘッドトゥーテール融合のＣ末端は、例えばリンカーによって、Ｆｃドメインに融合され得、この構築物は、宿主における発現時に、Ｆｃ部分のヒンジ領域におけるジスルフィド架橋を介して多価抗体および／または多重特異性抗体を形成する。したがって、特定の実施形態では、本明細書に記載される１つまたは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）が、多重特異性結合剤または構築物を形成するために、サルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合可能な１つまたは複数のＩＳＶＤに直接的に、またはリンカーを介し

て連結、融合または接続され、前記多重特異性結合剤または構築物はＦｃドメインに融合される。好ましい実施形態では、抗体は、Ｆｃドメインに融合された二重特異性結合剤または構築物を含み、前記二重特異性結合剤または構築物は、サルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合することが可能な１つのＩＳＶＤ、例えば、本明細書に記載されるＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれと競合することが可能なＩＳＶＤに直接的に、またはリンカーを介して連結、融合または接続された、本明細書に記載される１つのＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）を含む。本明細書において「ＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃ融合体」とも呼ばれる、このような多重特異性抗体、特に二重特異性抗体の概略図は図３３Ａ～Ｃに示されている。本明細書に記載されるＨＲ２結合部位とＶＨＨ３．１１７エピトープに結合することが可能な、このような多重特異性抗体、特に二重特異性抗体のより具体的な例は、例えば配列番号１１２～１１４、またはその機能的バリアント、またはその少なくとも９０％の同一性を有するバリアント、またはそのヒト化形態に提供されるが、これらに限定されない。配列番号１１２～１１４により定義される配列も以下に示されている。

【化１５】

配列番号 112

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWGAGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWYQDSRRYDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTN
YADSVKGRFTISRDNTKNTVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

配列番号 113

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWGAGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWYQDSRRYDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELV
ATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

配列番号 114

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWGAGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWYQDSRRYDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKAVSISDMGWYR
QPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLG
PDYYGLELWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

【０１５５】

特定の実施形態では、抗体は、Ｆｃドメインに融合した三重特異性結合剤または構築物を含み、前記三重特異性結合剤または構築物は、本明細書に記載される１つのＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）、本明細書に記載されるＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するか、またはそれと競合することが可能な１つのＩＳＶＤ、および本明細書に記載されるＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれと競合することが可能な１つのＩＳＶＤを含み、前記ＩＳＶＤは、任意の順序で、互いに直接的に、またはリンカーを介して連結、融合または接続される。このような多重特異性抗体、特に、本明細書では「ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃ融合体」とも呼ばれる三重特異性抗体の概略図は図３３Ｆに示されている。本明細書に記載されるＨＲ２結合部位ならびにＶＨＨ３．１１７エピトープおよびＶＨＨ７２エピトープに結合することが可能な、こ

のような多重特異性抗体、特に三重特異性抗体のより具体的な例は、例えば配列番号１１７、またはその機能的バリアント、またはその少なくとも９０％の同一性を有するバリアント、またはそのヒト化形態で提供されるが、これらに限定されない。配列番号１１７により定義される配列も以下に示されている。

【化１６】

配列番号 117

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWGAGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWYQDSRRYDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELV
ATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCVLSGGVFTSYAMGWF
RQAPGKEREFLAAITFNSDATYYADSVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLRPEDTAVYSCAAGGNHY
NPQYYHDYDKYDHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKS
LSLSPG

【０１５６】

他の特定の実施形態では、本明細書に記載される１つもしくは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）はＦｃドメインのＮ末端に融合され、サルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合可能な１つもしくは複数のＩＳＶＤは該ＦｃドメインのＣ末端に融合されるか、または本明細書に記載の１つもしくは複数のＩＳＶＤ（または本明細書に記載のそのバリアントもしくはヒト化形態）はＦｃドメインのＣ末端に融合され、かつサルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合可能な１つもしくは複数のＩＳＶＤは該ＦｃドメインのＮ末端に融合される。好ましい実施形態では、抗体は、ＦｃドメインのＮ末端に融合した本明細書に記載される１つのＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）、およびサルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合可能な１つのＩＳＶＤ、特に該ＦｃドメインのＣ末端に融合した本明細書に記載されるＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかもしくはそれと競合することが可能な１つのＩＳＶＤを含むか、または該ＦｃドメインのＣ末端に融合した本明細書に記載される１つのＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）、およびサルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合可能な１つのＩＳＶＤを含み、特にＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれと競合することが可能な１つのＩＳＶＤは、該ＦｃドメインのＮ末端に融合される。本明細書において「ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ融合体」または「ムーンランダー」とも呼ばれるこのような三重特異性抗体の概略図は図３３Ｄに示されている。本明細書に記載されるＨＲ２結合部位およびＶＨＨ３．１１７エピトープに結合可能なこのような多重特異性抗体、特に二重特異性抗体のより具体的な例は、例えば配列番号１１５、またはその機能的バリアント、またはその少なくとも９０％の同一性を有するバリアント、またはそのヒト化形態で提供されるが、これらに限定されない。配列番号１１５により定義される配列も以下に示されている。

【化１７】

配列番号 115

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWGAGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWYQDSRRYDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPG
GSLRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLE
MNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVSS

【０１５７】

本明細書に記載される多価抗体または多重特異性抗体は、所望のサルベコウイルス相互作用、ならびに／またはこのような多価抗体および／もしくは多特異的抗体の使用によって得られ得る任意の他の所望の特性もしくは所望の特性の組合せに対する増加したアビディティおよび／または改善された選択性を有し得る（またはそれに対して操作および／もしくは選択され得る）。

【０１５８】

特定の実施形態では、本明細書に記載される結合剤、特に多価抗体および／または多重特異性抗体、より詳細には本明細書に記載されるＦｃドメインを含む多価抗体および／または多重特異性抗体は、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性を有する。より詳細には、本明細書に記載される結合剤、特に多価抗体および／または多重特異性抗体、より詳細には本明細書に記載されるＦｃドメインを含む多価抗体および／または多重特異性抗体は、サルベコウイルススパイクタンパク質を発現する標的細胞に対してＡＤＣＣを誘導することが可能である。「抗体依存性細胞傷害」または「ＡＤＣＣ」は、抗体がある特定の細胞傷害性細胞（例えば、ＮＫ細胞、好中球、およびマクロファージ）に結合する細胞傷害性の一形態を指す。Ｆｃγ受容体上にＩｇが分泌されることは、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を有する標的細胞に特異的に結合し、例えば細胞毒素を使用して標的細胞を死滅させることを可能にする。目的の抗体のＡＤＣＣ活性を評価するために、ｉｎｖｉｔｒｏではＡＤＣＣアッセイ、例えば、本出願の実施例に記載された方法が実施され得る。

【０１５９】

また、本明細書に開示されるのは、サルベコウイルススパイクタンパク質またはその一部（上記のような）に結合するための、配列番号１～１０の群から選択されるアミノ酸配列によって定義されるＩＳＶＤと競合する他のサルベコウイルス結合剤である。

【０１６０】

「競合する」または「交差競合する」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原の特定領域に結合する能力を共有し、別の結合剤の結合を阻害または遮断する化合物または結合剤を指す。本開示において、「競合的」または「交差競合的」である化合物または結合剤は、当業者に公知の競合的結合アッセイにおいて、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片、特に配列番号１～１０からなる群から選択されるアミノ酸配列によって定義されるＩＳＶＤの結合を妨害する能力を有する。この用語はまた、両方の方向における、２つの抗体または抗原結合断片間の競合、すなわち、第２の抗体に結合する第１の抗体と第２の抗体の結合を遮断する第１の抗体、およびその逆も含む。ある特定の実施態では、第１の抗原結合剤（例えば、抗体または抗原結合断片）および第２の抗原結合剤（例えば、抗体または抗原結合断片）は同じエピトープに結合する場合がある。あるいは、第１および第２の抗原結合剤（例えば、抗体または抗原結合断片）は、異なるが、例えば、

重複するエピトープに結合してもよく、一方の結合は、例えば、立体障害を介して、第２の抗体または抗原結合断片の結合を阻害または遮断する。抗原結合剤（例えば、抗体または抗原結合断片）間の競合は、例えば、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着アッセイ）または表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって、当技術分野で公知の方法で測定され得る。配列番号１～１０の群から選択されるアミノ酸配列によって定義されるＩＳＶＤの、配列番号８６に記載されるアミノ酸配列からなるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質、もしくは配列番号１１１に記載されるアミノ酸配列からなるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質、またはその一部、特に、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニットもしくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　Ｓ２サブユニット、またはその一部、より詳細には、配列番号８７に示されているＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１／－２　ＨＲ２ドメインへの結合が、競合結合剤の存在下で少なくとも３０％、または少なくとも５０％、または好ましくは少なくとも８０％の強度で低下する場合、競合または交差競合が存在し得る。特に、このような他の結合剤は、理想的には、本明細書の上記で広範に概説された機能的要件（１）～（４７）の１つまたは複数を保持する。

【０１６１】

このように、本開示はまた、サルベコウイルススパイクタンパク質、特にサルベコウイルススパイクタンパク質のＳ２サブユニット、より詳細にはサルベコウイルススパイクタンパク質中のサルベコウイルスＨＲ２ドメインに結合する化合物、およびサルベコウイルススパイクタンパク質、特にサルベコウイルスＳ２サブユニット、より詳細にはサルベコウイルスＨＲ２ドメインへの結合をめぐって本明細書に記載されるＩＳＶＤまたはその機能的部分（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）と競合する化合物をスクリーニングする方法に関する。このような方法は、一般に、以下の工程のうちの１つまたは複数を含む：

－　化合物または化合物プールを準備する工程と；

－　化合物または化合物プールを、本明細書に記載されるＩＳＶＤまたはその機能的部分（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）の非存在下で、サルベコウイルススパイクタンパク質またはサルベコウイルスＳ２サブユニットまたはサルベコウイルスＨＲ２ドメインと接触させる工程と；

－　化合物または化合物プールを、本明細書に記載されるＩＳＶＤまたはその機能的部分（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）の存在下で、サルベコウイルススパイクタンパク質またはサルベコウイルスＳ２サブユニットまたはサルベコウイルスＨＲ２ドメインと接触させる工程と；

－　化合物または化合物プールが、サルベコウイルススパイクタンパク質またはサルベコウイルスＳ２サブユニットまたはサルベコウイルスＨＲ２ドメインに結合したＩＳＶＤまたはその機能的部分の量を低減することが可能かどうかを測定、評価、決定、アッセイする工程；またはＩＳＶＤまたはその機能的部分が、サルベコウイルススパイクタンパク質またはサルベコウイルスＳ２サブユニットまたはサルベコウイルスＨＲ２ドメインに結合した化合物または化合物プールの量を低減することが可能かどうかを測定、評価、決定、アッセイする工程と；

－　化合物の存在下で、サルベコウイルススパイクタンパク質もしくはサルベコウイルスＳ２サブユニットもしくはサルベコウイルスＨＲ２ドメインに結合したＩＳＶＤもしくはその機能的部分の量が低減する場合に、サルベコウイルススパイクタンパク質もしくはサルベコウイルスＳ２サブユニットもしくはサルベコウイルスＨＲ２ドメインへの結合をめぐるＩＳＶＤもしくはその機能的部分の競合因子（ｃｏｍｐｅｔｉｔｏｒ）として化合物を同定する工程、または１つもしくは複数の化合物の存在下で、サルベコウイルススパイクタンパク質もしくはサルベコウイルスＳ２サブユニットもしくはサルベコウイルスＨＲ２ドメインに結合するＩＳＶＤもしくはその機能的部分の量が低減する場合に、サルベコウイルススパイクタンパク質もしくはサルベコウイルスＳ２サブユニットもしくはサルベコウイルスＨＲ２ドメインへの結合をめぐるＩＳＶＤまたはその機能的部分の競合因子として１つもしくは複数の化合物を含むように化合物プールを同定する工程、またはＩＳＶ

Ｄもしくはその機能的部分の存在下で、サルベコウイルススパイクタンパク質もしくはサルベコウイルスＳ２サブユニットもしくはサルベコウイルスＨＲ２ドメインに結合する化合物の量が低減する場合に、サルベコウイルススパイクタンパク質もしくはサルベコウイルスＳ２サブユニットもしくはサルベコウイルスＨＲ２ドメインへの結合をめぐるＩＳＶＤもしくはその機能的部分の競合因子として化合物を同定する工程、またはＩＳＶＤもしくはその機能的部分の存在下で、サルベコウイルススパイクタンパク質もしくはサルベコウイルスＳ２サブユニットもしくはサルベコウイルスＨＲ２ドメインに結合する化合物プールの量が低減する場合に、サルベコウイルススパイクタンパク質もしくはサルベコウイルスＳ２サブユニットもしくはサルベコウイルスＨＲ２ドメインへの結合をめぐるＩＳＶＤもしくはその機能的部分の競合因子として１つもしくは複数の化合物を含む化合物プールを同定する工程。

【０１６２】

「化合物」または「試験化合物」または「候補化合物」または「薬剤候補化合物」という用語は、本明細書で使用される場合、設計、同定、スクリーニング、または生成され、およびスクリーニングアッセイまたは創薬アッセイなどのアッセイにおいて、または具体的には本明細書に記載されるＩＳＶＤと競合する化合物を同定するための方法（または本明細書に記載される、サルベコウイルススパイクタンパク質またはその一部と結合するためのそのバリアントもしくはヒト化形態（上記のような））において試験され得る、天然に存在するかまたは合成のいずれかの分子を記載する。このように、これらの化合物は、有機化合物および無機化合物を含む。ハイスループットの目的では、十分な範囲の多様性をもたらすコンビナトリアルライブラリーまたはランダム化ライブラリーなどの試験化合物ライブラリーが使用されてもよい。例えば、天然化合物ライブラリー、アロステリック化合物ライブラリー、ペプチドライブラリー、抗体断片ライブラリー、合成化合物ライブラリー、断片ベースライブラリー、ファージディスプレイライブラリーなどが挙げられるが、これらに限定されない。このような化合物は、結合剤と呼ばれることもあり、本明細書で言及されるように、これらは「低分子」であってもよく、これは低分子量（例えば、＜９００Ｄａまたは＜５００Ｄａ）の有機化合物を指す。化合物または結合剤は、低分子量を特徴とする化学物質、ポリヌクレオチド、脂質またはホルモン類似体も含む。他の生体高分子有機試験化合物は、約２～約４０アミノ酸を含む小さなペプチドまたはペプチド様分子（ペプチド模倣物）、および抗体、抗体模倣物、抗体断片または抗体コンジュゲートなどの約４０～約５００アミノ酸を含む大きなポリペプチドを含む。

【０１６３】

本明細書で使用される場合、「決定する」、「測定する」、「評価する」、「同定する」、「スクリーニングする」、および「アッセイする」という用語は、互換的に使用され、定量的決定および定性的決定の両方を含む。

【０１６４】

また別の態様では、本発明は、本明細書において同定されるポリペプチド性またはポリペプチドサルベコウイルス結合剤、特に抗体または抗体断片、より詳細には本明細書に記載されるＩＳＶＤ（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）、またはその機能的部分のポリペプチド部分をコードしている、コード配列などのポリヌクレオチド配列を含む、単離された核酸、（単離された）キメラ遺伝子構築物、発現カセットなどの核酸分子を提供する。

【０１６５】

「核酸」または「核酸分子」は、本明細書で使用される場合、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指し、ヌクレオチドの連続的な直鎖配置は、「ヌクレオチド配列」、「ＤＮＡ配列」または「ＲＮＡ配列」を一緒にもたらす／形成する。この用語は、分子の一次構造のみを指す。したがって、この用語は二本鎖および一本鎖ＤＮＡ、およびＲＮＡを含む。また、既知のタイプの修飾、例えば、メチル化、「キャップ」、１つまたは複数の天然に存在するヌクレオチドの、類似体による置換も含む。核酸への修飾は、１つまたは複数のレベルで導入され得る：

リン酸連結修飾（例えば、ホスホジエステル結合、ホスホルアミデート結合またはホスホロチオエート結合のうちの１つまたは複数の導入）、糖修飾（例えば、１つまたは複数のＬＮＡ（ロックド核酸）、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシ－エチル、２’－フルオロ、Ｓ－拘束エチルまたはトリシクロＤＮＡのうちの１つまたは複数の導入）および／または非リボース修飾（例えば、ホスホロジアミデートモルホリノまたはペプチド核酸の１つまたは複数の導入）。

【０１６６】

「核酸構築物」とは、自然界には存在しない１つまたは複数の機能単位を含むために構築された核酸分子を意味し、したがって自然界には存在しないヌクレオチド配列（非ネイティブヌクレオチド配列）を有する。例としては、環状、直鎖状、二本鎖、染色体外ＤＮＡ分子（プラスミド）、コスミド（ラムダファージ由来のＣＯＳ配列を含有するプラスミド）、非ネイティブ核酸配列を含むウイルスゲノムなどを含む。

【０１６７】

「コード配列」は、適切な（遺伝子）調節配列の制御下に置かれると、ｍＲＮＡに転写され、および／またはポリペプチドに翻訳され得るヌクレオチド配列である。コード配列の境界は、５’－末端の翻訳開始コドンおよび３’－末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列は、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ、組換えヌクレオチド配列またはゲノムＤＮＡを含むが、これらに限定されず、一方、イントロンは、ある特定の状況下で同様に存在し得る。

【０１６８】

「キメラ遺伝子」または「キメラ構築物」または「キメラ遺伝子構築物」は、（遺伝子）プロモーターまたは調節核酸配列が、ＲＮＡをコードする目的の核酸配列（例えば、コード配列、ｓｈＲＮＡなど）に作動可能にまたは操作可能に連結されているか、またはそれと関連しており、調節核酸配列が目的の核酸の転写または発現を調節することができるような組換え核酸配列を互換的に意味する。調節核酸配列と目的の核酸配列との間のキメラ遺伝子における作動可能な、または操作可能な連結は、自然界では見られない。

【０１６９】

「発現カセット」は、（遺伝子）プロモーターに作動可能に連結された、目的の遺伝子／コード配列の発現を指示することが可能な任意の核酸構築物を含む。発現カセットは、一般に、好ましくは（転写方向の５’から３’に）：（遺伝子）プロモーター領域、転写開始領域を有する目的のポリヌクレオチド配列、およびＲＮＡポリメラーゼのための停止シグナルおよびポリアデニル化シグナルを含む終結配列を含むＤＮＡ構築物であり；これらのエレメントはすべて、作動可能にまたは操作可能に連結されており、原核細胞（例えば、細菌）または真核細胞（例えば、哺乳類、酵母、昆虫、真菌、植物、藻類）などの細胞に形質転換された場合、その細胞において作動可能である（発現される）べきであることを意味する。好ましくはＲＮＡポリメラーゼ結合部位を含む転写開始領域、およびポリアデニル化シグナルを含むプロモーター領域は、形質転換される細胞に対してネイティブであってもよく、別の供給源に由来するものであってもよく、または細胞内で機能する限り合成されたものであってもよい。このような発現カセットは、例えば「ベクター」または「発現ベクター」（直鎖状または環状の核酸、プラスミド、コスミド、ウイルスベクター、ファージミドなど）で構築され得る。

【０１７０】

本発明はまた、上記の核酸分子をその中に挿入したベクターを提供する。

【０１７１】

「ベクター」、「ベクター構築物」、「発現ベクター」、「組換えベクター」または「遺伝子移入ベクター」という用語は、本明細書で使用される場合、それが連結された別の核酸分子を運ぶことが可能な核酸分子を指すことを意図する。

【０１７２】

前記ベクターは、クローニングベクターまたは発現ベクター、およびウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターなどの送達ビヒクルを含み得る

。発現ベクターは、ウイルスベクターと同様にプラスミドを含んでもよく、一般に、所望のコード配列および特定の宿主生物（例えば、細菌、酵母、植物、昆虫、または哺乳動物）またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現系における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切なＤＮＡ配列を含有する。特に、本明細書に記載される発現ベクターは、少なくとも１つの調節配列に作動可能に連結された、本明細書に記載される抗体または抗原結合断片をコードする核酸配列を含む、本明細書に記載される核酸分子を含んでもよい。調節配列は、好適な宿主細胞における目的のタンパク質、特に抗体または抗原結合断片の発現を指示するように選択され、当業者に公知のプロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメントを含む。したがって、実施形態では、ベクターは、目的の核酸の発現を駆動するためのプロモーター、任意に抗体または抗原結合断片を分泌するシグナルペプチドをコードする核酸配列、および任意にターミネーターをコードする核酸配列を含む。発現ベクターが産生株または細胞株において操作される場合、ベクターは宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノムに組み込まれても組み込まれなくてもよい。クローニングベクターは一般に、ある特定の所望のＤＮＡ断片を操作および増幅するために使用される。したがって、クローニングベクターは、クローニングベクターによって特定された細胞型に一致する複製起点を含有してもよく、所望のＤＮＡ断片の発現に必要な機能的配列を欠いていてもよい。好ましくは、ベクターは１つまたは複数の選択マーカーを含有する。選択マーカーの選択は、選択する宿主細胞に依存し得るが、これは当業者にとって周知であるように、本発明にとって重要ではない。細胞のトランスフェクションに使用するための発現ベクターの構築もまた、当技術分野で周知であり、したがって、標準的な技法によって達成され得る（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｆｒｉｔｓｃｈ、およびＭａｎｉａｔｉｓ、ｉｎ：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，１９８９；Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，１０９～１２８頁、Ｅ．Ｊ．Ｍｕｒｒａｙ編、Ｔｈｅ　Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ　Ｉｎｃ．、Ｃｌｉｆｔｏｎ、Ｎ．Ｊ．）、ならびにｔｈｅ　Ａｍｂｉｏｎ　１９９８　Ｃａｔａｌｏｇ（Ａｍｂｉｏｎ、Ａｕｓｔｉｎ、Ｔｅｘ．を参照されたい）。

【０１７３】

より詳細には、前記ベクターは、例えば、プラスミドベクター、コスミドベクター、ラムダファージなどのファージベクター、ウイルスベクター、より詳細には、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ＡＡＶベクターまたはバキュロウイルスベクター、または細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、またはＰ１人工染色体（ＰＡＣ）などの人工染色体ベクターを含むが、これらに限定されない任意の好適なタイプを含む、当業者に公知の任意のベクターを含んでもよい。ベクターの選択は、とりわけ、選択する宿主細胞の性質に依存し得る。

【０１７４】

本発明のさらなる一態様は、本明細書に記載される抗体もしくは抗原結合断片、例えば、抗体もしくは抗原結合断片のＩＳＶＤ（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）、またはその一部を含む宿主細胞を提供する。したがって、宿主細胞は、前記抗体または抗原結合断片をコードする核酸分子を含んでもよい。宿主細胞は、原核細胞であっても真核細胞であってもよい。宿主細胞はまた、本発明の抗体または抗原結合断片をコードする単離された核酸分子を含有するように遺伝子修飾された細胞を含む組換え宿主細胞であってもよい。ＩＳＶＤなどの前記抗体または抗原結合断片を産生するために使用され得る代表的な宿主細胞としては、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞および動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体または抗原結合断片の産生に適した細菌宿主細胞は、エシェリキア種（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｓｐｐ．）の細胞、バチラス種（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐｐ．）の細胞、ストレプトマイセス種（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐｐ．）の細胞、エルウィニア種（Ｅｒｗｉｎｉａ　ｓｐｐ．）の細胞、クレブシエラ種（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｓｐｐ．）の細胞、セラチア種（Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｓｐｐ．）の細胞、シュードモナス種（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｐｐ．）の細胞、サルモネラ種

（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｓｐｐ．）の細胞を含む。本発明での使用に好適な酵母宿主細胞は、サッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、シゾサッカロマイセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）クリベロマイセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ピキア（例えば、ピキアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ））、ハンセヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）（例えば、ハンセヌラポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ　ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ））、ヤロウィア（Ｙａｒｏｗｉａ）、シュワニオマイセス（Ｓｃｈｗａｎｉｏｍｙｃｅｓ）、シゾサッカロマイセス（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、ザイゴサッカロマイセス（Ｚｙｇｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）などの中の種がを含む。出芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、ビール酵母（Ｓ．ｃａｒｌｓｂｅｒｇｅｎｓｉｓ）およびクルイベロミセスラクチス（Ｋ．ｌａｃｔｉｓ）は、最も一般的に使用される酵母宿主であり、都合のよい真菌宿主である。本発明を用いて使用するのに好適な動物宿主細胞は、昆虫細胞および哺乳類細胞（例えば、チャイニーズハムスター（例えば、ＣＨＯ）由来、およびＨｅＬａなどのヒト細胞株）を含む。例示的な昆虫細胞株は、Ｓｆ９細胞、バキュロウイルス－昆虫細胞系（例えば、総説Ｊａｒｖｉｓ、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　第３１０巻　第１号　２００３年５月２５日　１～７頁）を含むが、これらに限定されない。あるいは、宿主細胞はトランスジェニック動物または植物であってもよい。

【０１７５】

宿主細胞におけるベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、ウイルス感染、ＤＥＡＥ－デキストランに媒介されるトランスフェクション、リポフェクタミンによるトランスフェクションまたはエレクトロポレーションによって行うことができ、当業者であれば誰でも、使用される発現ベクターおよび宿主細胞にとって好適な導入方法を選択および使用することができる。

【０１７６】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載される１つまたは複数のＩＳＶＤ（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）またはその一部を含む抗体またはその抗原結合断片などの結合剤を含む組成物に関する。「組成物」は、本明細書で使用される場合、結合剤の活性、特にこの場合はＨＲ２（またはＳ２）結合およびサルベコウイルス中和活性を保持する製剤中に存在する、１つまたは複数の分子の組合せ、したがって機能性組成物を指す。したがって、組成物は、そのＨＲ２ドメインとの相互作用によってサルベコウイルススパイクタンパク質と特異的に結合する、本明細書に記載される１つまたは複数の結合剤（Ｓ２を標的とする結合剤またはＨＲ２ドメインを標的とする結合剤）を構成する１つまたは複数の分子を含む。特定の実施形態では、組成物は、結合剤、特に配列番号１１８において定義されるアミノ酸配列を含む抗体などのＦｃドメインに融合した本明細書に記載されるＩＳＶＤ（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）を含む二価抗体を含んでもよい。前記組成物は、可溶性組成物であっても固体組成物であってもよい。

【０１７７】

前記Ｓ２を標的とする結合剤分子、特にＨＲ２ドメインを標的とする結合剤分子に加えて、組成物は、例えば、緩衝剤成分、アジュバント、または機能性分子であってもよい追加の分子をさらに含んでもよいが、これらに限定されない。

【０１７８】

特定の実施形態では、組成物は、本明細書の他の箇所に記載されるサルベコウイルススパイクタンパク質受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に結合することが可能な１つまたは複数の結合剤をさらに含んでもよい。特定の実施形態では、組成物は、本明細書の他の箇所に記載されるサルベコウイルススパイクタンパク質受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に結合可能な１つまたは複数の（例えば、２つ、３つ、４つ、またはそれより多い）ＩＳＶＤ（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）を含む抗体またはその抗原結合断片などの１つまたは複数の結合剤をさらに含んでもよい。したがって、前記組成物は、少なくとも２つの結合剤を含有してもよく、１つの結合剤がＨＲ２ドメインに特異的に結合し、第２の結合剤がＲＢＤ領域に特異的に結合することを特徴とし、その結果、少なくとも２つの結合

剤がスパイクタンパク質に非競合的に、場合によっては同時に結合する組成物が得られる。

【０１７９】

好ましい実施形態では、サルベコウイルススパイクタンパク質ＲＢＤに結合可能な結合剤は、好ましくは前記結合剤中に存在する２つの異なるＩＳＶＤを介して、ＲＢＤの２つの非競合性結合部位に結合可能であり、前記結合剤は二重特異性結合剤、または多重特異性結合剤であってもよい。より詳細には、結合剤は、本明細書で定義されるＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能な１つまたは複数のＩＳＶＤ、および本明細書において定義されるＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能な１つまたは複数のＩＳＶＤを含んでもよい。ＶＨＨ７２エピトープするかまたはそれをめぐって競合することが可能な１つまたは複数のＩＳＶＤ、およびＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能な１つまたは複数のＩＳＶＤを含む結合剤の非限定的な例は、ＰＣＴ／ＥＰ２０２２／０６２９８０に記載されている。

【０１８０】

特定の実施形態では、組成物は、（ｉ）配列番号８に記載されるアミノ酸配列（例えばＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３）を含むかまたはそれからなる１つまたは複数のＩＳＶＤなどの配列番号８に存在するＣＤＲを含む１つまたは複数のＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態を含む結合剤、特に抗体またはその抗原結合断片；ならびに（ｉｉ）配列番号１２５（例えばＶＨＨ８３）または配列番号１２４（例えば、ＶＨＨ７２）に記載される配列を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤなどの配列番号１２５または配列番号１２４に存在するＣＤＲを含む１つまたは複数のＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態、および配列番号１２６（例えば、ＶＨＨ３．１１７）に記載される配列を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤなどの配列番号１２６に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態を含む結合剤、特に抗体またはその抗原結合断片を含み、ここで、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ、Ｍａｒｔｉｎ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、またはＣｈｏｔｈｉａに従ってアノテーションされる。さらなる特定の実施形態では、組成物は、（ｉ）配列番号１１８に記載されるアミノ酸配列を含む抗体などの、Ｆｃドメインに融合した、配列番号８に記載されるアミノ酸配列（例えばＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３）を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤなどの配列番号８に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態を含む結合剤、特に（二価の）抗体；ならびに（ｉｉ）本明細書において定義されるＦｃドメインのＮ末端に融合した、配列番号１２６に記載される配列（例えば、ＶＨＨ３．１１７）を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤなどの配列番号１２６に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態、ならびにＦｃドメインのＮ末端に融合した、配列番号１２５（例えば、ＶＨＨ８３）または配列番号１２４（例えば、ＶＨＨ７２）に記載される配列を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤなどの配列番号１２５または配列番号１２４に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態を含む結合剤、特に二重特異性抗体を含んでもよく；あるいは配列番号１２６に記載される配列（例えば、ＶＨＨ３．１１７）を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤなどの配列番号１２６に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態は、Ｆｃドメインの Ｎ末端に融合されてもよく、および配列番号１２５（例えば、ＶＨＨ８３）または配列番号１２４（例えば、ＶＨＨ７２）に記載される配列を含むかまたはそれからなるＩＳＶＤなどの配列番号１２５または配列番号１２４に存在するＣＤＲを含むＩＳＶＤ、またはそのバリアントもしくはヒト化形態は、ＦｃドメインのＣ末端に融合されてもよく、ここで、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ、Ｍａｒｔｉｎ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、またはＣｈｏｔｈｉａに従ってアノテーションされる。またさらに特定の実施形態では、二重特異性抗体（ｉｉ）は、配列番号１１９に記載されるアミノ酸配列、またはその任意の機能的バリアント、またはその少なくとも９０％の同一性を有するバリアント、またはそのヒト化バリアントを含むかまたはそれからなる。

【０１８１】
実施形態では、組成物中の、本明細書に記載される１つまたは複数のＩＳＶＤ（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）、またはその一部を含む抗体またはその抗原結合断片などの（Ｓ２を標的とする）結合剤と、サルベコウイルススパイクタンパク質受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）に結合可能な１つまたは複数のＩＳＶＤ（またはそのバリアントもしくはヒト化形態）を含む抗体またはその抗原結合断片などの（Ｓ１を標的とする）結合剤との分子比は、３：１～１：３、好ましくは２：１～１：２の範囲であってよく、より好ましくは分子比は約１：１である。
【０１８２】
さらに、前記組成物は、追加の結合剤または分子をさらに含有してもよく、それらは任意に、スパイクタンパク質の同一もしくは異なるエピトープ上のさらなる結合領域、もしくは他のウイルスタンパク質に結合し、または全く無関係な標的タンパク質を標的としてもよい。
【０１８３】
本発明のさらなる態様は、結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、および／または核酸を含む（組換え）ベクター、および／または本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片を含む組成物を含む医薬または医薬組成物に関する。特に、医薬組成物は、薬学的に許容される組成物であり；このような組成物は、好ましくは、（薬学的に）適切または許容される担体、希釈剤、アジュバント、賦形剤、安定剤などをさらに含む。
【０１８４】
「薬学的に許容される」とは、生物学的に、または他の点で望ましくない物質、すなわち、望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、またはそれが含有される医薬組成物の他の成分のいずれとも有害に相互作用することなく、化合物、特にサルベコウイルス結合剤、より詳細にはサルベコウイルス抗体または抗原結合断片と共に個体に投与され得る物質を意味する。薬学的に許容される担体は、好ましくは、有効成分の有効な活性と一致する濃度で、患者にとって比較的無毒で無害な担体であり、担体に起因するいかなる副作用も有効成分の有益な効果を無効にしない。好適な担体またはアジュバンチアは、典型的には、以下の非網羅的リストに含まれる化合物のうちの１つまたは複数を含む：タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよび不活性ウイルス粒子などのゆっくりと代謝される大型高分子。「賦形剤」という用語は、本明細書で使用される場合、医薬組成物中に存在してもよく、有効成分ではないが、例えば長期安定性、または有効成分に対する治療増強（例えば、薬物吸収の促進、粘度の低下、または溶解度の向上）に寄与し得るすべての物質を含むことを意図する。賦形剤は、例えば、塩類、結合剤（例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、トレハロース、ソルビトール、マンニトール）、滑沢剤、増粘剤、界面活性剤、防腐剤、乳化剤、緩衝物質、安定化剤、香料または着色剤を含んでもよい。「希釈剤」、例えば、特に「薬学的に許容される希釈剤」は、水、生理食塩水、生理学的な塩溶液、グリセロール、エタノールなどのビヒクルを含む。湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝物質、防腐剤などの補助物質が、このようなビヒクルに含まれていてもよい。
【０１８５】
本発明の結合剤、特に抗体または抗原結合断片の薬学的に有効な量は、好ましくは、処置される特定の状態に結果をもたらすか、または影響を及ぼす量である。
【０１８６】
本発明の医薬組成物は、保存のために凍結乾燥され、使用前に好適な担体中で復元され得る。凍結乾燥または液体として調製される場合、生理学的に許容される担体、賦形剤、安定剤を本発明の医薬組成物に添加する必要がある（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ 第２２版、Ａｌｌｅｎ，Ｌｏｙｄ Ｖ，Ｊｒ．編（２０１２））。本発明の医薬組成物を含有する調製物は、注射前に滅菌されるべきである。この手順は、凍結乾燥および復元の前後に滅菌ろ過膜を使用して行うことができ

る。医薬組成物は、ゴム栓付きのｉ．ｖ．溶液ボトルなどの滅菌アクセスポートを有する容器またはバイアルにパッケージングされ得る－医薬組成物は液体として存在することができ、または容器またはバイアルは、その後凍結乾燥または乾燥される液体医薬組成物を充填され；またはプレフィルドシリンジにパッケージングされ得る。

【０１８７】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含むベクター、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片を含む組成物、または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含む（組換え）ベクターを含む医薬組成物、および／または医薬もしくは医薬品として使用するための本明細書に記載される結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物に関する。あるいは、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含むベクター、または本明細書に記載される結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物の使用、あるいは医薬もしくは医薬品の製造において、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含むベクター、および／または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物を含む医薬組成物の使用が想定される。

【０１８８】

特に、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含むベクター、または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物、あるいは結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含む（組換え）ベクター、および／または本明細書に記載される結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物を含む医薬品または医薬組成物は、受動免疫における使用のため、サルベコウイルス感染症を有する対象を処置する際の使用のため、サルベコウイルスを有する対象の感染を防止する際の使用のため、またはサルベコウイルスによる感染から対象を保護する際の使用のためのものである。

【０１８９】

受動免疫に使用する場合、対象はサルベコウイルスによる感染を有してもよく（治療的受動免疫）、またはサルベコウイルスによる感染を有していなくてもよい（予防的受動免疫）。

【０１９０】

関連する態様は、サルベコウイルスによる感染に罹患している／それを有する／罹患した対象を処置するための方法であって、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含む（組換え）ベクター、または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物を対象に投与することを含むか、あるいは本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含む（組換え）ベクター、および／または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物を含む医薬品または医薬組成物を対象に投与することを含む方法に関する。

【０１９１】

本発明のさらなる態様は、対象をサルベコウイルスによる感染から保護するため、またはサルベコウイルスによる対象の感染を防止するための方法であって、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含む（組換え）ベクター、または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物を、感染前の対象に投与することを含むか、あるいは結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含む（組換え）ベクター、および／または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物を含む、本明細書に記載される医薬品または医薬組成物を感染前の対象に投与することを含む方法に関する。

【０１９２】

上記の医学的態様では、本明細書に記載される結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片

をコードする核酸、またはこのような核酸を含む（組換え）ベクターは、例えば遺伝子治療の設定で使用され得る。本明細書で使用される「遺伝子治療」は、発現した、または発現可能な核酸の対象への投与によって実施される治療を指す。このような適用では、本明細書に記載される核酸分子またはベクターは、細胞内での結合剤、抗体または抗体断片の産生を可能にする。遺伝子治療のための多数の方法が当技術分野で利用可能であり、例えば、（アデノ随伴）ウイルスに媒介される遺伝子サイレンシング、またはウイルスに媒介される遺伝子治療を含む（例えば、米国特許出願公開第２００４００２３３９０号；Ｍｅｎｄｅｌｌら　２０１７、Ｎ　Ｅｎｇ　Ｊ　Ｍｅｄ　３７７：１７１３～１７２２頁）。多数の送達方法が当業者に周知であり、ウイルス送達系、ＤＮＡプラスミドのマイクロインジェクション、ネイキッド核酸の遺伝子銃、リポソームまたは人工エクソソームの使用、ナノ粒子または脂質もしくは脂質を含む粒子に製剤化された核酸またはベクターの投与を含むが、これらに限定されない。個々の患者への投与によるＩｎ　ｖｉｖｏ送達は、典型的には、全身投与（例えば、静脈内、腹腔内注入または脳注射；例えば、Ｍｅｎｄｅｌｌら　２０１７、Ｎ　Ｅｎｇ　Ｊ　Ｍｅｄ　３７７：１７１３～１７２２頁）によって起こる。

【０１９３】

「治療的に活性な薬剤」とは、一般に、疾患の処置に関連して治療効果（すなわち、治癒効果または予防効果）を有するか、または有する可能性のある任意の分子を意味する。好ましくは、治療的に活性な薬剤は、疾患修飾治療薬であり、これは、毒素などの細胞傷害性薬剤、または細胞傷害性薬物、またはプロドラッグを細胞傷害性薬物に変換することが可能な酵素、または放射性核種、または細胞傷害性細胞であってもよく、または非細胞傷害性薬剤であってもよい。さらにより好ましくは、治療的に活性な薬剤は、疾患の治癒効果を有する。本発明の結合剤、特に抗体または抗体断片、または医薬組成物は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２もしくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１などのサルベコウイルスに感染した患者、またはＣＯＶＩＤ－１９に罹患している患者を処置する際に有益な場合、治療的に活性な薬剤として作用し得る。結合剤、特に抗体または抗体断片は、本明細書に記載されるサルベコウイルスに結合するＩＳＶＤのバリアント、好ましくはＨＲ２ドメインの同じ結合領域に結合する改良バリアント、より好ましくはそのヒト化バリアントを含んでもよく、対象に投与された場合に有利な追加の官能基を含有してもよく、またはそれに接続されてもよい。このような官能基および官能基を導入するための技法の例は、当業者には明らかであり、一般に、当技術分野で言及されているすべての官能基および技法、ならびに医薬タンパク質の改変、特に抗体または抗体断片の改変についてそれ自体知られている官能基および技法を含んでもよく、これについては、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、第１６版、Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．、Ｅａｓｔｏｎ、ＰＡ（１９８０）が参照される。このような官能基は、例えば、ＩＳＶＤまたは活性抗体断片に直接的に（例えば共有結合により）、または任意に、当業者には再び明らかなように、好適なリンカーもしくはスペーサーを介して連結されてもよい。医薬タンパク質の半減期を増加させ、および／またはその免疫原性を低下させるために最も広く使用される技法の１つは、ポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）またはその誘導体（例えば、メトキシポリ（エチレングリコール）またはｍＰＥＧ）などの好適な薬理学的に許容されるポリマーの結合を含む。例えば、この目的のために、ＰＥＧは、本明細書に記載される免疫グロブリン単一可変ドメイン（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）中に天然に存在するシステイン残基の結合を受けてもよく、本明細書に記載される免疫グロブリン単一可変ドメイン（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）は、ＰＥＧの結合のために１つもしくは複数のシステイン残基を好適に導入するように改変されてもよく、または、ＰＥＧの結合のための１つもしくは複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列は、本明細書に記載されるＩＳＶＤもしくは活性抗体断片（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）のＮ末端および／またはＣ末端に融合されてもよく、これらはすべて、当業者にそれ自体公知のタンパク質操作の技法を使用する。別の、通常はあまり好ましくない修飾は、抗体または活性抗体断片を発現するために使用される宿主細胞に応じて、通常、翻訳共修飾

および／または翻訳後修飾の一部として、Ｎ－連結またはＯ－連結グリコシル化を含む。結合ドメイン、特に抗体または抗体断片の半減期を増加させるための別の技法は、二機能性または二重特異性ドメイン（例えば、標的サルベコウイルスＨＲ２ドメインに対する１つのＩＳＶＤまたは活性抗体断片、およびアルブミンまたはブドウ球菌のプロテインＡ（ＳｐＡ）（半減期の延長に役立つ肺に豊富に存在する表面タンパク質である）などの血清タンパク質に対するもの）、または抗体断片、特に免疫グロブリン単一可変ドメインとペプチドとの融合体（例えば、アルブミンなどの血清タンパク質に対するペプチド）への操作を含んでもよい。また別の例では、本明細書に記載されるＩＳＶＤ（または本明細書に記載されるそのバリアントもしくはヒト化形態）は、本明細書の他の箇所に記載される免疫グロブリンＦｃドメインに融合され得る。例は、実験セクションにさらに示されており、配列表にも示されている。実施形態では、上記医学的態様では、サルベコウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントなどのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１である。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントは、（配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクアミノ酸配列に対して）Ｎ４３９位、Ｋ４１７位、Ｓ４７７位、Ｌ４５２位、Ｔ４７８位、Ｅ４８４位、Ｐ３８４位、Ｎ５０１位および／またはＤ６１４位におけるバリアントであってもよく、より詳細にはＮ５０１ＹバリアントなどのＮ５０１位のバリアント（例えばＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アルファバリアント）、Ｎ５０１ＹおよびＥ４８４Ｋバリアントなどのの５０１位およびＥ４８４位のバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アルファ＋Ｅ４８４Ｋバリアント）、Ｋ４１７Ｎ、Ｅ４８４ＫおよびＮ５０１ＹバリアントなどのＫ４１７位、Ｅ４８４位およびＮ５０１位のバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ベータバリアント）、Ｐ３８４Ｌ、Ｋ４１７Ｎ、Ｅ４８４ＫおよびＮ５０１ＹバリアントなどのＰ３８４位、Ｋ４１７位、Ｅ４８４位およびＮ５０１位のバリアント（例えばＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ベータ＋Ｐ３８４Ｌバリアント）、Ｌ４５２ＲおよびＥ４８４Ｑバリアントなどのの４５２位およびＥ４８４位のバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２カッパバリアント）、Ｌ４５２ＲおよびＴ４７８Ｋバリアントなどのの４５２位およびＴ４７８位のバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２デルタバリアント）、Ｌ４５２Ｒバリアントなどのの４５２位のバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２イプシロンバリアント）、Ｋ４１７Ｔバリアントなどのの４１７位のバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ガンマバリアント）、またはＤ６１４Ｇバリアントなどのの６１４位のバリアント（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンバリアントまたはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＢＡ．１バリアント）である。特定の実施形態では、サルベコウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のいずれか一方または両方である。さらなる特定の実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２武漢株またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント、特に、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　アルファバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアントおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．２バリアントからなる群から選択されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントである。

【０１９４】

本明細書で使用される場合、「治療」または「処置」という用語は、疾患または障害、特にサルベコウイルス感染症などの病理学的状態の１つまたは複数の症状または測定可能なマーカーの軽減または測定可能な減少を指す。測定可能な減少には、測定可能な症状またはマーカーにおける統計的に有意な低下が含まれる。一般に、この用語は、治癒的処置と、症状を低減し、および／または疾患の進行を遅らせることを対象とした処置との両方を包含する。この用語は、既に発症した病理学的状態、特にサルベコウイルス感染症の治療的処置と、予防的または防止的措置との両方を包含し、その目的は、病理学的状態、特にサルベコウイルス感染症の発症の可能性を防止または減少させることである。有益なまたは所望の臨床的結果には、疾患の防止、疾患の発生率の低下、疾患に関連する症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の安定化、疾患の進行の遅延または減速、疾患の改善または緩和、またはそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、この用語は治療的処置に関連し得る。ある特定の実施形態では、この用語は防止的

処置に関連し得る。

【０１９５】

例えば、処置は、サルベコウイルス感染症に罹患した対象に対する受動的免疫化（治療的処置）を指す場合がある。サルベコウイルスによる感染の防止は、例えば、重篤な疾患症状を発症する可能性が最も高いことが知られている対象を、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、またはそれをコードする核酸、またはこのような核酸を含むベクター、または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物により予防的に処置する（防止的または予防的免疫）ことにより、全体的な感染を防止するか、または重篤な疾患症状の発症もしくは発生を防止することができる、流行またはパンデミック状態の場合に有用であり得る。

【０１９６】

実施形態では、治療有効量の結合剤、特に抗体または抗原結合断片、核酸、ベクターまたは医薬組成物が、それを必要とする対象に投与される。他の実施形態では、予防的に有効な量の結合剤、特に抗体または抗原結合断片、核酸、ベクターまたは医薬組成物が、それを必要とする対象に投与される。「治療上有効な量」または「治療上有効な用量」は、対象に投与された場合に、例えばサルベコウイルスによる感染を治癒させるなど、サルベコウイルス感染症に罹患した対象の治療的処置に関して臨床的に陽性の応答をもたらす結合剤、特に抗体または抗原結合断片、核酸、ベクターまたは医薬組成物の量を示す。同様に、「予防的に有効な量」または「予防的に有効な用量」とは、サルベコウイルス感染症の発症を防止、阻害もしくは遅延させ、ならびに／またはサルベコウイルス感染症の臨床症状のリスクを防止もしくは低減し、ならびに／または対象におけるサルベコウイルス感染症の重症度、症状および／もしくは持続期間を低減する結合剤、特に抗体または抗原結合断片、核酸、ベクターまたは医薬組成物の量を指す。治療効果または防止もしくは予防効果を達成するために、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、またはそれをコードする核酸またはこのような核酸を含むベクター、または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物は、対象に、複数回、例えば１週間または２週間の間隔を空けて投与される必要があり得；間隔は、結合剤、特に抗体または抗原結合断片、核酸またはベクターの薬物動態学的挙動または特徴（例えば、半減期または対象の循環における半減期）によって規定される。あるいは、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片の単回用量が対象に投与される治療的処置および予防的処置が想定される。単回用量は、０．５ｍｇ／ｋｇ～２５ｍｇ／ｋｇの範囲内であってもよい。

【０１９７】

本明細書において互換的に使用される「対象」、「個体」または「患者」という用語は、診断、治療または予防が望まれる脊椎動物、特にヒトと他の哺乳動物の両方を含む任意の哺乳動物などの任意の生物、例えば、げっ歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、ラマ、ブタ、または非ヒト霊長類（例えば、サル）などの動物に関する。げっ歯類は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、またはチンチラであってもよい。一実施形態では、対象はヒト、ラットまたは非ヒト霊長類である。好ましくは、対象はヒトである。特定の実施形態では、対象は、本明細書において「患者」または「対象」とも指定される、サルベコウイルスによる感染を有するかまたは有することが疑われる、ヒト対象などの対象である。しかし、前述の用語は、症状が存在することを意味しないことが理解されるであろう。特定の実施形態では、対象は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントなどのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１に感染しやすいヒト対象などの、サルベコウイルスに感染しやすい哺乳動物である。

【０１９８】

本発明の医薬組成物は、標準的技法に従って任意の患者に投与され得る。投与は、経口、非経口、局所、鼻腔、眼科、髄腔内、脳室内、舌下、直腸、膣などを含む任意の適切な様式によることができる。ナノテクノロジーおよびエアロゾルおよび吸入剤などの製剤のさらに他の技法も本発明の範囲内である。投与量および投与頻度は、患者の年齢、性別、および状態、他の薬剤の同時投与、反対禁忌および臨床医によって考慮されるべき他のパ

ラメータによって異なる。
【０１９９】
本明細書に記載される医学的態様の特定の実施形態では、結合剤、特に抗体または抗原結合断片、核酸、ベクターまたは医薬組成物は、静脈内注射、皮下注射、または経鼻的に、あるいは代替的に吸入または肺送達により対象に投与され得る。
【０２００】
本発明のさらなる態様は、診断剤として使用するための、サルベコウイルス感染症の診断の際に使用するための、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片に関する。本明細書に記載されるサルベコウイルス結合剤、特にサルベコウイルス抗体または抗原結合断片をコードする核酸、このような核酸を含む（組換え）ベクター、または本明細書に記載されるサルベコウイルス結合剤、特にサルベコウイルス抗体または抗原結合断片を含む組成物も同様に、使用のためのものであり得る。
【０２０１】
（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）診断剤または診断キットの製造における、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片の使用もまた想定される。特に、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片は、対象、例えば、サルベコウイルスにより感染していると疑われる対象から得られた試料などの試料中のサルベコウイルスまたはその一部（例えば、サルベコウイルススパイクタンパク質またはその一部）の存在（または非存在）を検出する際の使用のためのものであり得る。本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片をコードする核酸、このような核酸を含む（組換え）ベクター、または本明細書に記載される結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物も同様に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ診断剤またはキットなどの診断剤または診断キットの製造に使用することができる。
【０２０２】
さらなる態様は、対象、例えば、サルベコウイルスに感染していると疑われる対象から得られた試料などの試料中のサルベコウイルスを検出するための方法に関する。このような方法は通常、試料を得る工程と、試料を本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片と接触させる工程と、結合剤、特に抗体または抗原結合断片とサルベコウイルスまたはその一部（例えば、サルベコウイルススパイクタンパク質またはその一部）との結合を検出、決定、評価、アッセイ、同定または測定する工程とを含む。
【０２０３】
本明細書に記載される診断態様の特定の実施形態では、サルベコウイルスは、ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２などのクレード１ａ、１ｂ、２および／またはクレード３のサルベコウイルス、ＧＤ－Ｐａｎｇｏｌｉｎ、ＲａＴＧ１３、ＷＩＶ１、ＬＹＲａ１１、ＲｓＳＨＣ０１４、Ｒｓ７３２７、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１、Ｒｓ４２３１、Ｒｓ４０８４、Ｒｐ３、ＨＫＵ３－１、またはＢＭ４８－３１ウイルス、好ましくはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントなどのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１からなる群から選択される。
【０２０４】
本明細書に記載される診断的態様の実施形態では、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗体断片は、それに融合した、それに結合した、それに接続した、それに連結した、それと複合体化した、またはそれにキレート化された検出可能な部分を含む。「検出可能な部分」とは、一般に、適切な刺激によりシグナルを発するか、もしくはシグナルを発することが可能な部分、またはさらなる分子（例えば、標識抗体により特異的に認識される親和性タグなどのタグ）との結合もしくは相互作用により検出可能である部分、または任意の手段（好ましくは、検出がｉｎ　ｖｉｖｏ／ヒト体内である場合、非侵襲的手段）により検出可能な部分を指す。さらに、検出可能な部分は、コンピュータによる画像の合成を可能にし得、このような検出可能な部分は、画像化剤と呼ばれ得る。検出可能な部分は、限定されないが、蛍光発光体、燐光発光体、陽電子発光体、放射性発光体など、酵素（基質を測定可能に変換することが可能）および分子タグを含む。放射性発光体／放射標識の例は、６８Ｇａ、１１０ｍＩｎ、１８Ｆ、４５Ｔｉ、４４Ｓｃ、４７Ｓｃ、６１

Ｃｕ、６０Ｃｕ、６２Ｃｕ、６６Ｇａ、６４Ｃｕ、５５Ｃａ、７２Ａｓ、８６Ｙ、９０Ｙ、８９Ｚｒ、１２５Ｉ、７４Ｂｒ、７５Ｂｒ，７６Ｂｒ、７７Ｂｒ、７８Ｂｒ、１１１Ｉｎ、１１４ｍＩｎ、１１４Ｉｎ、９９ｍＴｃ、１１Ｃ、３２Ｃｌ、３３Ｃｌ、３４Ｃｌ、１２３Ｉ、１２４Ｉ、１３１Ｉ、１８６Ｒｅ、１８８Ｒｅ、１７７Ｌｕ、９９Ｔｃ、２１２Ｂｉ、２１３Ｂｉ、２１２Ｐｂ、２２５Ａｃ、１５３Ｓｍ、および６７Ｇａを含む。蛍光発光体は、限定されないが、シアニン色素（例えば、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、Ｃｙ７．５）、ＦＩＴＣ、ＴＲＩＴＣ、クマリン、インドレニン系色素、ベンゾインドレニン系色素、フェノキサジン、ＢＯＤＩＰＹ色素、ローダミン、Ｓｉ－ローダミン、Ａｌｅｘａ色素、およびこれらの任意の誘導体を含む。分子タグの非限定的な例は、親和性タグ、例えば、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ポリ（Ｈｉｓ）（例えば、６×ＨｉｓまたはＨｉｓ６）、ビオチンまたはストレプトアビジン、例えば、Ｓｔｒｅｐ－ｔａｇ（登録商標）、Ｓｔｒｅｐ－ｔａｇ　ＩＩ（登録商標）およびＴｗｉｎ－Ｓｔｒｅｐ－ｔａｇ（登録商標）；可溶化タグ、例えばチオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリ（ＮＡＮＰ）およびＳＵＭＯ；クロマトグラフィータグ、例えばＦＬＡＧタグ；エピトープタグ、例えばＶ５タグ、ｍｙｃタグおよびＨＡタグ；蛍光標識またはタグ（すなわち、蛍光色素／蛍光体）、例えば蛍光タンパク質（例えば、ＧＦＰ、ＹＦＰ、ＲＦＰなど）；発光標識またはタグ、例えばルシフェラーゼ、生物発光または化学発光化合物（例えば、ルミナール、イソルミノール、テロマチック（ｔｈｅｒｏｍａｔｉｃ）アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、シュウ酸エステル、ジオキセタンまたはＧＦＰおよびその類似体）；燐光標識；金属キレーター；ならびに（他の）酵素標識（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、またはグルコースオキシダーゼ）を含む。

【０２０５】

本明細書に記載される、検出可能な部分を含む結合剤、特に抗体および抗体断片は、例えば、特定の標識の選択に応じて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｓｉｔｕアッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ＥＩＡおよび他の「サンドイッチアッセイ」などのそれ自体公知のイムノアッセイを含む）およびｉｎ　ｖｉｖｏ画像化目的のために使用され得る。

【０２０６】

さらなる態様は、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含むベクター、または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物、あるいは本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含むベクター、または結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物を含む医薬組成物を含むキットに関する。

【０２０７】

このようなキットは、本明細書に記載される量の結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片、またはそれをコードする核酸もしくはこのような核酸を含むベクター、または本明細書に記載される結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片を含む組成物を含む容器もしくはバイアル（薬学的に許容される容器またはバイアルなどの任意の好適な容器またはバイアル）を含み、さらに、例えば、意図される適応症（サルベコウイルス感染症の予防的または治療的処置）および潜在的な副作用に関する情報を含む、医療用リーフレットまたはパッケージリーフレットなどのキット挿入物をさらに含む医薬キットまたは医薬品キットであり得る。医薬キットまたは医薬品キットは、例えば、本明細書に記載される結合剤、特に抗体または抗原結合断片、それをコードする核酸、このような核酸を含むベクター、または結合剤、特に抗体または抗原結合断片を含む組成物を対象に投与するための注射器をさらに含み得る。

【０２０８】

このようなキットはまた、本明細書に記載される量の結合剤、特に抗体または抗原結合断片、例えば検出可能な部分を含む結合剤、特に抗体またはその抗原結合断片を含む容器

またはバイアル（薬学的に許容される容器またはバイアルなどの任意の好適な容器またはバイアル）を含む診断キットであってもよい。このような診断キットは、例えば、検出可能な部分を検出するための１つもしくは複数の試薬、および／または例えば、試料中のサルベコウイルスを検出するための前記結合剤、特に抗体もしくは抗原結合断片の使用方法に関する説明書をさらに含んでもよい。

【０２０９】

本発明をその具体的な実施形態と併せて説明したが、前述の説明に鑑みて、多くの代替案、変更例、および変形例が当業者に明らかであることは明らかである。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲の趣旨および広い範囲において、以下のようなすべての代替案、修正例、および変形例を包含することを意図する。

【０２１０】

本発明のある特定の態様および実施形態は、以下の番号付けされた記載に示されている：

（１） ウイルス膜に近位のサルベコウイルスのスパイクタンパク質のヘプタッドリピート２（ＨＲ２）ドメインの領域に特異的に結合することを特徴とする、サルベコウイルスを中和することが可能な結合剤。

（２） 前記結合剤が、配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｉ１１７９からアミノ酸Ｅ１２０２まで、好ましくはアミノ酸Ｄ１１８４からアミノ酸Ｅ１２０２まで、より好ましくはアミノ酸Ｖ１１８９からアミノ酸Ｅ１２０２までに位置するＨＲ２ドメインの領域に、またはその領域内に特異的に結合する、（１）に記載の結合剤。

（３） 前記結合剤が、配列番号８６において定義されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のアミノ酸Ｎ１１９２からアミノ酸Ｑ１２０１までの領域に対応するＨＲ２ドメインの領域に特異的に結合する、（１）または（２）に記載の結合剤。

（４）

－ 水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）－サルベコウイルススパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイなどのサルベコウイルススパイクタンパク質シュードウイルス中和アッセイにおいて決定された場合、１００ｎｇ／ｍｌ以下、好ましくは１０ｎｇ／ｍｌ以下、より好ましくは１ｎｇ／ｍｌ以下の５０％阻害濃度（IC_{50}）でサルベコウイルスを中和することが可能である；

－ ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２武漢株、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２アルファバリアント、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．１バリアント、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２バリアントのいずれか１つもしくは複数などのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２；ならびにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のいずれか一方もしくは両方を中和することが可能である；

－ サルベコウイルススパイクタンパク質を発現する細胞とアンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）受容体を発現する細胞との間のスパイク媒介性シンシチア形成を阻害することが可能である；ならびに／または

－ 中東呼吸器症候群コロナウイルス（ＭＥＲＳ－ＣｏＶ）に結合しない、（１）～（３）のいずれか１つに記載の結合剤。

（５） 抗体または抗体断片を含むか、またはそれからなる、（１）～（４）のいずれか１つに記載の結合剤。

（６） 免疫グロブリン単一可変ドメイン（ＩＳＶＤ）、好ましくはＶＨＨを含む、（１）～（５）のいずれか１つに記載の結合剤。

（７） ＩＳＶＤが、配列番号６３、４６、６９または７７のいずれか１つによって定義される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、配列番号６４、４７、７０、７３または７８のいずれか１つによって定義される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）、および配列番号４８、６７、７４または７９のいずれか１つによって定義される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；好ましくは、配列番号６５、７１、４９または８０のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ１、配列番号６６、７２、５０、７５または８１のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ２、および配列番号５１、６８、７６または８２のいずれか１つによって定義され

るＣＤＲ３を含む、（６）に記載の結合剤。
（８）　ＩＳＶＤが、各々独立して、配列番号１～１０のいずれかに存在するＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含み、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされ；好ましくは、ＩＳＶＤが、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３の組合せを含み、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が、配列番号１～１０に記載される配列のうちの特定の１つに存在する通りであり、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３が、Ｋａｂａｔ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ、ＩＭＧＴ、ＡｂＭ、ＭａｒｔｉｎまたはＣｈｏｔｈｉａのいずれか１つに従ってアノテーションされる、（６）または（７）に記載の結合剤。
（９）　ＩＳＶＤが、配列番号６３によって定義されるＣＤＲ１、配列番号６４によって定義されるＣＤＲ２、および配列番号４８によって定義されるＣＤＲ３；好ましくは、配列番号６５によって定義されるＣＤＲ１、配列番号６６によって定義されるＣＤＲ２、および配列番号５１によって定義されるＣＤＲ３；より好ましくは、配列番号５２～５４のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ１、配列番号５５～６２のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ２、および配列番号２１～２７のいずれか１つによって定義されるＣＤＲ３を含む、（６）～（８）のいずれか１つに記載の結合剤。
（１０）　ＩＳＶＤが、配列番号１～１０の群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、（７）～（９）のいずれか１つに記載の結合剤。
（１１）　配列番号１～１０の群から選択されるアミノ酸配列を含むＩＳＶＤを含む、（１）～（１０）のいずれか１つに記載の結合剤。
（１２）　多価形態であり、好ましくは、Ｆｃドメインに融合したＩＳＶＤを含む、（１）～（１１）のいずれか１つに記載の結合剤。
（１３）　（１）～（１２）のいずれか１つに記載の結合剤をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子；前記核酸分子を含むベクター；または（１）～（１２）のいずれか１つに記載の結合剤を発現するか、または前記核酸分子もしくは前記ベクターを含む細胞。
（１４）　（１）～（１２）のいずれか１つに記載の結合剤、（１３）に記載の核酸分子、もしくは（１３）に記載のベクター、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物；または（１）～（１２）のいずれか１つに記載の結合剤を含む診断キットなどのキット。
（１５）　医薬における使用、好ましくは対象におけるサルベコウイルス感染症の防止もしくは処置における使用、または対象におけるサルベコウイルス感染症の診断における使用のための、（１）～（１２）のいずれか１つに記載の結合剤、（１３）に記載の核酸分子、（１３）に記載のベクター、（１４）に記載の医薬組成物、または（１４）に記載のキット。
（１６）　試料中のサルベコウイルスを検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、
－　試料を（１）～（１２）のいずれか１つに記載の結合剤と接触させるステップと、
－　結合剤とサルベコウイルスまたはその一部との結合を決定するステップと
を含むｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏ方法。
【０２１１】
本明細書に開示された本発明の態様および実施形態は、以下の非限定的な例によってさらに裏付けられる。
【実施例】
【０２１２】
材料および方法
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ＶＨＨファージの単離
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の交差反応性ＶＨＨを得るために、

組換えプレフュージョン安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１およびＭＥＲＳ－ＣｏＶスパイクタンパク質で前もって免疫したラマに、プレフュージョンコンフォメーションで安定化した組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（Ｓ－２Ｐ）を３回追加免疫した（Ｗｒａｐｐ，Ｄ．ら（２０２０）Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂａｓｉｓ ｆｏｒ Ｐｏｔｅｎｔ Ｎｅｕｔｒａｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂｅｔａｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓｅｓ ｂｙ Ｓｉｎｇｌｅ－Ｄｏｍａｉｎ Ｃａｍｅｌｉｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．Ｃｅｌｌ １８１：１００４～１０１５．ｅ１５；Ｗｒａｐｐら（２０２０）Ｃｒｙｏ－ＥＭ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｔｈｅ ２０１９－ｎＣｏＶ ｓｐｉｋｅ ｉｎ ｔｈｅ ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６７：１２６０～１２６３頁）。免疫化後、ラマから末梢血リンパ球を単離し、免疫ＶＨＨ提示ファージミドライブラリーを構築した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に特異的なＶＨＨを提示するファージは、このファージライブラリーから、１００ｎｇのＨｉｓタグ付きＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク６Ｐタンパク質上で２回のバイオパニングを行うことにより濃縮され（Ｈｓｉｅｈら（２０２０）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ｂａｓｅｄ ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ－ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ｓｐｉｋｅｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６９：１５０１～１５０５頁）、これを１０μｇ／ｍｌのＲＢＤ－ＳＤ１－マウスＩｇＧ（Ｓｉｏｎｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）の存在下で、コーティングした抗Ｈｉｓ抗体によりマイクロタイタープレート（ＩＩ型、Ｆ９６ Ｍａｘｉｓｏｒｐ、Ｎｕｎｃ）のウェル上に固定化した。さらに、抗Ｈｉｓで捕捉したスパイクタンパク質（Ｒ３＿ＣおよびＲ４＿Ｃシリーズ）、または直接コーティングしたスパイクタンパク質（Ｒ３＿ＤＣおよびＲ４＿ＤＣシリーズ）を使用して、さらに２回のバイオパニングを実施した。また、これら２つのシリーズの追加回では、１０μｇ／ｍｌのＲＢＤ－ＳＤ１－マウスＩｇＧ（Ｓｉｏｎｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）の存在下でバイオパニングを実施した。各パニング回で、陰性対照としてコーティングしていないウェルを使用した。その後、ウェルをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）＋０．０５％のＴｗｅｅｎ ２０で５回洗浄し、１回目のパニングにおいてＰＢＳ ＳＥＡ ＢＬＯＣＫブロッキング緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中４％の粉乳で、２回目にはＰｉｅｒｃｅのプロテインフリーブロッキング緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、３回目にはＳＥＡ ＢＬＯＣＫブロッキング緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、４回目には１％のＢＳＡでブロックした。非特異的に結合したファージは、ＰＢＳ＋０．０５％のＴｗｅｅｎ ２０で広範囲に洗浄することにより除去した。保持されたファージをＴＥＡ溶液（１４％のトリメチルアミン（Ｓｉｇｍａ）、ｐＨ１０）で溶出し、その後１ＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８で中和した。採取したファージは、指数関数的に増殖する大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＧ１細胞で増幅させ、ＶＣＳ Ｍ１３ヘルパーファージを感染させ、その後、次の選択回のためにＰＥＧ８，０００／ＮａＣｌ沈殿を使用して精製した。各パンニング回後の濃縮度は、採取したファージの１０倍連続希釈液でＴＧ１細胞を感染させた後、細菌を１００μｇ／ｍＬ－アンピシリンおよび１％のグルコースを含むＬＢ寒天プレートにプレーティングすることにより決定した。

【０２１３】

ペリプラズム抽出物（ＰＥ）の調製

３または４回のパンニングの後、ファージに感染した細菌の個々のコロニーを、さらなる解析のために無作為に選択した。個々のコロニーを、２４ウェルのディープウェルプレートにおける１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを含むテリフィックブロス（ＴＢ）培地２ｍＬに接種した。個々のコロニーを３７℃で５時間増殖させた後、イソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）（１ｍＭ）を添加し、３７℃で一晩培養中にＶＨＨ発現を誘導した。ペリプラズム抽出物を調製するために、細菌細胞をペレット化し、２５０μＬのＴＥＳ緩衝液（０．２ＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８、０．５ｍＭのＥＤＴＡ、０．５Ｍのスクロース）に再懸濁し、４℃で３０分間インキュベートした。その後、３５０μＬの水を加えて浸透圧ショックを誘導した。４℃で１時間インキュベートした後、遠心分離し、ペリプラズム抽出物を回収した。

【０２１４】
ペリプラズム抽出物　－　酵素結合免疫吸着アッセイ
　ハーフウェルマイクロタイタープレートのウェルに、５０　ｎｇの組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ－２Ｐタンパク質、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ２サブユニット（ＡｃｒｏＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｓ２Ｎ－Ｃ５２Ｈ５）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ（Ｓｉｎｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ　Ｓ、ＭＥＲＳ－ＣｏＶ　Ｓ、ＨＫＵ１　ＳおよびＢＳＡを４℃で一晩コーティングした。プレートをＰＢＳ中５％の粉乳でブロックした。ペリプラズム抽出物をＰＢＳで１／１０に希釈し、ブロックしたウェルに加えた。ＶＨＨの結合はマウス抗ＨＡ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　９０１５０１、１／２０００）、次いで抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＮＡ９３１Ｖ、１／２０００）で検出した。洗浄後、５０μｌのＴＭＢ基質（テトラメチルベンジジン、ＢＤ　ＯｐｔＥＩＡ）をプレート（ｐｌａａｔｅ）に加え、５０μｌの１Ｍ　Ｈ２ＳＯ４を加えて反応を停止させた。ｉＭａｒｋ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ａｂｓｏｒｂａｎｃｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｂｉｏ　Ｒａｄ）を用いて４５０ｎｍの吸光度を測定した。非線形回帰（Ｇｒａｐｈｐａｄ　８．０）を使用してカーブフィッティングを実施した。
【０２１５】
ペリプラズム抽出物　－　シュードウイルス中和アッセイ
　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｄ６１４Ｇ）を発現するシュードウイルスを、５％の熱不活性化ＦＢＳ、１％のペニシリン、１％のストレプトマイシン、２ｍＭのＬ－グルタミン、非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）および１ｍＭのピロビン酸ナトリウムを補充したＦｌｕｏｒｏｂｒｉｔｅ　ＤＭＥＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で、ペリプラズム抽出物の１／１００希釈液と共に３７℃で３０分間インキュベートした。次に、インキュベートしたシュードウイルスを、元の増殖培地を除去したＶｅｒｏ　Ｅ６のサブコンフルエント単層に加えた。１６時間後、受動溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して細胞を溶解した。形質導入効率は、Ｔｅｃａｎ　ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　ｐｒｏプレートリーダーを使用して、調製した細胞溶解液中のＧＦＰ蛍光を測定することによって定量した。ＧＦＰ蛍光は、非感染細胞およびＰＢＳで処置した感染細胞のＧＦＰ蛍光を使用して正規化した。
【０２１６】
細胞株
　ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ２９３Ｆ細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）およびＨＥＫ２９３－Ｓ細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）は、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３発現培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中、３７℃、８％　CO_2で、１３０ｒｐｍで振盪しながら培養した。ＨＥＫ２９３－Ｔ細胞（ＡＴＣＣ）およびＶｅｒｏ　Ｅ６細胞（ＡＴＣＣ）は、１０％の熱不活性化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、１％のペニシリン、１％のストレプトマイシン、２ｍＭのｌ－グルタミン、非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）および１ｍＭのピルビン酸ナトリウムを補充したＤＭＥＭ中、５％　CO_2の存在下、３７℃で培養した。ＥｘｐｉＣＨＯ－Ｓ細胞（ＧＩＢＣＯ）は、ＥｘｐｉＣＨＯ発現培地（ＧＩＢＣＯ）中、１３０ｒｐｍで振盪しながら、３７℃、８％　CO_2で培養した。ヒトＴＭＰＲＳＳ２（ＮＩＢＩＯＨＮ、ＪＣＲＢ１８１９）（Ｍａｔｓｕｙａｍａら、ＰＮＡＳ、２０２０）を安定して発現するＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞を、１０％のＦＢＳ、ペニシリン（１００ｕｎｉｔ／ｍＬ）、ストレプトマイシン（１００ｕｇ／ｍＬ）、Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎ（Ｇ４１８）（１ｍｇ／ｍｌ）を含有するＤＭＥＭ中で培養した。Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞をアッセイに播種する場合は、Ｇｅｎｅｔｉｃｉｎを含まない培地を使用した。
【０２１７】
　Ｒａｊｉ細胞およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を安定して発現するＲａｊｉ細胞を、１０％のＦＣＳ、０．１μｇ／ｍｌのピューロマイシン、１％のペニシリン、および１％のストレプトマイシンを補充したＲＰＭＩ－１６４０培地中、３７℃、５％　CO_2で培養した。

【０２１８】
ソトロビマブ、シルガビマブ、ベブテロビマブおよびパリビズマブ
　ベブテロビマブバイオシミラー（ＰＸ－ＴＡ１７５０）、シルガビマブバイオシミラー（ＰＸ－ＴＡ１０３３）およびソトロビマブバイオシミラー（ＰＸ－ＴＡ１６３７）はＰｒｏｔｅｏｇｅｎｉｘから市販品を購入した。臨床グレードのパリビズマブはゲント大学病院（Ｇｈｅｎｔ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｈｏｓｐｉｔａｌ）から入手した。
【０２１９】
Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）（本明細書においてｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃとも呼ばれる）（配列番号９６）の生成
　Ｒ３＿ＤＣ２３のＫａｂａｔ番号付けによるヒト化（Ｑ１Ｄ、Ｑ５Ｖ、Ａ１４Ｐ、Ｄ１６Ｇ、Ｔ１９Ｒ、Ｍ６３Ｖ、Ｓ７３Ｎ、Ｄ７９Ｙ、Ｔ８２ｃＬ、Ｋ８３ＲおよびＱ１０８Ｌ；特にＴ８２ｃＬ修飾は、Ｎ８２ａ位のグリコシル化を不活性化する役割を果たし、哺乳類細胞における発現のために、ヒト化および非ヒト化の両方のバージョンで有用であり得る）バージョンは、ｇＢｌｏｃｋとしてＩＤＴで合成するよう注文されたヒトＩｇＧ１Ｆｃ（ＥＰＫＳＣｄｅｌ＿ＹＴＥ＿Ｋ４４７ｄｅｌ）に（Ｇ$_4$Ｓ）$_2$リンカーを介して融合された。到達後、ｇＢｌｏｃｋは２０ｎｇ／μＬの濃度の超純水で可溶化された。ｇＢｌｏｃｋは、ＮＥＢＮｅｘｔ－ｄＡ－テーリングモジュール（ＮＥＢ）を使用してＡ－テール化し、ＣｌｅａｎＰＣＲ磁気ビーズ（ＣｌｅａｎＮＡ）を使用して精製し、ｐｃＤＮＡ３．４－ＴＯＰＯベクター（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）に挿入した。陽性クローンのＯＲＦを完全にシーケンシングし、選択したクローンのｐＤＮＡをＮｕｃｌｅｏＢｏｎｄ　Ｘｔｒａ　Ｍｉｄｉキット（Ｍａｃｈｅｒｙ－Ｎａｇｅｌ）を使用して調製した。
【０２２０】
ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳ（本明細書においてＲ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）またはＸＶＲ０１３とも呼ばれる）（配列番号１１８）の一過的産生
　ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳをコードする遺伝子は、ＡＴＵＭの研究室でコドンを最適化し、合成し、ｐＸＬＧ６骨格ベクターにクローニングした。遺伝子とコドンの最適化後、Ｒ３ＤＣ２３　ＤＮＡ配列をｐＸＬＧ６発現ベクターに挿入し、ＣＨＯＥｘｐｒｅｓｓ（商標）細胞に４．００Ｅ＋６個の細胞／ｍｌの細胞密度でトランスフェクトした。ＴＧＥ上清を遠心分離により回収し、１０日後に細胞生存率が１０％以下になった場合にろ過（０．２μｍ）により清澄化した。タンパク質をプロテインＡでさらに精製した。
【０２２１】
ＶＨＨ７３＿Ｓ５６Ａ、ＧＢＰ、ＣＢ６およびＳ３０９の産生
　ＶＨＨ７３＿Ｓ５６Ａ、ＧＢＰ、ＣＢ６およびＳ３０９の産生は、Ｓｃｈｅｐｅｎｓら（Ｓｃｈｅｐｅｎｓら（２０２１）Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．１３：ｅａｂｉ７８２６）に記載されているように実施した。
【０２２２】
ＨＥＫ　Ｓトランスフェクションおよびタンパク質精製プロトコール；哺乳類細胞におけるＶＨＨ－ＦｃのＹＴＥバリアントの産生
　ＨＥＫ２９３－Ｓ細胞に、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を使用してＶＨＨ－Ｆｃ（Ｓ）をコードするプラスミドをトランスフェクトした。簡単に説明すると、懸濁液に適合した無血清のＨＥＫ２９３－Ｓ細胞を、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　２９３培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中に３×１０^{6}個の細胞／ｍＬで播種した。次に、４．５μｇのｐｃＤＮＡ３．３－ＶＨＨ－ＦｃプラスミドＤＮＡを細胞に添加し、３７℃および８％　CO_2で５分間の振盪プラットフォームでインキュベートした。次に、９μｇのＰＥＩを培養物に添加し、細胞をさらに５時間インキュベートした後、等しい培養容量のＥｘ－Ｃｅｌｌ－２９３（Ｓｉｇｍａ）を細胞に添加した。トランスフェクションを４日間インキュベートした後、細胞をペレット化し（１０’、３００ｇ）、上清をろ過してからさらに使用した。ＶＨＨ－Ｆｃタンパク質を精製するために、上清を５ｍＬのＭＡｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にロードした。非結合タンパク質をＭｃＩｌｖａｉｎｅ緩衝液ｐＨ７．２で洗浄し、結合タンパク質をＭｃＩｌ

ｖａｉｎｅ緩衝液ｐＨ３を使用して溶出した。溶出直後に、タンパク質を含有する画分を３０％（ｖ／ｖ）の飽和Na_3PO_4緩衝液を使用して中和した。次に、これらの画分をプールし、ＨｉＰｒｅｐ脱塩カラムにロードしてＰＢＳ、ｐＨ７．４に緩衝液交換した。

【０２２３】

さらに、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＹＴＥをＥｘｐｉＣＨＯ－Ｓ（商標）細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）において、製造業者のプロトコールに従って発現させた。簡単に説明すると、３７℃、８％　CO_2で増殖させた１ｍＬあたり６×10^6個の細胞の培養物５０ｍＬに、ＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）ＣＨＯ試薬を使用して４０μｇのｐｃＤＮＡ３．３－ＶＨＨ７２－ＦｃプラスミドＤＮＡをランスフェクトした。トランスフェクションの１日後、３００μＬのＥｘｐｉＣＨＯ（商標）エンハンサーおよび８ｍＬのＥｘｐｉＣＨＯ（商標）飼料を細胞に添加し、培養物を３２℃、５％　ＣＯ２でさらにインキュベートした。トランスフェクション後５日目に細胞の２回目の供給を行った。細胞生存率が７５％未満になった時点で、産生物を採取した。

【０２２４】

ＶＨＨ－Ｆｃタンパク質を精製するために、上清を５ｍＬのＭＡｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にロードした。非結合タンパク質をＭｃＩｌｖａｉｎｅ緩衝液ｐＨ７．２で洗浄し、結合タンパク質をＭｃＩｌｖａｉｎｅ緩衝液ｐＨ３を使用して溶出した。溶出直後に、タンパク質を含有する画分を３０％（ｖ／ｖ）の飽和Ｎａ３ＰＯ４緩衝液を使用して中和した。次に、これらの画分をプールし、ＨｉＰｒｅｐ脱塩カラムにロードしてＰＢＳ、ｐＨ７．４に緩衝液交換した。

【０２２５】

ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳの安定プールからの１Ｌスケールでのフェドバッチ産生

ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳをコードする遺伝子は、ＡＴＵＭの研究室でコドンを最適化し、合成し、ｐＸＬＧ６骨格ベクターにクローニングした。約４・10^6個の細胞／ｍｌの密度まで拡大させ、親ＣＨＯＥｘｐｒｅｓｓ（商標）細胞に発現ベクターおよびｐＸＬＧ５ヘルパーベクターを同時にトランスフェクトした。安定プールを５０ｍｇ／Ｌのピューロマイシン選択圧下（毎日適用）で作成し、さらに拡大させた。細胞生存率が９５％に達した１４日目に、安定プール研究細胞バンクをバンク化した。

【０２２６】

その後、ＲＣＢプールを１Ｌスケールでタンパク質産生用に拡大し、１２日目まで培養した（細胞密度３．５・10^7個の／ｍＬ、細胞生存率９６％）。遠心分離によって上清を回収し、ろ過（０．２μｍ）によって清澄化した。タンパク質をＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ　ＬＸ樹脂を使用して、プロテインＡでさらに精製した。２０ｍＭのリン酸ナトリウムおよび１１０ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ７．２）；１００ｍＭの酢酸ナトリウムおよび５００ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ５．５）；ならびに２０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．２）で連続洗浄を実施した。１００ｍＭの酢酸ナトリウムｐＨ３．５の溶出液は、１ＭのＴｒｉｓ　ｐＨ１１（１０％ｖ／ｖ）を加えてｐＨ７．０に中和させた。フィルター滅菌（０．２２μｍ）後、タンパク質を２ｍｇ／ｍｌで分注した。

【０２２７】

生物物理学的解析のためのタンパク質調製

生物物理学的特徴付けの前に、ＭＡｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅで精製したタンパク質試料を、微生物の増殖を防ぐために０．０２％のアジ化ナトリウムを補充したダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、または５０ｍＭのＬ－ヒスチジンおよび１５０ｍＭのＬ－アルギニン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、０．０２％のポリソルベート－２０、および０．０２％のアジ化ナトリウムを含む試料緩衝液で平衡化し、２５℃でｐＨ７．０に設定した１２℃に冷却したＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００カラム（ＧＥ－Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）においてサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によりさらに精製した。フィルター滅菌（０．２２μｍ）後、１ｍｇ／ｍｌのアリコートを液体窒素中のポリプロピレンチューブにおいてスナップ凍結し、８０℃で保存した。

【０２２８】

試料組成物

精製したＶＨＨ－Ｆｃ試料は、各試料の分子組成を決定するために解析的ＳＥＣによって特徴付けられた。２５℃の温水浴で急速解凍し、１６，０００×ｇで１０分間遠心し、上清を新しいチューブに移した後、５μｇをＰＢＳで較正した多孔質粒子径２．７μｍ、ポアサイズ３００Åを有するＡｄｖａｎｃｅＢｉｏ　ＳＥＣカラム（４．６×３００ｍｍ）（Ａｇｉｌｅｎｔ）に注入した。分離は、２８０ｎｍの吸光度を１６ｎｍのバンド幅でモニターし、参照減算はなかった。さらなる品質管理のため、クマシー染色を用いる還元１５％　ＳＤＳ－ＰＡＧＥでタンパク質を分離した。

【０２２９】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントのＲＢＤ変異を含有するスパイクタンパク質を発現するＶＳＶｄｅｌＧシュードウイルス粒子の産生のためのスパイクタンパク質発現ベクターの作製

Ｄ６１４Ｇ変異を含有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質用のｐＣＧ１発現ベクターは、製造業者の説明書（Ａｌｉｇｅｎｔ）に従って、適切なプライマーを使用してＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ突然変異誘発により特定のＲＢＤ変異を導入することによって、ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－Ｓｄｅｌ１８ベクターから作製した。オミクロンＢＡ．１バリアント用のｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－Ｓｄｅｌ１８発現ベクターについては、ＢＡ．１変異（Ａ６７Ｖ、Δ６９－７０、Ｔ９５Ｉ、Ｇ１４２Ｄ、Δ１４３－１４５、Ｎ２１１Ｉ、Δ２１２、ｉｎｓ２１５ＥＰＥ、Ｇ３３９Ｄ、Ｓ３７１Ｌ、Ｓ３７３Ｐ、Ｓ３７５Ｆ、Ｋ４１７Ｎ、Ｎ４４０Ｋ、Ｇ４４６Ｓ、Ｓ４７７Ｎ、Ｔ４７８Ｋ、Ｅ４８４Ａ、Ｑ４９３Ｒ、Ｇ４９６Ｓ、Ｑ４９８Ｒ、Ｎ５０１Ｙ、Ｙ５０５Ｈ、Ｔ５４７Ｋ、Ｄ６１４Ｇ、Ｈ６５５Ｙ、Ｎ６７９Ｋ、Ｐ６８１Ｈ、Ｎ７６４Ｋ、Ｄ７９６Ｙ、Ｎ８５６Ｋ、Ｑ９５４Ｈ、Ｎ９６９Ｋ、Ｌ９８１Ｆ）ならびに隣接するＢａｍＨＩおよびＳａｌＩ制限部位を含有するコドン最適化スパイクタンパク質ヌクレオチド配列をＧｅｎｅａｒｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に注文し、ＢａｍＨＩ／ＳａｌＩ断片としてｐＣＧ１ベクターにクローニングした。ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＢＡ．２　Ｓｄｅｌ１８発現ベクターについては、ＢＡ．２変異（Ｔ１９Ｉ、ΔＬ１４－Ｐ２６、Ａ２７Ｓ、Ｇ１４２Ｄ、Ｖ２１３Ｇ、Ｇ３３９Ｄ、Ｓ３７１Ｆ、Ｓ３７３Ｐ、Ｓ３７５Ｆ、Ｔ３７６Ａ、Ｄ４０５Ｎ、Ｒ４０８Ｓ、Ｋ４１７Ｎ、Ｎ４４０Ｋ、Ｓ４７７Ｎ、Ｔ４７８Ｋ、Ｅ４８４Ａ、Ｑ４９３Ｒ、Ｑ４９８Ｒ、Ｎ５０１Ｙ、Ｙ５０５Ｈ、Ｄ６１４Ｇ、Ｈ６５５Ｙ、Ｎ６７９Ｋ、Ｐ６８１Ｈ、Ｎ７６４Ｋ、Ｄ７９６Ｙ、Ｑ９５４Ｈ、Ｎ９６９Ｋ）ならびに隣接するＢａｍＨＩおよびＳａｌＩ制限部位を含有するコドン最適化スパイクタンパク質ヌクレオチド配列をＧｅｎｅａｒｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に注文し、ＢａｍＨＩ／ＳａｌＩ断片としてｐＣＧ１ベクターにクローニングした。ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＢＡ．２．７５　Ｓｄｅｌ１８発現ベクターについては、ＢＡ．２．７５変異（Ｋ１４７Ｅ、Ｗ１５２Ｒ、Ｆ１５７Ｌ、Ｉ２１０Ｖ、Ｇ２５７Ｓ、Ｄ３３９Ｈ、Ｇ４４６Ｓ、Ｎ４６０Ｋ、Ｒ４９３Ｑ）ならびに隣接するＢａｍＨＩおよびＳａｌＩ制限部位を含有するコドン最適化スパイクタンパク質ヌクレオチド配列をＧｅｎｅａｒｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に注文し、ＢａｍＨＩ／ＳａｌＩ断片としてｐＣＧ１ベクターにクローニングした。オミクロンＢＡ．２．７５．２バリアント用のｐＣＧ１発現ベクターは、ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＢＡ．２．７５　Ｓｄｅｌ１８から、適切なｇＢｌｏｃｋ（ＩＤＴで注文）を使用し、製造業者の説明書（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）に従い、Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙクローニング技法によりＲ３４６Ｔ、Ｆ４８６Ｓ、Ｄ１１９９Ｎ変異を導入することによって作製した。

【０２３０】

オミクロンＢＡ．４／ＢＡ．５バリアント用のｐＣＧ１発現ベクターは、ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＢＡ．２　Ｓｄｅｌ１８ベクターから、適切なプライマー（ＩＤＴで注文）を使用し、製造業者の説明書（Ａｇｉｌｅｎｔ）に従い、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ突然変異誘発により、Ｈ６９－、Ｖ７０－欠失およびＬ４５２Ｒ、Ｆ４８６Ｖ、Ｒ４９３Ｑ変異

を導入することによって作製した。
【０２３１】
オミクロンＢＡ．４．６バリアント用のｐＣＧ１発現ベクターは、ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＢＡ．４　Ｓｄｅｌ１８から、適切なプライマー（ＩＤＴで注文）を使用し、製造業者の説明書（Ａｇｉｌｅｎｔ）に従い、ＧＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　突然変異誘発によりＲ３４６ＴおよびＮ６５８Ｓ変異を導入することによって作製した。
【０２３２】
オミクロンＢＦ．７バリアント用のｐＣＧ１発現ベクターは、ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＢＡ．４　Ｓｄｅｌ１８から、適切なプライマーｋ（ＩＤＴで注文）を使用し、製造業者の説明書（Ａｇｉｌｅｎｔ）に従い、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　突然変異誘発によりＲ３４６Ｔ変異を導入することによって作製した。
【０２３３】
オミクロンＢＱ．１．１バリアント用のｐＣＧ１発現ベクターは、ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＢＡ．５　Ｓｄｅｌ１８ベクターから、適切なプライマー（ＩＤＴで注文）を使用し、製造業者の説明書（Ａｇｉｌｅｎｔ）に従い、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ突然変異誘発により、Ｒ３４６Ｔ、Ｋ４４４ＴおよびＮ４６０Ｋ変異を導入することによって作製した。
【０２３４】
オミクロンＸＢＢバリアント用のｐＣＧ１発現ベクターは、ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＢＡ．２　Ｓｄｅｌ１８から、適切なｇＢｌｏｃｋ（ＩＤＴで注文）を使用し、製造業者の説明書（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）に従い、Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙクローニング技法によりＶ８３Ａ、Ｙ１４４－、Ｈ１４６Ｑ、Ｑ１８３Ｅ、Ｖ２１３Ｅ、Ｄ３３９Ｈ、Ｒ３４６Ｔ、Ｌ３６８Ｉ、Ｖ４４５Ｐ、Ｇ４４６Ｓ、Ｎ４６０Ｋ、Ｆ４８６Ｓ、Ｆ４９０Ｓ、Ｒ４９３Ｑ変異を導入することによって作製した。オミクロンＸＢＢ．１．５バリアント用のｐＣＧ１発現ベクターは、ｐＣＧ１－ＳＡＲＳ－２－ＸＢＢ　Ｓｄｅｌ１８から、適切なプライマー（ＩＤＴで注文）を使用し、製造業者の説明書（Ａｇｉｌｅｎｔ）に従い、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ突然変異誘発によりＦ４８６Ｐ変異を導入することによって作製した。
【０２３５】
シーケンシング後、正しいスパイクコード配列を含有するクローンをＱｉａｇｅｎプラスミドＱｉａｇｅｎキットを使用して調製した。使用前に、調製したｐＣＧ１ベクターのスパイクコード配列をサンガーシーケンシングで確認した。
【０２３６】
疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）アッセイ
見かけの疎水性は、シリカに結合したエチル官能基とアミド官能基の混合集団からなる固定相を含有するＤｉｏｎｅｘ　ＰｒｏＰａｃ　ＨＩＣ－１０カラム、１００ｍｍ×４．６ｍｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　０６３６５５）を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）アッセイを使用して評価した。すべての分離は、ＵＶ／ＶＩＳ検出器を備えたＡｇｉｌｅｎｔ　１１００／１２６０　ＨＰＬＣで行った。カラム温度は終始２５℃に維持し、流速は０．８ｍｌ／分であった。ＨＩＣに使用した移動相は、（Ａ）１．６Ｍの硫酸アンモニウムと５０ｍＭのリン酸　ｐＨ７．０、および（Ｂ）５０ｍＭのリン酸　ｐＨ７．０であった。タンパク質と較正試料を緩衝液Ａで１：１に希釈し、カラムに注入した。Ｂ５０％で５分間保持した後、結合タンパク質をＢ５０％からＢ１００％まで５０分間で直線勾配で溶出し、その後Ｂ１００％で５分間保持した。カラムをＢ１００％、次に５０ｍＭの酢酸アンモニウム　ｐＨ５で洗浄し、次の試料の前に、Ｂ５０％で１０分間、再平衡化した。分離は、２８０ｎｍの吸光度を１６ｎｍのバンド幅でモニターし、リファレンス差し引きはなかった。
【０２３７】
タンパク質の質量分析
インタクトなＶＨＨタンパク質（１０μｇ）を最初にトリス（２－カルボキシエチル）

ホスフィン（ＴＣＥＰ；１０ｍＭ）を用いて３７℃で３０分間還元し、その後、ＬＴＱ Ｏｒｂｉｔｒａｐ ＸＬ質量分析計（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｃｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）にオンライン接続したＵｌｔｉｍａｔｅ ３０００ ＨＰＬＣシステム（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｂｒｅｍｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）で還元タンパク質を分離した。簡単に説明すると、約８μｇのタンパク質をＺｏｒｂａｘ ３００ ＳＢ－Ｃ１８カラム（５μｍ、３００Å、１×２５０ｍｍ ＩＤｘＬ；Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に注入し、１００μｌ／分の流速で５％～８０％の溶媒Ｂまで３０分間の勾配を使用して分離した（溶媒Ａ：水中、０．１％のギ酸および０．０５％のトリフルオロ酢酸；溶媒Ｂ：アセトニトリル中、０．１％のギ酸および０．０５％のトリフルオロ酢酸）。カラム温度は６０℃に維持した。溶出タンパク質は、以下のパラメータを使用し、ＥＳＩ供給源を用いて質量分析計に直接スプレーした：スプレー電圧４．２ｋＶ、表面誘起解離３０Ｖ、キャピラリー温度３２５℃、キャピラリー電圧３５Ｖ、およびシースガス流量７（任意単位）。質量分析計は、オービトラップアナライザーを使用し、分解能１００，０００（ｍ／ｚ ４００）および質量範囲６００～４０００ｍ／ｚのプロファイルモードにてＭＳ１モードで動作させた。得られたＭＳスペクトルは、ＢｉｏＰｈａｒｍａ ＦｉｎｄｅｒＴＭ ３．０ソフトウェア（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｃｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）でＸｔｒａｃｔデコンボリューションアルゴリズム（同位体分解スペクトル）を使用してデコンボリューションした。デコンボリューションされたスペクトルは、手動でアノテーションされた。

【０２３８】

大腸菌によるＶＨＨの産生

大腸菌におけるＶＨＨの産生のために、目的のＶＨＨを含有するｐＭＥＣＳベクターをＷＫ６細胞（非サプレッサー大腸菌株）に形質転換し、アンピシリンを含有するＬＢプレートにプレーティングした。翌日、クローンをピックアップし、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび１％のグルコースを含有する２ｍＬのＬＢ中、３７℃で２００ｒｐｍで振盪しながら一晩増殖させた。この前培養液１ｍｌを使用して、１００μｇ／ｍｌのアンピシリン、２ｍＭの$MgCl_2$および０．１％のグルコースを補充した２５ｍｌのＴＢ（テリフィックブロス）に接種し、３７℃でＯＤ６００が０．６～０．９になるまで振盪しながら（２００～２５０ｒｐｍ）インキュベートした。ＩＰＴＧを最終濃度１ｍＭまで添加することによって、ＶＨＨ産生を誘導した。これらの誘導された培養物を、２００ ｒｐｍで振盪しながら２８℃で一晩インキュベートした。産生されたＶＨＨをペリプラズムから抽出し、Ｗｒａｐｐら（２０２０．Ｃｅｌｌ １８１：１００４－１０１５．ｅ１５）に記載されているように精製した。つまり、ＶＨＨはＮｉセファロースビーズ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して溶液から精製した。５００ｍＭのイミダゾールを使用する溶出後、ＶＨＨを含有するフロースルー画分をＶｉｖａｓｐｉｎカラム（５ｋＤａカットオフ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いてＰＢＳで緩衝液交換した。精製したＶＨＨは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびクマシー染色、ならびにインタクトな質量分析によって分析した。

【０２３９】

酵素結合免疫吸着アッセイ

マイクロタイタープレート（タイプＩＩ、Ｆ９６ Ｍａｘｉｓｏｒｐ、Ｎｕｎｃ）のウェルに、１００ ｎｇの組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ Ｓ－６Ｐタンパク質（Ｈｓｉｅｈら．２０２０）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１ Ｓ－２Ｐタンパク質（フォルドンを含む）、Ｈｉｓタグ付きＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＲＢＤ（Ｓｉｎｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ２サブユニット（ＡＣＲＯｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、組換えＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２ Ｓ－２Ｐ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｓ－６Ｐタンパク質、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質、組換えＭＥＲＳ－ＣｏＶスパイクタンパク質、組換えＨＫＵ１スパイクタンパク質、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ オミクロンＢＡ．１Ｓタンパク質（ＡＣＲＯｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、マウスＦｃタグ付きＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＲＢＤ（Ｓｉｎｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）、またはＢＳＡを、４℃で一晩コーティングし

た。コーティングしたプレートをＰＢＳ中５％の粉乳でブロックした。ＶＨＨまたはＶＨＨ－Ｆｃｓまたは抗体の希釈系列をウェルに加え、９０分間インキュベートした。洗浄後、ＨＲＰがコンジュゲートしたウサギ抗ラクダ科ＶＨＨ抗体（Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ）またはマウス抗ＨＡ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　９０１５０１、１／２０００）、次いで抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＮＡ９３１Ｖ、１／２０００）でプレートを順次インキュベートすることによって結合を検出した。ＶＨＨ－Ｆｃｓまたは従来のヒトモノクローナル抗体の結合は、ウサギ抗ヒトＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ）、次いでＨＲＰがコンジュゲートした抗ウサギＩｇＧ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）によって検出した。洗浄後、５０μＬのＴＭＢ基質（テトラメチルベンジジン、ＢＤ　ＯｐｔＥＴＡ）をプレートに加え、５０μＬの１Ｍ　H_2SO_4を加えて反応を停止させた。ｉＭａｒｋ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ａｂｓｏｒｂａｎｃｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｂｉｏ　Ｒａｄ）を用いて４５０ｎＭの吸光度を測定した。非線形回帰（Ｇｒａｐｈｐａｄ　８．０）を使用してカーブフィッティングを実施した。

【０２４０】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶスパイクタンパク質を発現するＨＥＫ２９３細胞への結合のフローサイトメトリー解析

フローサイトメトリーにより哺乳類細胞表面のスパイクタンパク質へのＶＨＨの結合を調べるために、本発明者らは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質のコード配列を含有するｐＣＧ１発現プラスミドを使用し、そこからＣ末端１８アミノ酸を欠失させ、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ部位特異的突然変異誘発（Ａｇｉｌｅｎｔ）によって、製造業者の説明書に従って、Ｄ６１４Ｇ置換を導入した（６１４Ｇ）。スパイク発現プラスミドまたは対照発現プラスミドのいずれかと組み合わせたＧＦＰ発現プラスミドをＨＥＫ２９３－Ｔ細胞にトランスフェクトした２日後、細胞を採取した。以降の操作はすべて氷上で行った。細胞をＰＢＳで１回洗浄し、１％のＢＳＡでブロックした。細胞を抗体またはＶＨＨ希釈系列で９０分間染色し、その後１％のＢＳＡを含有するＰＢＳで３回洗浄した。ＶＨＨの結合はマウス抗Ｈｉｓタグ抗体（Ｂｉｏｒａｄ）とＡＦ６４７がコンジュゲートしたロバ抗マウスＩｇＧ抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して検出した。ＶＨＨ－Ｆｃｓまたは抗体の結合はロバ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して検出し、死細胞はＬｉｖｅ／Ｄｅａｄ染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して染色した。０．５％のＢＳＡを含有するＰＢＳで３回洗浄した後、ＢＤ　ＬＳＲＩＩフローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用してフローサイトメトリーによって細胞を解析した。結合曲線は非線形回帰（Ｇｒａｐｈｐａｄ　８．０）を使用してフィッティングした。

【０２４１】

ＦｃＲｎ結合親和性

精製した組換えヒトＦｃＲｎ／ＦＣＧＲＴ－Ｂ２Ｍタンパク質への抗体結合の表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）による解析は、ＦａｉｒＪｏｕｒｎｅｙ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ（Ｐｏｒｔｏ、Ｐｏｒｔｕｇａｌ）によってＢｉａｃｏｒｅ　８　Ｋ＋機器において実施した。Ｈｉｓタグ付き組換えヒトＦｃＲｎ／ＦＣＧＲＴ－Ｂ２Ｍヘテロ二量体タンパク質はＡｃｒｏ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓから購入した。ベブテロビマブバイオシミラーおよびヒトＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体をアッセイの対照として使用した。簡単に説明すると、Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）または対照抗体をアミンカップリングによってＣＭ５センサーチップ（Ｃｙｔｉｖａ）に低密度で固定化し、固定化レベルを１３０～２８３ＲＵとした。ｐＨ６．０では、ヒトＦｃＲｎ／ＦＣＧＲＴ－Ｂ２Ｍヘテロ二量体タンパク質を、１．５μＭ（アンカーポイント）の溶液中で、対照抗体固定化チャネルでは１０００ｎＭ～７．８ｎＭの範囲で８ステップの２倍希釈系列、Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）固定化チャネルでは２５０ｎＭ～０．９７ｎＭの範囲で９ステップの２倍希釈系列で注入した。ｐＨ７．４では、ヒトＦｃＲｎ／ＦＣＧＲＴ－Ｂ２Ｍヘテロ二量体タンパク質を、１．５μＭ（アンカーポイント）の溶液中で、すべての固定化チャネルに対して１０００ｎＭ～７．８ｎＭの範囲で８ステップの２倍希釈系列で注入した。解析物の注入はラ

ンニング緩衝液中で１分間、３０μｌ／分で行い、ブランク参照として濃度０ｎＭのアッセイを含めた。ＳＰＲランニング緩衝液は、ｐＨ６．０／ｐＨ７．４の０．０５　Ｔｗｅｅｎ　２０を含む１×ＰＢＳを含有した。マルチサイクル動力学プロトコールを適用し（オフレート測定９０秒）、２５０ｎＭを超える抗体またはＶＨＨ－Ｆｃ濃度から得られたデータは、バルク効果のため省略した。二重参照減算の後、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｉｎｓｉｇｈｔ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅの定常状態親和性事前定義評価法を使用するか、または同ソフトウェアにおいて１：１結合モデルをフィッティングすることによってデータを解析した。

【０２４２】

ヒト細胞膜タンパク質セルアレイ

Ｒｅｔｒｏｇｅｎｉｘ　Ｃｅｌｌ　Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＵＫ）を使用して、試験抗体の特異的オフターゲット結合相互作用をスクリーニングした。第１に、トランスフェクトされていないＨＥＫ２９３細胞およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＦＬスパイク６－ＨＩＳタンパク質をオーバーレイした細胞に対する各試験抗体のバックグラウンド結合のレベルを決定するために、プレスクリーニングを実施した。これらのデータは、その後のスクリーニングの適合性と最適濃度の評価に使用した。第２に、ライブラリースクリーニングでは、試験抗体のプールを、６１０１個の全長ヒト細胞膜タンパク質、分泌タンパク質および細胞表面に係留されたヒト分泌タンパク質、ならびに３９６個のヒトヘテロ二量体を過剰発現した固定ＨＥＫ２９３細胞に対する結合についてスクリーニングした。これによりライブラリー相互作用を同定した。最後に、Ｃｏｎｆｉｒｍａｔｉｏｎスクリーニングでは、すべてのライブラリー相互作用を再発現させ、試験抗体を個別に、または対照処置でプローブし、もしあれば、どの相互作用が再現性があり、各試験抗体に対して特異的であるかを決定した。これを固定細胞と生細胞の両方で実施した。

【０２４３】

プレスクリーニングのために、スライドにＺｓＧｒｅｅｎ１とヒトＣＤ２０またはＥＧＦＲとの両方をコードする発現ベクターをスポットして使用し、ＨＥＫ２９３細胞にリバーストランスフェクトした。スライドを固定し、次に、ゼラチン＋／－　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（Ｐｅａｋ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓによって供給されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＦＬスパイク６－ＨＩＳタンパク質、０．２ｍｇ／ｍＬでスポットした）をスポットした。１、２．５または１０μｇ／ｍＬのＲ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）と１μｇ／ｍＬのリツキシマブバイオシミラーまたはＰＢＳのみを固定後に上記の細胞／スライドに添加した。標的発現細胞およびトランスフェクトされていない細胞への結合は、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　６４７標識抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（ＡＦ６４７抗ｈＩｇＧ　Ｆｃ）検出抗体を使用し、それに続く蛍光画像化により評価した。ライブラリースクリーニングのために、ＺｓＧｒｅｅｎ１と全長ヒト細胞膜タンパク質、分泌タンパク質、または細胞表面に係留されたヒト分泌タンパク質との両方をコードする６１０１個の発現ベクターと、さらに３９６個のヒトヘテロ二量体を、細胞マイクロアレイスライドに二連で整列させた。続いて、追加のスライドにゼラチン＋／－　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（０．２ｍｇ／ｍＬ）をスポットした。発現ベクター（ｐＩＲＥＳ－ｈＥＧＦＲ－ＩＲＥＳ－ＺｓＧｒｅｅｎ１）を、すべてのスライドに四連でスポットし、すべてのスライドでトランスフェクション効率の最小閾値が達成されたか、またはそれを超えたことを確認するために使用した。ヒトＨＥＫ２９３細胞をリバーストランスフェクション／発現に使用した。細胞固定後、試験抗体のプールを各スライドに添加した。結合の検出は、Ｐｒｅ－ｓｃｒｅｅｎで使用したのと同じ蛍光二次抗体（ＡＦ６４７　ａｎｔｉ－ｈＩｇＧ　Ｆｃ）を使用して行った。試験抗体プールは、２枚の複製スライドセットに対してスクリーニングした。ＩｍａｇｅＱｕａｎｔソフトウェア（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、バージョン８．２）を使用して蛍光画像を解析し、定量した（トランスフェクションについて）。タンパク質の相互作用は、バックグラウンドレベルと比較してシグナルが上昇した二連のスポットとして定義した。これは目視検査によって達成された。相互作用は、二連の

スポットの強度によって、「強い、中程度、弱いまたは非常に弱い」に分類した。有意な相互作用は、シグナル強度が弱いかそれより大きいと定義した。確認スクリーニングでは、ライブラリースクリーニングにおいて同定したすべての相互作用をコードするベクターと、ＣＤ２０（陽性対照）およびＥＧＦＲ（トランスフェクションおよび陰性対照）をコードする対照ベクターとを整列させ、新しいスライド上のＨＥＫ２９３細胞で発現させた。確認スクリーニングのスライドおよび解析は、細胞固定後（ｎ＝２）または固定なし（ｎ＝１）のいずれかでライブラリースクリーニングとして行った。固定したスライドのみに、ゼラチン＋／－　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質（０．２ｍｇ／ｍＬ）をスポットした。スライドは２．５μｇ／ｍＬのＲ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）または２０μｇ／ｍＬのＩｇＧカッパ抗体（陰性対照）、１μｇ／ｍＬのリツキシマブバイオシミラー（アレイ陽性対照）、または試験分子なし（二次のみ；陰性対照）で処置した。標的発現細胞およびトランスフェクトされていない細胞への結合は、蛍光画像化により再度評価した。

【０２４４】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶシュードウイルス中和アッセイ

複製欠損ＶＳＶシュードタイプ化ウイルスを作製するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１ＳまたはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓをトランスフェクトした ＨＥＫ２９３－Ｔ細胞に、ｅＧＦＰおよびホタルルシフェラーゼ発現カセットを含有する複製欠損ＶＳＶベクターを接種した（ＢｅｒｇｅｒおよびＺｉｍｍｅｒ　２０１１、ＰｌｏＳ　Ｏｎｅ　６：ｅ２５８５８ならびにＨｏｆｆｍａｎｎら（２０２０）Ｃｅｌｌ　１８１：２７１～２８０．ｅ８）。３７℃で１時間のインキュベーション後、接種液を除去し、細胞をＰＢＳで洗浄し、抗ＶＳＶ　Ｇ　ｍＡｂ（ＡＴＣＣ）を補充した培地で１６時間インキュベートした。次いで、シュードタイプ化粒子を採取し、遠心分離によって清澄化した。

【０２４５】

ＶＳＶシュードタイプの中和実験のために、シュードウイルスを精製したＶＨＨもしくはＶＨＨ－Ｆｃ融合体、またはＧＦＰ結合タンパク質（ＧＢＰ：ＧＦＰに特異的なＶＨＨ）の異なる希釈液と共に３７℃で３０分間インキュベートした。インキュベートしたシュードウイルスを、次にＶｅｒｏ　Ｅ６またはＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞のサブコンフルエントな単層に添加した。１６時間後、受動溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して細胞を溶解した。形質導入効率は、Ｔｅｃａｎ　ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　ｐｒｏプレートリーダーを使用して、調製した細胞溶解液中のＧＦＰ蛍光を測定することによって定量した。ＧＦＰ蛍光は、非感染細胞およびＰＢＳで処置した感染細胞のＧＦＰ蛍光、または各希釈系列の最低および最高ＧＦＰ蛍光値のいずれかを使用して正規化した。IC_{50} は、ｌｏｇ（阻害剤）対応答（４つのパラメータ）の非線形回帰曲線フィッティングによって計算した。

【０２４６】

あるいは、ＶＨＨまたは抗体の希釈系列を、初期分離株由来のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＧＦＰ発現複製－コンピテントＶＳＶウイルス粒子１００ＰＦＵと混合した。注目すべきは、このウイルスクローン（Ｓ１－１０ａ）をＶｅｒｏ　Ｅ６細胞で増殖させる間に、フューリン切断部位が変異し、それ自体が不活性化されたことである（Ｋｏｅｎｉｇら（２０２１）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３７１：ｅａｂｅ６２３０）。３７℃で３０分間のインキュベーション後、ウイルス－抗体混合物をＶｅｒｏ　Ｅ６細胞の単層に添加し、３日間感染および複製させた。

【０２４７】

シュードタイプ化ＶＳＶウイルス粒子を使用するすべての中和アッセイでは、ＶＨＨまたは抗体－ウイルス混合物を調製するために、５％の熱不活性化ＦＢＳ、１％のペニシリン、１％のストレプトマイシン、２ｍＭのｌ－グルタミン、非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）および１ｍＭのピルビン酸ナトリウムを補充したＦｌｕｏｒｏＢｒｉｔｅ　ＤＭＥＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用した。元の増殖培地を除去した細胞に混合液を加えた。

【０２４８】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２プラーク低減中和試験（ＰＲＮＴ）
真正ウイルスを使用するプラーク低減アッセイは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２株ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２／ヒト／ＦＲＡ／７０２／２０２０（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｖｉｒｕｓ Ａｒｃｈｉｖｅ（ＥＶＡＧ）から入手した）およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＢＡ．１ウイルス（Ｐｌａｎａｓら（２０２２）Ｎａｔｕｒｅ ６０２：６７１～６７５頁）を用いて実施し、Ｖｅｒｏ Ｅ６細胞上で増殖させた。ウイルスのさらなる増殖はＶｅｒｏ Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞で行った。
【０２４９】
両ウイルスとも、プラークアッセイを使用して滴定し、このアッセイでは、Ｖｅｒｏ Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞の単層を、２％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）において調製した希釈系列に、各ウイルス２バイアルずつ二連で感染させた。感染の２時間後に、アビセルを最終濃度０．３％（ｗ／ｖ）になるように添加した。
【０２５０】
別個の構築物の用量依存的中和は、異なる濃度（５倍連続希釈）の構築物を４０ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２と混合し、混合物を３７℃で１時間インキュベートすることによって評価した。次いで、ＶＨＨ－ウイルスミックスを１２ウェルプレート中のＶｅｒｏ Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞単層に加え、３７℃で１時間インキュベートした。その後、アビセルを最終濃度０．３％（ｗ／ｖ）になるように添加した。３７℃で２日間のインキュベーション後、オーバーレイを取り除き、細胞を３．７％のパラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、０．５％のクリスタルバイオレットで染色した。中和力価の最大半量（$PRNT_{50}$）は、独立した２枚のプレートでプラークが５０％低下したＶＨＨ－Ｆｃ濃度として定義した。
【０２５１】
生ウイルスアッセイ
生ウイルスアッセイは、２０２０年１月から２０２２年７月の間に患者／旅行者から採取された鼻咽頭ぬぐい液から単離した異なる系統（６１４Ｇ、デルタ、オミクロンＢＡ．１、オミクロンＢＡ．２およびオミクロンＢＡ．５）に属するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスを用いて実施した。
【０２５２】
【表５】

	名称	単離日
WT	SARS-CoV-2 単離株 BavPat1/2020; ドイツ; 2020 年 2 月 9 日	2020 年 1 月 1 日
Delta	SARS 関連コロナウイルス 2, 単離株 hCoV-19/USA/MD-HP05647/2021	2021 年 4 月 27 日
BA.1	SARS-CoV-2 hCoV-19/オランダ/NH-RIVM-72291/2021	2021 年 11 月 29 日
BA.2	臨床単離株 hCoV-19/オランダ/VCB-20220303-1/2022	2022 年 3 月 3 日
BA.5	臨床単離株 hCov19/NL/VCB-20220714-2/2022	2022 年 7 月 14 日

【０２５３】
試験項目、陽性対照（ベブテロビマブバイオシミラー、シルガビマブバイオシミラー、ソトロビマブバイオシミラー）および陰性対照（アイソタイプ対照）の用量依存的中和を、生ウイルス中和アッセイにおいて評価した。生きたＤ６１４Ｇ、デルタ、ＢＡ．１およびＢＡ．２ ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２が試験されたすべてのアッセイでは、一過的にトランスフェクトされた細胞から産生されたｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳを使用した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ ＢＡ．５が試験されたすべてのアッセイでは、安定細胞プールから産生されたｈｕＲ３ＤＣ２３＿Ｆｃ＿ＬＳを使用した。各バリアントについて、３回の独立した実行を行った。アッセイには、細胞のみ（培地のみ）、ウイルスのみ、および内部陽性

対照（ヒト血清）という異なる系の対照が含まれた。簡単に説明すると、試験項目と対照の５倍希釈液または７倍希釈液を、一定量のウイルスと共に室温で１時間インキュベートした。

【０２５４】

【表６】

ウイルス	ストック力価 (TCID50/mL)	希釈率
D614G	6.77	200x
Delta	6.7	100x
オミクロンA.1	6.13	40x
オミクロンA.2	4.84	10x
オミクロンA.5	5.89	20x

【０２５５】

Ｖｅｒｏ－Ｅ６細胞単層にウイルス抗体混合物を３７℃で１時間接種した。次のステップでは、接種液を除去し、感染培地（２ｍＭのＬ－グルタミン、１×非必須アミノ酸、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｎ－２－ヒドロキシエチルピペラジン－Ｎ－２－エタンスルホン酸）、１％の熱不活性化ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）および１×抗生物質－抗真菌剤（Ｇｉｂｃｏ）を補充した最小必須培地（ＭＥＭ））を用いて３７℃でインキュベートした（感染後１８～２４時間まで）。その後、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２感染細胞を固定し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶヌクレオカプシド抗体（Ｓｉｎｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、カタログ番号：４０１４３－ＭＭ０５）で、続いてＨＲＰがコンジュゲートしたヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）二次抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ１６０７２）で免疫染色した。スポット（感染細胞）は、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔ（登録商標）Ａｎａｌｙｚｅｒ　Ｓ６　Ｕｌｔｉｍａｔｅ（ＣＴＬ）を使用して計数した。各抗体／構築物について、Ｚｉｅｌｉｎｓｋａ法（Ｚｉｅｌｉｎｓｋａ　ら（２００５）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　Ｊｏｕｒｎａｌ　２：８４頁）に基づき、感染の５０％の低下を示す濃度（IC_{50}）を計算した。幾何平均値は３回の独立した実行に基づいて計算した。

【０２５６】

Ｓ１脱落アッセイ

抗体またはＶＨＨを最終濃度１０μｇ／ｍｌで、スパイクなし、またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを発現する１００万個のＲａｊｉ細胞に添加した。抗体／ＶＨＨ－細胞混合物を３７℃、５％　CO_2で、３０分または１時間インキュベートした。インキュベーション後、遠心分離によって細胞をペレット化し、上清を新しいチューブに移し、細胞ペレットをＲＩＰＡ溶解緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８．０、１００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１ｍＭのＥＧＴＡ、０．１％のＳＤＳ、１％のＮＰ－４０）で溶解した。上清と溶解液の２０μｌ試料を８％のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで分離し、ニトロセルロース膜にエレクトロブロッティングした。膜を４％のミルクでブロックし、ウサギ抗ＳＡＲＳ－Ｓ１抗体（１／１０００、Ｓｉｎｏ　ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ、４０５９１－Ｔ６２）で、続いて抗ウサギＩｇＧ－ＨＲＰ（１／２０００、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＮＡ９３４Ｖ）で染色し、Ｐｉｅｒｃｅ（商標）ＥＣＬ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して展開させた。

【０２５７】

武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（ｄｅｌ－１８）でシュードタイプ化された複製－コンピテントＧＦＰレポーターＶＳＶウイルスを使用する融合阻害アッセイ

Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞を４０ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＧＦＰ発現シュードタイプ化された複製－コンピテントＶＳＶ－ＧＦＰウイルス（Ｋｏｅｎｉｇら　２０２１）で感染させた。２時間後、示したモノクローナル抗体またはＶＨＨを添加した。非感染細胞を陰性対照として使用した。細胞を一晩感染させ、蛍光顕微鏡で画

像化した。ＧＦＰ蛍光は蛍光光度計で測定した。注目すべきは、中和アッセイにおいて使用した複製－コンピテントシュードタイプ化ＶＳＶ粒子のクローンとは異なり、融合アッセイにおいて使用したウイルスのフューリン切断部位は、サンガーシーケンシングによって確認されたように、インタクトなフューリン切断部位を有したことである。

【０２５８】

スパイク発現Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞を使用する融合阻害アッセイ

Ｖｅｒｏ　Ｅ６細胞に、Ｆｕｇｅｎｅを使用して、対照発現ベクター（スパイクなし）またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク発現ベクターのいずれかと組み合わせたＧＦＰ発現ベクターをトランスフェクトした。トランスフェクションの２時間後に、ＰＢＳ、モノクローナル抗体またはＶＨＨを最終濃度１０μｇ／ｍｌまで添加した。トランスフェクションの２２時間後に、細胞を３．７％のパラホルムアルデヒドで固定し、ＰＢＳで洗浄した後、蛍光顕微鏡で画像化した。

【０２５９】

ウイルス逃避選択

９６ウェルプレートに播種したＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞の単層に、インタクトなフューリン切断部位を含有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質でシュードタイプ化された４００ＰＦＵのＧＦＰ発現複製－コンピテントＶＳＶウイルス粒子を感染させた（Ｋｏｅｎｉｇら　２０２１）。感染の２時間後に、１０μｇ／ｍｌのＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３を添加した。対照の１ウェルにはＶＨＨを添加しなかった。

【０２６０】

ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３の存在下でシンシチア形成またはウイルス複製を示したウェルの増殖培地を採取し、限界希釈により２μｇ／ｍｌ　ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３の存在下で逃避ウイルスの単一プラークを単離するために使用した。この増殖培地を使用して、ＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３存在下で、６ウェルプレートに播種したＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞の単層上でウイルスを増殖させた。これらの感染細胞から、ヌクレオスピンＲＮＡウイルスキット（Ｍａｃｈｅｒｅｙ　Ｎａｇｅｌ　Ｂｉｏａｎａｌｙｓｉｓ）を使用してＲＮＡを調製し、ランダムヘキサマープライマーを使用してｃＤＮＡを作製した。このｃＤＮＡを使用して、スパイクＳ２のコード配列をＰＣＲで増幅した。これらのＰＣＲ断片を精製し、サンガーシーケンシングを使用してシーケンシングした。得られたヌクレオチド配列を解析し、ＣＬＣ　Ｍａｉｎ　Ｗｏｒｋｂｅｎｃｈ　２０．０．４を使用して、ＷＴ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ならびにクレード１、２および３のサルベコウイルス（Ｌｅｔｋｏら（２０２０）Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　５：５　６２～５６９頁）のスパイクタンパク質にアラインした。変異は、Ｃｈａｒｍｍ－ｇｕｉ．ｏｒｇから入手した全長グリコシル化スパイクタンパク質のモデル（ＰＤＢ：６ＶＸＸ＿１＿１＿１モデル）、またはＮＭＲによって決定されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＨＲ２コイルドコイル（ＰＤＢ：３ＦＸＰ）上でｐｙｍｏｌを使用して可視化した。

【０２６１】

ウイルス逃避バリアントの増殖動力学

９６ウェルプレートに播種したＶｅｒｏ　Ｅ６細胞に、逃避選択中に得られたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＧＦＰ発現複製コンピテントＶＳＶウイルス粒子５０ＰＦＵを感染させた。ＧＦＰ発現はＩｎｃｕｃｙｔｅ　Ｚｏｏｍ装置で１時間ごとにモニターし、付属のソフトウェアで解析した。

【０２６２】

ＨＤＸ－ＭＳ　エピトープマッピング

３．３３μＭのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｓ－２Ｐ三量体を３７℃で一晩インキュベートした。次いで、このタンパク質を１×ＰＢＳ（ｐＨ７．４、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｐ４４１７）中、６．２５μＭのＲ３ＤＣ２３の存在下または非存在下で、１．６６μＭの三量体に希釈した。交換を開始するために、１×ＰＢＳを凍結乾燥し、Ｄ２Ｏ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　１５１８８２）に再懸濁することによって作製した温度平衡化重水素化緩衝液中にタンパク質を１０倍に希釈した。各時点（１５秒、３分、３０分、３時

間）で、６０　ｕｌの交換反応液を６０ｕｌの氷冷２×クエンチ緩衝液（３．６Ｍの塩化グアニジニウム、５００ｍＭのＴＣＥＰ、２００ｍＭのグリシン　ｐＨ２．４）と混合することによって、試料をクエンチした。クエンチした試料を氷上で１分間インキュベートした後、液体窒素で瞬間凍結し、ＬＣ－ＭＳまで－８０℃で保存した。ＬＣ－ＭＳおよびデータ解析は、以前に記載された通りに行った（Ｃｏｓｔｅｌｌｏ，Ｓｈｏｅｍａｋｅｒら　２０２２）。

【０２６３】

ＨＲ２の発現および精製

構造生物学の目的では、ＨＲ２タンパク質は細菌発現系で発現した。したがって、ＨＲ２タンパク質の残基Ｈ１１５９－Ｋ１２１１をコードする合成遺伝子をｐＦｌｏａｔ－ＳＵＭＯベクターにクローニングし、Ｈｉｓタグ付きＳＵＭＯ－ＨＲ２融合タンパク質を作製した。この構築物は、Ｈｉｓ－ＳＵＭＯタグを除去するための３Ｃプロテアーゼ切断部位も含有した。ｐＦｌｏａｔ－ＳＵＭＯ－ＨＲ２プラスミドをＢＬ２１（ＤＥ３）細胞に形質転換し、カナマイシン（１００μｇ／ｍｌ）を含有するＬＢ寒天プレートにプレーティングした。１００μｇ／ｍｌのカナマイシンを補充した小さなＬＢ培養物に、ＢＬ２１（ＤＥ３）（ｐＦｌｏａｔ－ＳＵＭＯ－ＨＲ２）の単一コロニーを接種し、３７℃で一晩増殖させた。その後、１ＬのＬＢ培養物にこの前培養液２０ｍｌを接種し、３７℃でＯＤ$_{600}$が０．８になるまで増殖させた。この時点で、０．５ｍＭのイソプロピルβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を使用してタンパク質発現を誘導した。細胞を２０℃で一晩さらにインキュベートした後、遠心分離（Ｂｅｃｋｍａｎローター８．１０００、５０００ｒｐｍ、１５分、４℃）により回収した。ペレットをＰＢＳ、５００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのイミダゾール、５ｍＭのβ－メルカプトエタノール、０．１ｍｇ／ｍＬの４－（２－アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリドヒドロクロリド（ＡＥＢＳＦ）、１μｇ／ｍＬのロイペプチン、５０μｇ／ｍＬのＤＮａｓｅＩ、２０ｍＭのＭｇＣｌ２に再懸濁した。フレンチプレス（Ｃｏｎｓｔａｎｔ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して２０ｋｐｓｉで細胞を溶解し、遠心分離により細胞デブリを除去した。細胞溶解液を、２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、５００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのイミダゾール、５ｍＭのβ－メルカプトエタノールで平衡化したＮｉ－セファロースＦＦ　ＨｉＬｏａｄカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にロードした。結合したタンパク質は、５００ｍＭのイミダゾールへの直線勾配を使用して溶出した。Ｈｉｓ－ＳＵＭＯ－ＨＲ２タンパク質を含有する画分をプールし、２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＮａＣｌに４℃で一晩透析した後、３Ｃプロテアーゼと室温で２時間インキュベートした。切断した試料を、同じ緩衝液で平衡化したＮｉ－セファロースＦＦ　ＨｉＬｏａｄカラムに再度ロードした。ＨＲ２タンパク質を含有するフロースルーを濃縮し、２０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＮａＣｌで平衡化したＢｉｏＲａｄ　Ｅｎｒｉｃｈ７０　１０／３０サイズ排除カラム（ＳＥＣ）にかけた。ＨＲ２を含有するＳＥＣ画分をプールした。

【０２６４】

Ｒ３ＤＣ２３－ＨＲ２の結晶化、Ｘ線データ収集、処理、および構造決定

結晶化のために、Ｒ３ＤＣ２３を１．２倍モル過剰でＨＲ２に添加し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　３ｋＤａカットオフ遠心フィルター装置を使用して１９ｍｇ／ｍｌに濃縮した。０．１ｕｌのＲ３ＤＣ２３－ＨＲ２と０．２μｌのボトム溶液とを混合し、シッティングドロップ蒸気拡散技法を使用して結晶化スクリーニングをセットアップした。結晶は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎｓ　Ｐｒｏｐｌｅｘ結晶化スクリーニングから、０．１Ｍの塩化マグネシウム六水和物、０．１Ｍのクエン酸ナトリウムｐＨ５．０、１５％のＰＥＧ４０００中で成長させた。Ｘ線データ収集のため、結晶は液体窒素中で瞬間凍結させた。Ｘ線データはＤｉａｍｏｎｄ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｏｕｒｃｅシンクロトロン施設（Ｄｉｄｃｏｔ、ＵＫ）のｉ２４ビームラインで収集した。Ｘ線データはａｕｔｏＰＲＯＣ＋Ｓｔａｒａｎｉｓｏを使用して処理した（Ｖｏｎｒｈｉｎら　２０１１　Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ　Ｄ　Ｂｉｏｌ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ　６７：２９３～

３０２頁；Ｖｏｎｒｈｅｉｎら ２０２３ Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃａ Ｓｅｃｔｉｏｎ Ａ：Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎｓ ａｎｄ Ａｄｖａｎｃｅｓ）。Ｒ３ＤＣ２３－ＨＲ２複合体の構造は、ＣＣＰ４クラウドの自動分子置き換えワークフロー（Ｋｒｉｓｓｉｎｅｌら ２０２２ Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔ Ｄ ７８：１０７９～１０８９頁）を使用して解析した。初期モデルはＣｏｏｔ（ＥｍｓｌｅｙおよびＣｏｗｔａｎ ２００４ Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ６０：２１２６～２１３２頁）で手動でさらに構築し、Ｐｈｅｎｉｘ結晶学ソフトウェアスイート（Ａｄａｍｓら ２０１０ Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ６６：２１３～２２１頁）のｐｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅ（Ａｆｏｎｉｎｅら ２０１２ Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ ６８：３５２～３６７頁）を使用して精緻化した。データ収集パラメータ、ならびに処理および精緻化統計量を表６に示す。

【０２６５】

【表７】

表 6. R3__DC23-HR2 のデータ収集統計および精密化パラメーター。[a] R_{cryst} = S||F_{obs}|−|F_{calc}||/S|F_{obs}|、F_{obs} および F_{calc} は、実測および計算された構造因子振幅である。[b] R_{free} は、精密化から除外されたデータのランダムなサブセットを使用して R_{cryst} の場合と同様。(c) 括弧内のデータは、最高分解能シェルに関する。

データセット	**R3_DC23-HR2**
データ収集	
シンクロトロン	ダイアモンド光源
ビームライン	i24
波長、Å	0.61990
データ処理	
空間群	I222
細胞パラメーター、Å (α=β=γ=90°)	90.413 98.8 150.763
解像度、Å(外側シェル)(c)	82.636 - 1.937 (2.052 - 1.937)
全反射	543617 (26260)
固有反射の数	39377 (1969)
完全性(球状)	78.1 (24.9)
完全性(楕円形)	95.2 (64.6)
多重度	13.8 (13.3)
R_{merge}, %	0.274 (2.04)
R_{pim}, %	0.076 (0.586)
<I/σ (I)>	8.3 (1.5)
CC(1/2)	0.990 (0.611)
モザイシティ、°	
精密化	
解像度の範囲、Å	82.64 – 1.94
反射の数	39359
実測されたパーセンテージ	78.02
R_{cryst},(a) %	20.81
R_{free},(b) %	25.09
RMS	
結合、Å	0.024
角度、°	3.119
ラマチャンドランプロット	
最も好ましい、%	95.56
追加的に許容される、%	2.22
許容されない、%	2.22
PDB コード	XXXX

【０２６６】

Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスにおけるｉｎ　ｖｉｖｏでのウイルス負荷

Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウス：Ｂ６．Ｃｇ－Ｔｇ（Ｋ１８－ＡＣＥ２）２Ｐｒｌｍｎ／Ｊ（７～９週齢）はＴｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入し、特定の病原体フリー（ＳＰＦ）条件下で自家繁殖させた。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染は、バイオセーフティレベル３（ＢＳＬ３）の条件下で行った。抗体による処置は体積１００μｌを使用して腹腔内注射によって行った。動物をイソフルラン吸入で麻酔し、３＊１０^{2}ＰＦＵのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇバリアントウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２／ヒト／ＦＲＡ／７０２／２０２０、Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｖｉｒｕｓ　Ａｒｃｈｉｖｅから入手）

を気管内注入によって投与した。動物は盲検観察者によって毎日モニターされ、体重変化を測定し、人道的エンドポイントについて採点した：猫背（１点）立毛（１点）、ケージを開けても動きが少ない（１点）、触っても動かない（２点）、神経症状（震え、バランス、３点）、呼吸が荒い（３点）。初期体重の２５％超を失ったマウス、または５点のスコアで人道的エンドポイントに達したマウスは安楽死させた。

【０２６７】

マウスの肺ホモジネート中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルス力価の滴定

解剖後、右肺葉を－８０℃で保存した。肺ウイルス力価を定量するために、肺試料をＰｒｅｃｅｌｌｙｓ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ組織ホモジナイザー（Ｂｅｒｔｉｎ－ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してホモジナイズした。肺ホモジネートを遠心分離（１，０００×ｇ）によって４℃で１５分間清澄化し、１２ウェルプレートを使用して二連で、ＶｅｒｏＥ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞に関するプラークアッセイによりウイルス力価を決定した。肺ホモジネート希釈系列を細胞に添加した後、プレートを３７℃で２時間インキュベートした。その後、細胞を２回洗浄し、０．３％（ｗ／ｖ）の濃度のアビセルを含有する培地においてインキュベートした。３７℃で２日間のインキュベーション後、オーバーレイを取り除き、細胞を３．７％のパラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）で固定し、０．５％のクリスタルバイオレット色素で染色してウイルスプラークを可視化した。

【０２６８】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスのＲＮＡレベルを定量するために、肺ホモジネートからＲＮＡを調製し、ｑＲＴ－ＰＣＲによって解析した。ｃＤＮＡはｉＳｃｒｉｐｔ（商標）ｃＤＮＡ合成キットとランダムヘキサマープライマーを使用して調製した。ｑＰＣＲは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｕｓｅ Ｏｎｌｙ（ＲＵＯ）ｑＰＣＲ Ｐｒｉｍｅｒｓ＆Ｐｒｏｂｅｓキット（ＩＤＴ）を使用し、製造業者の説明書に従って行った。

【０２６９】

シリアンゴールデンハムスターの負荷モデル

【０２７０】

体重８９．８ｇ～１３２．３ｇの９～１０週齢の雄のシリアンゴールデンハムスター（Ｍｅｓｏｃｒｉｃｅｔｕｓ ａｕｒａｔｕｓ）をＪａｎｖｉｅｒ（Ｆｒａｎｃｅ）から入手した。１群につき６匹のハムスターに、１０＾２．０の５０％組織培養感染用量（ＴＣＩＤ５０）／用量のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（武漢株）を、総容量体積１００μｌで両鼻孔に等分して経鼻感染させた。示した用量のＸＶＲ０１２（ＸＶＲ０１４とＸＶＲ０１３のカクテル）、ＸＶＲ０１３、またはＸＶＲ０１４、パリビズマブ（１０ｍｇ／ｋｇ）、またはベブテロビマブ（１０ｍｇ／ｋｇ）を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ２負荷の４時間後（治療的設定）、または感染のおよそ２４時間前（予防的設定）のいずれかに腹腔内注射により投与した。陰性対照として無関係な抗体パリビズマブ（Ｓｙｎａｇｉｓ、抗ＲＳＶ抗体）を使用し、陽性対照としてベブテロビマブを使用した。ハムスターの研究で使用したｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳは安定した細胞プールから産生された。ハムスターを、行動、外見および体重について毎日モニターした。感染後４日目に動物を安楽死させた。剖検時に、肉眼的病理検査を行い、異常を記録した。右肺葉から試料を採取し、ウイルス学的解析のために凍結させた。ウイルス力価を決定するために、Ｖｅｒｏ Ｅ６細胞のコンフルエント層で四連の１０倍連続希釈液を使用した。この目的のために、試料（肺組織ホモジネート）の連続希釈液をＶｅｒｏ Ｅ６単層で３７℃で１時間インキュベートした。次いで、Ｖｅｒｏ Ｅ６単層を洗浄し、３７℃で５日間または６日間インキュベートした後、プレートを染色し、生命力マーカーＷＳＴ８（比色読出し値）を使用して細胞病理効果（ＣＰＥ）に基づいてスコア化した。ウイルス力価（Ｌｏｇ１０ ＴＣＩＤ５０／ｇ）は、Ｓｐｅａｒｍａｎ－Ｋａｒｂｅｒ法（Ｋａｒｂｅｒ １９３１ Ａｒｃｈｉｖ Ｆ．Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ．Ｐａｔｈｏｌ．ｕ．Ｐｈａｒｍａｋｏｌ．１６２：４８０～４８３頁）を使用して計算した。ウイルスの滴定では、検出下限（ＬＬＯＤ）は１．１～１．３ ｌｏｇ１０ ＴＣＩＤ／ｇの範囲であった。ウイルスＲＮＡを検出するために、肺組織ホモ

ジネートを使用した。ＲＮＡを単離し、Ｔａｑｍａｎ　ＰＣＲを行った。異なる試料中のコピー数（Ｌｏｇ１０　ＣＰ／ｇ）は、各実行に含まれる標準物質に対して計算した。肺組織中のウイルスＲＮＡについては、ＬＬＯＤは３．５　Ｌｏｇ１０　ＣＰ／ｇであった。血液試料は、研究開始前の－２日目（約２００μｌをイソフルラン麻酔下で血清用に採血した）と感染後４日目（ｐ．ｉ．）の剖検時に、薬物動態解析のために採取した。血清用の血液試料は、凝固活性化剤を含有する適切なチューブに直ちに移した。血清を採取し、凍結保存した。存在する可能性のある感染性物質を不活化し、ＢＳＬ－２環境での血清試料の検査を可能にするため、感染後４日目の血清を５６℃で３０分間熱処理した。

【０２７１】

ＡＤＣＣアッセイ／ＦｃγＲＩＩＩａレポーターアッセイ

標的細胞としてＣＨＯ－Ｋ１を発現するＳＡＲＳ　ＣｏＶ－２　Ｓｐｉｋｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ標的細胞株、レポーター細胞としてＪｕｒｋａｔ　ＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６）Ｖ１７６－ＮＦＡＴ－ＲＥ　Ｌｕｃを使用して、Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ａｎａｌｙｔｉｃｓ によりＡＤＣＣ評価を行った。

【０２７２】

バイオレイヤー干渉計（ＢＬＩ）

バイオレイヤー干渉計はＯｃｔｅｔ　ＲＥＤ９６システム（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）で行った。ストレプトアビジン（ＳＡ）バイオセンサー（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）は、使用前に１×キネティクス緩衝液（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．１ｍｇ／ｍｌのウシ血清アルブミン、０．０２％のＴｗｅｅｎ－２０、０．０２％のアジ化ナトリウム）に２０分間浸した。三量体Ｓ－２Ｐ－フォルドン－Ｈｉｓ－Ｓｔｒｅｐを－２０℃から解凍し、３７℃で２４時間、続いて３０℃で３０分間インキュベートした後、ＳＡバイオセンサーに３６．５μｇ／ｍｌ（８０ｎＭ）で４５０秒間固定化し、シグナルを１．５～１．７ｎｍとした。１×キネティクス緩衝液中２０ｎＭの単量体Ｒ３ＤＣ２３　ＶＨＨから始まる２倍希釈系列の結合（１２０秒）と解離（４８０秒）を、３０℃で測定した。分析間に、バイオセンサーを再生緩衝液（１０ｍＭのグリシンｐＨ３）に５秒間３回曝露させて再生した。化学量論解析のためのｎｍ単位の応答は、生データ曲線から決定した。キネティクス解析のためのデータは、Ｏｃｔｅｔ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓソフトウェアｖ９．０（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）で二重参照減算し、互いに整列させた。全希釈系列の結合および解離は、グローバル１：１モデルでフィットさせた。

【０２７３】

実施例１：ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクのそれらのＳ２サブユニットに結合するＶＨＨの単離。

ＭＥＲＳ－ＣｏＶおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質で事前に免疫化したラマ（Ｗｒａｐｐ，Ｄ．ら（２０２０）Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　Ｂａｓｉｓ　ｆｏｒ　Ｐｏｔｅｎｔ　Ｎｅｕｔｒａｌｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｂｅｔａｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓｅｓ　ｂｙ　Ｓｉｎｇｌｅ－Ｄｏｍａｉｎ　Ｃａｍｅｌｉｄ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．Ｃｅｌｌ　１８１：１００４～１０１５．ｅ１５）を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ－２Ｐ、特に組換えプレフュージョン安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２－２ＰスパイクでＳ回連続免疫化してブーストした。

【０２７４】

ワクチン接種後、ＶＨＨコード配列を含有するファージミドライブラリーを構築し、ファージディスプレイバイオパニングに使用した。ＲＢＤ以外の部位でスパイクタンパク質を標的とするＶＨＨを得るために、各回のバイオパニングにおいて、ファージを１０μｇ／ｍｌのＲＢＤ－ＳＤ１とプレインキュベートした。抗Ｈｉｓ抗体によりＥＬＩＳＡプレート上に捕捉されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ－２Ｐで２回のバイオパニングを行った後、抗Ｈｉｓで捕捉されたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ－２Ｐ（Ｒ３ＣおよびＲ４Ｃ）または直接コーティングされたＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２－２ＰスパイクＳ－２Ｐ（Ｒ３ＤＣおよびＲ４ＤＣ）のいずれかを使用して、１または２回の追加バイオパニングを行った。得られた各ライブラリーについて、２１個または２４個のクローンをピ

ックアップし、ペリプラズムＶＨＨタンパク質発現に使用した。
【０２７５】
大腸菌でのタンパク質産生後、清澄化したペリプラズム抽出物を調製し、エクトドメイン（ＳＣ２　Ｓ）に６個のプロリン置換を含む組換えプレフュージョン安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質Ｓ－６Ｐ（Ｈｓｉｅｈら（２０２０）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ｂａｓｅｄ　ｄｅｓｉｇｎ　ｏｆ　ｐｒｅｆｕｓｉｏｎ－ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ｓｐｉｋｅｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３６９：１５０１～１５０５頁）、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ（ＳＣ２　ＲＢＤ）、およびＳ－６ＰのＳ２サブユニット（ＳＣ２　Ｓ２）に対する結合についてＥＬＩＳＡで試験した。さらに、組換え安定化ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１スパイクタンパク質（ＳＣ１　Ｓ）、ＭＥＲＳ－ＣｏＶスパイクおよびＨＫＵ１スパイクへの結合も試験した。試験した９３個のＶＨＨのうち、３０個がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２とＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１の両方のスパイクタンパク質に結合することができた（図１）。これらのＶＨＨすべてについて、結合は、スパイクタンパク質のＳ２サブユニットを対象とし、ＲＢＤには結合しなかった（図１）。これらのＶＨＨは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＲＢＤ、ＭＥＲＳ－ＣｏＶまたはＨＫＵ１のスパイクには結合しなかったが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクの結合は保持した（図２２Ａ）。興味深いことに、Ｓ２に結合するＶＨＨの大部分は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクでシュードタイプ化された水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）のウイルス粒子を効率的に中和することができた（図２２Ｂ）。
【０２７６】
ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質を認識するペリプラズム抽出物のＶＨＨコード配列の配列解析から、それぞれ１３個（ファミリー１）と２個（ファミリー２）のＶＨＨを含有する２つのファミリーに属する１５個の固有のＶＨＨ配列が明らかになった（図２）。中和ＶＨＨの配列解析から、それらは１３個の固有のＶＨＨのＶＨＨファミリー（ファミリー１）に属することが明らかになった。ＣＤＲ３配列に基づくと、ファミリー１は７つのサブファミリーに分けることができ、最小のファミリーは１つのサブファミリーを含有した（図２Ｂ）。
【０２７７】
実施例２：Ｓ２サブユニットを標的とするＶＨＨはスパイク発現細胞の表面に結合する。
ファミリー１の各サブファミリーから少なくとも１つのＶＨＨが大腸菌ＷＫ６細胞において産生され、Ｎｉ－ＮＴＡアフィニティークロマトグラフィーでペリプラズム抽出物から精製され、ＰＢＳに緩衝液交換された。産生されたＶＨＨの分子質量はインタクト質量分析で確認した。システイン結合の形成で補正した場合、各ＶＨＨの測定質量はそれぞれの理論質量に一致した（表５）。
【０２７８】

【表８】

表 5. 選択した VHH についての理論質量(Da)および VHH のインタクト質量分析法により測定された質量。試験した VHH は、単一のシステイン結合を含有すると予測され、このことが、測定値と理論値の VHH 質量間の-2Da 差を説明する。

VHH	理論質量(Da)	測定質量(Da)
R3_DC2	16658.83	16656.89
R3_C4	16553.85	16551.92
R4_DC6	16503.88	16501.98
R3_DC23	16669.83	16557.89
R3_DC9	16675.83	16673.93
R4_DC9	16553.94	16551.99
R4_DC13	16762.86	16760.96
R4_DC16	16525.80	16523.87
R3_DC20	16552.80	16550.84
R4_DC20	16610.78	16608.83

【０２７９】

ファミリー１のＶＨＨを、武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＳ－６Ｐ（図３Ａ）、ＲＢＤ（図３Ｅ）およびＳ２（図３Ｄ）ならびにオミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質（図３Ｂ）ならびにＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質（図３Ｃ）への結合についてＥＬＩＳＡで試験した。対照としてＲＢＤ特異的交差反応性モノクローナル抗体Ｓ３０９を使用した。試験したＶＨＨおよびＳ３０９はすべて、武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、オミクロンＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質に結合することができた（図３）。いずれのＶＨＨもＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＲＢＤには結合できなかったが、これらはすべてＳ２サブユニットを認識した。対照的に、Ｓ３０９はＲＢＤを認識したが、Ｓ２サブユニットには結合できなかった。

【０２８０】

Ｓ２特異的ＶＨＨが細胞膜の文脈において、スパイクタンパク質に結合できるかどうかも試験するために、ＧＦＰ発現ベクター単独、またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク発現ベクター（６１４Ｇ）と組み合わせてトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞の表面へのＲ３＿ＤＣ２３およびＲ４＿ＤＣ６の結合をフローサイトメトリーによって試験した。図４Ａは、Ｒ３＿ＤＣ２３とＲ４＿ＤＣ６の両方がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をそれらの表面に発現している細胞に強力に結合したことを例示する。スパイクタンパク質を発現していない細胞の表面では、これらのＶＨＨの結合は観察されず（図４Ｂ）、その特異性が示された。

【０２８１】

これらのＳ２を標的とするＶＨＨは、トランスフェクトされた哺乳類細胞の表面に発現したインタクトなフューリン切断部位を有するＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６４Ｇ、ＢＡ．１、ＢＡ．２、ＢＡ．５、およびＢＱ１．１のスパイクタンパク質も効率的に認識したが、ＭＥＲＳ－ＣｏＶのスパイクは認識されなかった（図２３）。

【０２８２】

実施例３：Ｓ２サブユニットを標的とするＶＨＨはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１および－２Ｓシュードタイプ化ウイルスを強力に中和する。

Ｓ２結合ＶＨＨの中和効力を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（６１４Ｇ）のスパイクでシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子を使用する中和アッセイにおいて試験した。交差中和ナノボディＶＨＨ７２－Ｓ５６Ａを参照として使用した（Ｓｃｈｅｐｅｎｓら（２０２１）Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．１３：ｅａｂｉ７８２６）。試験したＶＨＨのＶｅｒｏ　Ｅ６細胞に対する中和活性（IC_{50}）は、約１００ｎｇ／ｍｌ（Ｒ４＿ＤＣ９）～１ｎｇ

／ｍｌ未満（Ｒ３＿ＤＣ２３）までの範囲であった（図５）。ほとんどのＶＨＨはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクでシュードタイプ化されたＶＳＶを約１０ｎｇ／ｍｌ（ＥＣ$_{50}$）の効力で中和した。

【０２８３】

ウイルス付着後、スパイクタンパク質は融合ペプチドのすぐ手前のＳ２’部位で切断される。これにより融合ペプチドは標的細胞の膜に挿入され、膜融合を開始する。ＴＭプロテアーゼセリン２（ＴＭＰＲＳＳ２）をそれらの表面に発現する細胞では、融合は細胞膜で起こり得る。ＴＭＰＲＳＳ２を欠くＶｅｒｏ　Ｅ６細胞などの細胞では、融合はカテプシンＬによるＳ２’の切断後、エンドソーム内で起こる。宿主細胞の細胞膜でウイルス融合が起こった場合、Ｓ２に結合するＶＨＨが中和することができるかどうかも試験するために、ヒトＴＭＰＲＳＳ２を発現するＶｅｒｏ　Ｅ６細胞（Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２）でもそれらの中和活性を調査した。図６は、すべてのＶＨＨについて、Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞での中和活性が、ＴＭＰＲＳＳ２を欠くＶｅｒｏ　Ｅ６細胞と比較して、非常に類似しているか、またはそれより高いことを例示する（図５）。

【０２８４】

ＶＨＨの中和活性も、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクでシュードタイプ化された複製－コンピテントＶＳＶを使用して確認した（図７）Ｋｏｅｎｉｇら（２０２１）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３７１：ｅａｂｅ６２３０）。

【０２８５】

ファミリー１のＶＨＨの中和活性の活力を探るために、オミクロンＢＡ．１バリアントまたはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶを使用して中和アッセイを実施した。図８および図９は、オミクロンＢＡ．１バリアントおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質への効率的な結合（図３）と一致して、ファミリー１のＶＨＨもまた、それぞれのウイルスのスパイクでシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子を強力に中和できたことを実証する。Ｓ２を標的とするＶＨＨがより最近のＢＡ．２オミクロンバリアントも中和できるかどうかを試験するために、Ｒ３＿ＤＣ２３とＲ４＿ＤＣ６も、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２オミクロンＢＡ．２バリアントおよびオミクロンＢＡ．１バリアントのスパイク、ならびに６１４Ｇスパイクタンパクでシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子の感染を防止する能力について試験した。図１０は、Ｒ３＿ＤＣ２３とＲ４＿ＤＣ６の両方が、オミクロンＢＡ．２のスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子の感染を、オミクロンＢＡ．１のスパイクタンパク質またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の６１４Ｇスパイクでシュードタイプ化されたウイルス粒子と同様に効率的に防止できたことを実証する。

【０２８６】

単離されたＳ２サブユニットを標的とするＶＨＨの中和効力および中和の幅を評価するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のＤ６１４Ｇ、－ＢＡ．２、－ＢＡ．５、－ＸＢＢ、または－ＢＱ１．１のスパイクタンパク質を提示するＶＳＶシュードタイプを用いて中和アッセイを実施した。すべてのＶＨＨはこれらのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクシュードタイプを強力に中和することができ、細胞表面でウイルス侵入を可能にするＶｅｒｏ－Ｅ６とＶｅｒｏＥ６／ＴＭＰＲＳＳ２細胞の両方でのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に対するＩＣ$_{50}$が１．２（Ｒ３ＤＣ２３）～６８．９ｎｇ／ｍｌ（Ｒ４ＤＣ９）（８０．０～４６８０ｐＭ）の範囲であった（図２４、図６）。ＶＨＨ－Ｒ３ＤＣ２３は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｄ６１４Ｇに対するＩＣ５０が１ｎｇ／ｍｌに近く、試験したオミクロンバリアントに対するＩＣ５０が２．９～５．７ｎｇ／ｍｌで、最も強力に中和するＳ２バインダーのうちの１つであった（図２４、図６＝ＴＭＰＲＳＳ２細胞）。Ｓ２に結合するＶＨＨはまた、複製欠損シュードタイプと同様の効力で、複製中のＶＳＶ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクシュードタイプを中和した（図２５）。その結合特性と同様に、単離されたＶＨＨはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のスパイクタンパク質を有するシュードタイプも中和した（図２４）。

【０２８７】

実施例４：Ｓ２サブユニットを標的とするＶＨＨは、真正のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４ＧおよびオミクロンＢＡ．１バリアントをｉｎ　ｖｉｔｒｏで強力に中和する。

ＶＨＨを標的とする選択されたＳ２が真正のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスも強力に中和できるかどうかを試験するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４ＧおよびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　オミクロンＢＡ．１バリアントウイルスを使用して、プラーク低減アッセイを実施した。２つの異なるサブファミリーに属するＲ３＿ＤＣ２３またはＲ４＿ＤＣ６の希釈系列を、約４０ＰＦＵの両ウイルスバリアントと３７℃で１時間プレインキュベートし、その後、それを使用し、Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞に感染させた。アルファおよびオミクロンＢＡ．１バリアントを強力に中和することが知られている数少ない抗体のうちの１つである抗体Ｓ３０９を陽性対照として使用した。図１１は、Ｒ３＿ＤＣ２３とＲ４＿ＤＣ６がいずれも、Ｓ３０９よりも効率的に６１４ＧおよびオミクロンＢＡ．１ウイルスを中和できたことを実証しており、ＩＣ５０値（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４Ｇでは４．３２５±３．４９０ｎｇ／ｍｌ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＢＡ．１では４．７１１±１．９８０ｎｇ／ｍｌ、ｎ＝３）はシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子で得られた値とよく似ていた（図５～１０）。

【０２８８】

実施例５：Ｓ２サブユニットを標的とするＶＨＨは、Ｓ１スパイクサブユニットの脱落を惹起しない。

スパイクタンパク質でシュードタイプ化された非複製ＶＳＶ粒子を使用する中和アッセイは、単離したＳ２特異的ＶＨＨがウイルスの侵入をブロックすることを実証する。ＲＢＤを標的とする抗体は、ＡＣＥ２とのＲＢＤ結合をめぐる直接競合によるか、またはＳ１の脱落を早期に惹起することにより、ウイルスの付着をブロックすることで侵入を防止することができる。Ｓ１サブユニットが受容体エンゲージメントを担っているという考えと整合することに、Ｓ２を標的とするＶＨＨ　Ｒ３ＤＣ２３は、精製したＡＣＥ２－Ｆｃの組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク－２Ｐタンパク質への結合を防止しなかった（図２６Ａ）。Ｓ２に結合するＶＨＨがＳ１の脱落を誘導できるかどうかを試験するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクをそれらの表面に発現しているＲａｊｉ細胞をＳ２に結合するＶＨＨで処置した。陽性および陰性対照として、それぞれＳ１の脱落を誘導することおよび誘導しないことが知られているＣＢ６モノクローナル抗体およびＳ３０９モノクローナル抗体を使用した。さらに、陰性対照としてＧＦＰに結合するＶＨＨ（ＧＢＰ）を使用した。抗体のインキュベーション後に採取した細胞培養培地および細胞ペレットのウェスタンブロット解析から、Ｓ３０９と同様に、いずれのＶＨＨもＳ１の脱落を誘導することができないことが明らかになった（図１２）。

モノクローナル抗体ＣＢ６およびＶＨＨ７２＿Ｓ５６ＡがＳ１の脱落を誘導したのに対し、Ｒ３Ｃ４およびＲ３ＤＣ２３は誘導できなかった（図２６Ｂ）。これと同様に、Ｒ３ＤＣ２３はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを発現する細胞へのＡＣＥ２－Ｆｃの結合を防止することができなかったが、ＶＨＨ７２＿Ｓ５６Ａはこの相互作用を防止した（図２６Ｃ）。これらの結果は、Ｓ２に特異的なＶＨＨが付着後のウイルス侵入を防止することを強く示唆する。

【０２８９】

実施例６：Ｓ２サブユニットを標的とするＶＨＨは融合をブロックする。

ウイルスの付着の次に、抗体はスパイクに媒介される融合を妨害することによって、ウイルスの侵入をブロックすることもできる。選択したＶＨＨ（Ｒ３＿ＤＣ２３）が融合プロセスを妨害することができるかどうかをテストするために、Ｖｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞をＧＦＰ発現複製－コンピテントＶＳＶスパイク（武漢ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクでシュードタイプ化されたＶＳＶ－ｄｅｌＧウイルス）の低感染多重度（ＭＯＩ）で感染させ、４時間後に１０μｇ／ｍｌのＲ３＿ＤＣ２３で処置した。ウイルス融合を妨害することが知られているヒトモノクローナル抗体Ｓ３０９（ソトロビマブ）を陽性対照として使用した（Ｌｅｍｐｐら（２０２１）Ｎａｔｕｒｅ　５９８：３４２～３４７頁）。ＧＦＰを標的とするＶＨＨ（ＧＢＰ）およびＲＳＶを中和する抗体パリビズマブを陰

性対照として使用した。さらに、ＲＢＤ結合をめぐってＡＣＥ２と競合する強力な中和抗体ＣＢ６（エテセビマブ）も参考として含めた（Ｓｈｉら（２０２０）Ｎａｔｕｒｅ ５８４：１２０～１２４頁）。一晩感染させた後、細胞を固定し、プレートリーダーおよび顕微鏡解析によってＧＦＰ発現について解析した。図１３Ａは、ＧＢＰ対照ＶＨＨおよび対照抗体パリビズマブで処置した細胞について、大きなＧＦＰ発現シンシチアの形成を例示する。大きなＧＦＰ発現シンシチアは、中和ＣＢ６抗体で処置した細胞でも観察された。Ｓ３０９抗体で処置した試料では、より小さなシンシチアが観察された。際立ってこれとは対照的に、Ｓ２を標的とするＶＨＨ Ｒ３＿ＤＣ２３で処置した試料では、単一のＧＦＰ発現細胞のみを観察することができた（図１３Ａ）。Ｒ３＿ＤＣ２３によるシンシチア形成の低減は、これらの試料におけるＧＦＰ発現のレベルが明らかに低いことでも反映された（図１３Ｂ）。このことは、Ｓ２を標的とするＲ３＿ＤＣ２３の、ウイルス融合を強力に阻害することによって、シンシチアの形成を防止し、感染を抑制する能力を例示する。

【０２９０】

単離したＳ２を標的とするＶＨＨの効力を決定するために、感染が生じた後のシンシチア形成を防止する能力を、異なる濃度のＲ３＿ＤＣ２３、Ｒ３＿ＤＣ２０、およびＲ３＿Ｃ４ を用いて試験した。１０μｇ／ｍｌのＳ２を標的とするＶＨＨで処置したウェルでは、シンシチアは観察されず、個々の感染細胞のみが観察された（図１４Ａ）。対照的に、この濃度では、Ｓ３０９による処置はシンシチアの形成を防止することはできず、むしろある程度抑制することができた（図１４Ａ）。０．４μｇ／ｍｌで、Ｒ３＿ＤＣ２３は依然としてシンシチアの形成を防止することができたが、Ｒ３＿ＤＣ２０またはＲ３＿Ｃ４で処置した試料中に存在するシンシチアは、ＧＢＰまたはＳ３０９で処置した試料よりも小さかった（図１４Ａ）。Ｓ２を標的とするＶＨＨによって観察されたシンシチア形成の強い阻害は、濃度依存的なＧＦＰ発現の強い阻害にも明確に反映された（図１４Ｂ）。各ＶＨＨまたはモノクローナル抗体希釈系列では、線形回帰曲線フィッティング（可変勾配を伴うｌｏｇ（阻害剤）対正規化された応答）を使用してＩＣ５０を計算した。ＣＢ６の平均ＩＣ５０計算値（Ｎ＝２）は８．０２６μｇ／ｍｌ、Ｓ３０９では０．４０６４μｇ／ｍｌ、Ｒ３＿Ｃ４では０．０２０９２μｇ／ｍｌ、Ｒ３＿ＤＣ２０では０．０１１０４μｇ／ｍｌ、Ｒ３＿ＤＣ２３では０．００７８４０μｇ／ｍｌであった。中和データと同様に、Ｒ３＿ＤＣ２３はこの融合阻害アッセイにおいて最も強力なＶＨＨであった。

融合阻害をより直接的に試験するために、Ｓ２を標的とするＶＨＨが、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク発現によって誘導されるＶｅｒｏ Ｅ６細胞の融合をブロックすることができるかどうかを調査した。この目的のために、Ｖｅｒｏ Ｅ６細胞に、ＧＦＰ発現ベクターと組み合わせてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク発現ベクターをトランスフェクトし、２時間後にＶＨＨまたは抗体で処置した。対照発現ベクターと組み合わせたＧＦＰ発現ベクターをトランスフェクトした細胞を対照として使用した。図１５は、予想通り、Ｖｅｒｏ Ｅ６においてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質を発現させると、ＧＦＰを発現するシンシチアが形成されたことを例示する。ＲＳＶ特異的対照抗体パリビズマブまたはＰＢＳによる処置と比較して、Ｓ３０９抗体による処置はシンシチアの形成をある程度低減させた。しかし、単離したＳ２を標的とするＶＨＨであるＲ３＿ＤＣ２３およびＲ３＿Ｃ４で処置した試料では、シンシチアの形成はほぼ完全に防止された（図１５）。これらのデータは一貫して、単離したＳ２を標的とするＶＨＨがスパイクに媒介される膜融合を効率的に妨害することによって感染を防止することを示す。

【０２９１】

ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクでシュードタイプ化された複製－コンピテントＧＦＰ発現ＶＳＶによる感染後、ＲＳＤＣ２３がＶｅｒｏＥ６／ＴＭＰＲＳＳ２細胞のシンシチウム形成をブロックできるかどうかを試験した。感染の４時間後にＲＳＤＣ２３を添加すると、Ｓ３０９では中程度の阻害が観察されたのに対し（ＩＣ５０＝３２８．１±１１０．８ｎｇ／ｍｌ）、シンシチウム形成は強力に防止された（ＩＣ５０＝９．２±２．６ｎｇ／ｍｌ）（図２６Ｄ）。スパイクとＧＦＰを同時に発現するＶｅｒｏ Ｅ６細胞の融合の

動力学に対するＲ３ＤＣ２３の影響を、タイムラプス画像化によってモニターした。ＧＦＰのみを発現する細胞を含有するウェルとは対照的に、ＧＦＰとスパイクタンパク質の両方を発現する細胞を含有するウェルは、トランスフェクションの２４時間後にＧＦＰ陽性細胞の面積が著しい増加を示し、シンシチアの形成を反映した。しかしこの増加はＲ３ＤＣ２３によって強く損なわれた（図２６Ｅ）。

【０２９２】

実施例７：単離されたＶＨＨは膜近位ＨＲ２でＳ２サブユニットに結合する。

９６ウェルプレートに播種したＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２の単層に、約２００ＰＦＵのＧＦＰ発現複製－コンピテントＶＳＶｄｅｌＧ－スパイクウイルスを感染させ、１０μｇ／ｍｌのＲ３＿ＤＣ２３で処置した。真正のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスの代わりにＶＳＶ－スパイクを使用したのは、ＶＳＶの複製が著しくエラーを起こしやすいからである。シンシチアの形成とウイルスの複製をモニターするためにＧＦＰを使用した。１０μｇ／ｍｌのＲ３＿ＤＣ２３　ＧＦＰは、ＷＴウイルスのシンシチアの形成と２回目の感染を完全にブロックした（実施例６も参照されたい）。したがって、１０μｇ／ｍｌのＲ３＿ＤＣ２３の存在下で、最初に感染した細胞を越えてシンシチアが形成されたり、複製されたりすることは、ウイルスの逃避を示す可能性が高い。明らかなシンシチア形成またはウイルス複製を示したウェルの増殖培地を採取し、Ｒ３＿ＤＣ２３（２μｇ／ｍｌ）または培地のいずれかと混合した希釈系列を作製するために使用した。Ｒ３＿ＤＣ２３の非存在下および存在下の両方でウイルス複製を示した希釈系列を選択した。これらの希釈系列から単一プラークを含有したウェルを選択し、配列解析のために２μｇ／ｍｌのＲ３＿ＤＣ２３存在下で、６ウェルプレートにおいてＶｅｒｏ　Ｅ６－ＴＭＰＲＳＳ２細胞でさらに増殖させた。９つのウイルスクローンのＳ２コード配列をシーケンシングし、Ｒ３＿ＤＣ２３の非存在下で並行して増殖させた親ウイルスのものと比較した。

【０２９３】

各ウイルスクローンは、ウイルス膜の近位のスパイクストークのヘプタッドリピート領域２（ＨＲ２）内にすべて位置する、単一の非サイレント点変異を示した（図１６）。以下の５つの置換がＨＲ２内の４つの位置で同定された：Ｎ１１９２Ｄ（１／９）、Ｌ１１９７Ｐ（２／９）、Ｌ１２００Ｐ（１／９）、Ｑ１２０１Ｒ（４／９）およびＱ１２０１Ｋ（１／９）。括弧内の数字は、選択された９つの逃避バリアントの中でそれぞれの置換が観察された頻度を表す。

【０２９４】

２０２２年４月１３日にＧｌｏｂａｌ　Ｉｎｉｔｉａｔｉｖｅ　ｏｎ　Ｓｈａｒｉｎｇ　Ａｖｉａｎ　Ｉｎｆｌｕｅｎｚａ　Ｄａｔａ（ＧＩＳＡＩＤ）データベースで検索した結果、１０．２４７．０４４配列のうち、２４７、４９、２０、３５８および３８６５個の配列のみがそれぞれＮ１１９２Ｄ、Ｌ１１９７Ｐ、Ｌ１２００Ｐ、Ｑ１２０１Ｒ、Ｑ１２０１Ｋの置換を有することが明らかになった。Ｎ１１９２位、Ｌ１１９７位、Ｌ１２００位およびＱ１２０１位はそれぞれ、１４５９、７９０、１７６２および５９３１回だけ変異した。

【０２９５】

注目すべきことに、Ｎ１１９４位の潜在的なＮ－グリコシル化部位は、変異を含む限られた直鎖状配列（ＡＡ１１９２～Ｑ１２０１Ｒ）内に位置する。部位特異的質量分析により、この部位はほぼ１００％グリコシル化されていることが明らかになった（Ｗａｔａｎａｂｅら（２０２０）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３６９：３３０～３３３頁）。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、このような狭いエピトープは従来の抗体では到達しにくい可能性がある。

【０２９６】

クレード１、２および３のサルベコウイルスＳ２ステム領域の配列解析から、この配列がサルベコウイルス間で高度に保存されていることが明らかになった（図１７）。

【０２９７】

実施例８：ＨＲ２を標的とするＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３、ＶＨＨ．Ｒ３＿Ｃ４およびＶ

ＨＨ．Ｒ４ＤＣ２０のＦｃ融合体は、細胞表面に発現したスパイクタンパク質と効率的に結合し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を強力に中和することができる。

【０２９８】

ＨＲ２を標的とするＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３のＦｃ（ＹＴＥ）融合体を生成し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をそれらの表面に発現している細胞への結合について試験した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞にＧＦＰ発現ベクター単独、またはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク発現ベクター（６１４Ｇ）と組み合わせてトランスフェクトし、フローサイトメトリーによってＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）への結合について試験した。図１８は、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクをそれらの表面に発現している細胞に非常に効率よく結合できたことを例示する。際立って対照的に、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクを発現していない対照細胞に対して、１００μｇ／ｍｌまで添加したＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）の結合は観察されなかった。

【０２９９】

Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）の中和活性を試験するために、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（６１４Ｇ）のスパイクタンパク質、またはオミクロンＢＡ．２およびオミクロンＢＡ．１バリアントのスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶレポーターウイルスを使用する中和アッセイを行った。図１９は、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（６１４Ｇ）およびオミクロンＢＡ．１バリアントのスパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子を１ｎｇ／ｍｌのＥＣ５０で強力に中和できたのに対し、オミクロンＢＡ．２スパイクでシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子のＥＣ５０はわずか０．３５ｎｇ／ｍｌであったことを例示する。このことは、ＶＨＨ－Ｆｃ融合体が同定された膜近位エピトープ（実施例７を参照されたい）を効率的に認識し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２およびそのバリアントを卓越した効力で中和できることを例示する。

【０３００】

Ｒ３ＤＣ２３と同様に、さらに２つの関連ＶＨＨ（Ｒ３Ｃ４およびＲ４ＤＣ２０）のフレームワーク領域をヒト化し、Ｎ末端のグルタミンをアスパラギン残基に置き換え、これらのＳ２に結合するＶＨＨをヒトＩｇＧ１－Ｆｃ＿ＹＴＥに遺伝子融合させた。ヒト化構築物ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ（配列番号９６）、ｈｕＲ３Ｃ４－Ｆｃ（配列番号１３０）およびｈｕＲ４ＤＣ２０－Ｆｃ（配列番号１３１）を哺乳類細胞において産生し、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４ＧおよびＢＡ．５のスパイクタンパク質を提示するシュードタイプ化されたＶＳＶの中和について一価の対応物と比較した。配列番号１３０および１３１によって定義される配列も以下に示す。

【化１８】

配列番号 130

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSGGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRASGLYDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

配列番号 131

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASIRWSGGTTNYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRNSGLYDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【０３０１】

これらのＶＨＨのそれぞれについて、ヒト化Ｆｃ融合体はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４ＧおよびＢＡ．５を一価のフォーマットよりも効率的に中和し、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃが最も強力であった。さらに、Ｒ３ＤＣ２３のヒト化はｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃの中和活性に影響を与えなかった（図３０Ｂ）。生物学的製剤の開発にとって重要なパラメータはそれらの溶解度である。したがって、ＶＨＨ－Ｆｃ融合体の疎水性を疎水性相互作用クロマトグラフィーによって調査した。３つのヒト化ＶＨＨ－Ｆｃ融合構築物から、疎水性相互作用クロマトグラフィーの保持時間はｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃが最も短く、非ヒト化対応物の保持時間を下回り、臨床的に検証されたＶＨＨ－Ｆｃ　ＸＶＲ０１１の保持時間を大きく下回った。これらのデータは、溶解度と中和活性に基づいて、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃがさらなる開発に最も適していることを示す（図３０Ｅ）。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２６１４ＧおよびＢＡ．５の場合と同様に、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＢＡ．１、ＢＡ．２、ＢＡ２．７５、ＢＡ４．６、ＢＱ１．１、およびＸＢＢのスパイクタンパク質を提示するＶＳＶシュードタイプも、１ｎｇ／ｍｌに近いか、またはさらには１ｎｇ／ｍｌ未満のＩＣ５０値で強力に中和することができた（図３０Ｃ）。さらに、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃは、真正のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４ＧとＢＡ．１も強力に中和することができた（図３０Ｄ）。

【０３０２】

実施例９：ＨＲ２を標的とするＶＨＨ．Ｒ３＿ＤＣ２３のＦｃ融合は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２による致死的なウイルス負荷に対してマウスを保護することができる。

ヒトＡＣＥ２をそれらの上皮細胞表面に発現するＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスを、６１４Ｇ　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスによる致死的感染の１日前に、１００μｇのＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃまたは１００μｇのアイソタイプ対照ＩｇＧ（パリビズマブ）で処置した。処置されなかった感染マウスは対照として含まれた。図２１は、アイソタイプ対照抗体で処置したマウスまたは未処置のマウスとは際立って対照的に、Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃで処置したすべてのマウスが負荷の下で生存し、有意な体重減少を示さなかったことを例示し、Ｒ３＿ＤＣ２３－ＦｃがＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２による致命的なウイルス負荷からマウスを保護することができることを示す。

【０３０３】

実施例１０：Ｓ２に結合するＶＨＨはヘプタッドリピート２の膜近位領域に結合する（逃避ウイルス選択実験）

実施例６に従って逃避ウイルスを選択した。変異Ｌ１１９７Ｐ、Ｌ１２００Ｐ、またはＱ１２０１Ｒを有する逃避ウイルスは、Ｒ３ＤＣ２３の中和に対して完全に耐性であったが、Ｎ１１９２Ｄ変異ウイルスは、特にＶｅｒｏ　Ｅ６細胞上で、Ｒ３ＤＣ２３による中和に対して感受性のままであった（図２７Ａおよび図２７Ｂ）。これと同様に、Ｒ３ＤＣ２３はＮ１１９２Ｄ置換を有する細胞表面で発現したスパイクにはまだ結合できたが、他の逃避選択変異のいずれかを有するスパイクバリアントへの結合は失われた（図２７Ｃ）。

【０３０４】

Ｒ３ＤＣ２３の結合を消滅させる逃避ウイルスのアミノ酸は、Ｎ１１９４位のウイルス膜と大きなテトラアンテナＮ－グリカンの間に位置するスパイクの一部に限られている。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の完全なＨＲ２はＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１のものと同一であるが、ＭＥＲＳおよびＨＫＵ１では異なっている。特に、ＭＥＲＳとＨＫＵ－１の両方のＨＲ２は、ウイルス逃避変異によって獲得され、Ｒ３ＤＣ２３の結合と中和を完全に無効にするＱ１２０１Ｋ変異を含有する。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、このことはＲ３ＤＣ２３と関連するＶＨＨとがＭＥＲＳとＨＫＵ－１のスパイクを認識できないことを説明し得る。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクのプレフュージョンコンフォメーションでは、ＨＲ２の膜近位部は３本の平行なアルファヘリックスのコイルドコイルに集合し、ポストフュージョン構造に移行すると、最初は解体され、その後、ＨＲ１のコイルドコイルとジッパーで結合して安定な６ヘリックスバンドル（６ＨＢ）を形成することにより、ウイルス膜と宿主細胞膜を近接させる。融合プロセスにおける膜近位のＨＲ２領域のこの重要な機能によって、ＶＳＶシュードタイプＲ３ＤＣ２３逃避ウイルスがすべて高度に減弱された理由が説明される（図２７Ｄ）。入手可能なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－１　ＨＲ２のＮＭＲ構造によると、Ｑ１２０１は外側に向いているが、Ｌ１１９７とＬ１２００は両方、コイルドコイルの中心に向いている（図２７Ｅ）。このことは、Ｒ３ＤＣ２３がＨＲ２の開いた構造に結合するか、または１１９７位と１２００位のロイシンはＲ３ＤＣ２３と直接接触しないものの、これらの位置のプロリンへの置換がＨＲ２コイルドコイルの折りたたみに大きな影響を与えることを示す。これに対処するために、本発明者らは、ヘリックスブレーカーと考えられているプロリンの代わりにＬ１１９７Ｆ、Ｌ１１９７Ａ、Ｌ１２００Ｖ、またはＬ１２００Ａのいずれかの置換を有するスパイクムテインに対するＲ３ＤＣ２３の結合を評価した。Ｒ３ＤＣ２３は、Ｌ１１９７Ｆ、Ｌ１１９７Ａ、Ｌ１２００Ｖ、またはＬ１２００Ａ置換を有するスパイクに結合することができ、これはインタクトなＨＲ２コイルドコイル３次構造が結合に必須であることを示している（図２７Ｆ）。

【０３０５】

実施例１１：Ｓ２に結合するＶＨＨはヘプタッドリピート２の膜近位領域に結合する（ＨＤＸ－ＭＳ）

Ｒ３ＤＣ２３のエピトープをさらに確認するために、Ｒ３ＤＣ２３の存在下および非存在下で、組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクについて、質量分析による水素－重水素交換モニター（ＨＤＸ－ＭＳ）を行った。残基１１８７から１２０５までの２つの隣接するペプチド（ペプチド（１１８７ー１１９９）およびペプチド（１２００－１２０５））はＲ３ＤＣ２３の存在下で高度に保護されていることが判明した（図２７Ｇ）。重要なことは、ウイルス逃避バリアントが変異を獲得した４つの位置のすべてが、これら２つのペプチド内に位置していることである。この領域におけるナノボディのスパイクタンパク質への結合と一致して、この高度な保護はタンパク質の他の領域では見られなかった（図２７Ｈ）。これらのデータは、Ｒ３ＤＣ２３がＨＲ２の膜近位領域に結合することを一貫して示している。

【０３０６】

実施例１２：Ｒ３ＤＣ２３はＨＲ２における四級エピトープに結合する（結晶構造）

ＲＳＤＣＳとその標的との間の相互作用の詳細な洞察を得るために、完全なＨＲＳにまたがるペプチド（Ｈ１１５９－Ｋ１２１１）と複合体化したＲＳＤＣＳの結晶構造が解明された。結晶の非対称単位は、３分子のＲＳＤＣＳとの複合体におけるＨＲＳコイルドコイル三量体を示しており、それぞれが２つのＨＲＳペプチド間の界面に結合している（図２８Ａ）。ＲＳＤＣＳの結合部位はＮ１１９２からＹ１２０６残基にまたがり、ＨＲＳのＣ末端領域を包含する（図２８Ａ～図２８Ｃ）。ＲＳＤＣＳは、隣接する２つのＨＲＳヘリックスに結合し、ヘリックス（ｉ）については、４０７Å^{2}の埋もれた表面積、８つのＨ結合、２つの塩架橋、および－４．７ｋｃａｌ／ｍｏｌの計算された複合体形成のための溶媒和自由エネルギー利得Δ^{i}Ｇ（すなわち、結合に対する疎水性の寄与）、ならびにヘリックス（ｉｉ）については、４６１Å^{2}の埋もれた表面積、６つのＨ結合、１つの塩架橋、－２．４　ｋｃａｌ／ｍｏｌの計算されたΔ^{i}Ｇを包含する（図２８Ｃ、図２８Ｅ）。ＶＨＨのＣＤＲ３は複合体において主要な接触面を形成しており、Ｎ１００ａとＹ１００ｂはヘリックス（ｉｉ）においてＮ１１９４、Ｑ１２０１およびＥ１２０２、ならびにヘリックス（ｉ）においてＳ１１９６と広範なＨ結合ネットワークを形成し、Ｙ９６はヘリックス（ｉｉ）の主鎖カルボニルとＨ結合で接触し、Ｓ９８はヘリックス（ｉ）のＥ１１９５とＨ結合で相互作用し、ならびにＶ９７はヘリックス（ｉ）のＬ１２００およびＬ１２０３が形成する疎水性パッチに結合する。ＶＨＨのＣＤＲ１およびＣＤＲ２は、それぞれヘリックス（ｉ）との疎水性相互作用および２つの塩架橋（Ｒ５２　－Ｄ１１９９）に関与している（図２８Ｃ、図２８Ｅ）。Ｑ１２０１がＲＳＤＣＳ逃避変異体として同定されたことは、ＣＤＲ３とのＨ結合ネットワークの中心的役割を担っていることと一致する。しかしながら、Ｌ１１９７およびＬ１２００はＲＳＤＣＳと直接接触していないことから、逃避位置としてのそれらの活性は間接的なものであり、おそらくＨＲＳコイルドコイル界面を横切って隣接した結合エピトープの不安定化および／または構造調整の結果であると考えられる。ＲＳＤＣＳ複合体におけるＨＲＳ三量体の構造は、Ｓタンパク質のプレフュージョン形態で見られるものと密接に一致しており（図２８Ｂ）、Ｎ－グリコシル化によって覆われた膜とＨＲＳおよびリンカー領域との間の高さおよそ３ｎｍの領域に相当する（図２８Ａ）。ポストフュージョン形態では、ＨＲＳはＨＲＩコイルドコイルの表面に結合するように再配列し、それによって一対のＨＲＳ接触が破壊され、ＨＲＳのＣ末端領域が部分的にアンフォールディングされる（図２８Ａ、図２８Ｄ）。この再配列はＲＳＤＣＳ結合部位を破壊する。逆に、ＲＳＤＣＳのＨＲＳコイルドコイルへの界面結合は、プレフュージョンＳタンパク質に安定化活性を及ぼすと考えられる。

【０３０７】

実施例１３：ＲＳＤＣＳはＨＲＳにおける四級エピトープに結合する（ＥＬＩＳＡ）

ＲＳＤＣＳが単一のＨＲＳアルファ－ヘリックスを認識するのか、またはＨＲＳコイルドコイル内の四級エピトープを認識するのかを試験するために、Ｔ４フィブリチン（フォルドン）三量体化ドメインによって三量体構造で安定化した全長スパイクタンパク質と、ＳＥＣ－ＭＡＬＳ解析によって単量体であることが示されたＳＵＭＯ－ＨＲＳペプチドに対するこのＶＨＨの結合を試験した。ＲＳＤＣＳの三量体スパイクへの結合は、コーティングされた全長スパイクの量に直接相関するのに対し、ＲＳＤＣＳは高密度にコーティングされた場合にのみ単量体ＳＵＭＯ－ＨＲＳに結合した（図２９）。このことは、ＲＳＤＣＳが２個以上のＨＲＳアルファ－ヘリックスを含むＨＲＳコイルドコイル内の四級エピトープに結合することを強く示唆する。

【０３０８】

実施例１４：ヒト化ＲＳＤＣＳ　Ｆｃ融合体のＬＳ変異体は、広範なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを強力に中和する。

ＹＴＥ　Ｆｃバリアントの次に、ＬＳ（Ｍ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓ）変異もまた、低ｐＨにおけるＦｃＲｎの親和性を増加させることにより、操作された抗体の半減期を増加させる。したがって、Ｒ３＿ＤＣＳのヒト化形態が、Ｎ末端に（Ｇ$_4$Ｓ）$_2$リンカー（配列番号１２１）を介してＬＳ変異を含有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合した構築物を作製し

た（Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）またはｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳまたはＸＶＲ０１３）（配列番号１１８）。

【０３０９】

Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）またはｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳまたはＸＶＲ０１３：

【化１９】

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWGAGTIYYADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWYQDSRRYDYWGQGTLVTVSSGG
GGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG（配列番号118）

【０３１０】

ＹＴＥ　Ｆｃバリアント（ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ）で観察されたもの（図３０Ｅ）と同様に、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳは見かけの疎水性が低く（図３１Ａ）、ＳＥＣから４４～１５８ｋＤａのモル量マーカーで単一ピークで溶出され、完全にアセンブルされたＶＨＨ－Ｆｃと一致した（図３１Ｂ）。

【０３１１】

この構築物は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４Ｇ、ＢＱ１．１およびＸＢＢのスパイクタンパク質を提示するシュードタイプ化されたＶＳＶを、ＹＴＥ変異を含有するｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃで観察されたのと同様のＩＣ$_{50}$値で強力に中和する（表７および図３０Ｃ）。加えて、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＢＡ．４．６、ＢＦ．７、およびＡＣＥ２に対するＸＢＢ１．５の親和性が高くなる追加変異が適用されたＸＢＢ（ＸＢＢ．１．５－Ｇ２５２Ｖ）のスパイクでシュードタイプ化されたＶＳＶも強力に中和する（表７）。対照的に、以前に報告されたものとは異なり、ソトロビマブおよびベブレトビマブは、ＸＢＢおよびＢＱ１．１に対する中和活性の顕著な低下を示した（Ｉｍａｎｉ　ＮＥＪＭ　２０２３）。

【０３１２】

【表９】

表 7: huR3DC23-Fc__LS、ソトロビマブおよびベブテロビマブによる、SARS-CoV-2 バリアントである 614G、BA4.6、BF.7、BQ1.1、XBB、および XBB.1.5(-G252V)のスパイクタンパク質によりシュードタイプ化された VSV の中和。非線形回帰曲線フィッティング、正規化された応答に対する log(阻害剤)(4 つのパラメーター)により計算された平均 IC50 値(ng/mL)が示されている。(*)ベブテロビマブのバイオシミラーおよびソトロビマブのバイオシミラーは陽性対照として使用された。(ND*)ベブテロビマブの試験濃度範囲(0.0064～20ng/ml)内に中和活性が認められなかったため、IC50 値は計算できなかった。

IC50 ± SD (ng/mL)	huR3DC23-Fc_LS	ソトロビマブ*	ベブテロビマブ*
D614G (n=5)	0,8 ± 0,07	24,0 ± 1,27	1,4 ± 0,15
BA4.6 (n=3)	0,6 ± 0,05	1076,0 ± 109,27	0,8 ± 0,07
BF.7 (n=3)	0,6 ± 0,08	1145,0 ± 167,59	0,8 ± 0,07
BQ1.1 (n=3)	0,7 ± 0,07	1566,0 ± 232,41	ND*
XBB (n=2)	0,9 ± 0,14	282,0 ± 40,44	ND*
XBB.1.5(-G252V) (n=3)	0,5 ± 0,07	247,6 ± 24,30	ND*

【０３１３】

また、真正のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　Ｄ６１４Ｇ、デルタ、ＢＡ．１、ＢＡ．２およびＢＡ．５ウイルスはｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳによって、２，１～３．７ｎｇ／ｍｌのＩＣ５０で強力に中和され、真正のＤ６１４ＧおよびＢＡ．１　ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスを使用するウイルス中和アッセイにおいて、一価のＲ３ＤＣ２３　ＶＨＨおよびＹＴＥ変異を有するｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃで観察されたものに近かった（表８および図１１および図３０Ｄ）。

【０３１４】

【表１０】

表 8: マイクロ中和アッセイにより決定された huR3DC23-Fc__LS、ソトロビマブ、シルガミマブおよびベブテロビマブによる真正 SARS-CoV-2 ウイルス(614G、デルタ、オミクロン BA.1、オミクロン BA.2)の中和。表は、Zielinska 法に基づいて計算された幾何平均 IC50 値(ng/mL)および幾何 SD 係数(GSD 係数)を示す。(ND*)ソトロビマブの IC50 値は、試験した濃度範囲(0.128～10000ng/mL)内で決定不可能。(NT*)シルガミマブはオミクロン BA.5 について試験されなかった。(*)BA.1 についてのシルガミマブの IC50 は、シルガミマブの最高濃度(500ng/ml)がウイルス複製を 50%以上低下させた 2 つの生物学的反復に基づくが、第 3 の生物学的反復には基づかない。

ng/mL での GM IC_{50} (GSD 係数)	huR3DC23-Fc_LS	ソトロビマブのバイオシミラー	シルガミマブのバイオシミラー	ベブテロビマブのバイオシミラー
D614G (n=3)	2.5 (1.5)	205.4 (1.2)	30.9 (1.2)	3.8 (1.5)
デルタ(n=3)	3.6 (1.2)	141.1 (1.3)	28.8 (1.1)	1.6 (1.5)
オミクロン BA.1 (n=3)	3.8 (1.2)	1101.3 (2)	156.5 (2)	2.5 (1.8)
オミクロン BA.2 (n=3)	2.0 (1.6)	7147.7 (1.3)	21.2 (1.3)	1.7 (1.4)
オミクロン BA.5 (n=3)	3.6 (1.1)	ND*	NT*	2.4 (1.5)

【０３１５】

実施例１５：ヒト化Ｒ３ＤＣ２３　Ｆｃ融合体のＬＳ変異はハムスターにおけるウイルス複製を制御する

シリアンハムスターモデルにおけるｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃの治療可能性を評価した。ハムスターに先祖のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２単離株（ＢｅｔａＣｏＶ／Ｍｕｎｉｃｈ／ＢａｖＰａｔ１／２０２０）を負荷し、４時間後に１０ｍｇ／ｋｇまたは２ｍｇ／ｋｇのｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳ、１０ｍｇ／ｋｇのパリビズマブ（陰性対照処置）の１０ｍｇ／ｋｇのベブテロビマブ（バイオシミラー）のいずれかで腹腔内注射により処置した。感染の４日後に、この構築物２ｍｇ／ｋｇで処置したすべてのハムスターと１０ｍｇ／ｋｇで処置した４匹のハムスターで高レベルのｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳが検出された（データは示さず）。際立って対照的に、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳで処置した２匹の動物の血清中では、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳは全く検出することができなかったか、非常に低レベルでしか検出することができなかった。これは注入がうまくいかなかった結果である可能性が高く、他の研究者により観察されている（Ｓｔａｒｒら　２０２１　Ｎａｔｕｒｅ　５９７：９７～１０２頁）。これら２匹のハムスターを除いて、負荷後４日目にサンプリングした肺ウイルス負荷量は、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃで処置したハムスターでは検出限界未満であったのに対し、対照処置動物では肺ウイルス負荷量が有意に高かった（図３１Ｄ）。それに応じて、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳまたはベブテロビマブのいずれかで処置したハムスターの肺では、ウイルスＲＮＡの強い低減が観察された（図３１Ｅ）。この実験は、Ｓ２に結合するｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃがｉｎ　ｖｉｖｏでＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の複製を強く制限できることを示す。

【０３１６】

実施例１６：Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＬＳ）のＦｃＲｎに関する親和性評価

Ｒ３ＤＣ２３　ＶＨＨ－Ｆｃ構築物に導入されたＬＳ変異がヒト新生児受容体ＦｃＲｎの高い親和性にも関連していることを確認するために、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によってｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ－ＬＳのＦｃＲｎに対する動力学パラメータおよび平衡解離定数（K_D）を決定した（表９）。ベブテロビマブバイオシミラーおよびヒトＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体をアッセイにおける対照として使用した。

【０３１７】
【表１１】
表 9: pH 6.0 および 7.4 における FcRn に関する R3__DC23-Fc(LS)、ベブテロビマブおよびヒト IgG1 アイソタイプ対照抗体の動力学的パラメーターおよび平衡解離定数(K_D)。RU:共鳴単位; RUmax:最大共鳴単位。*1500nM における RUmax、N/D:決定されず。

	FcRn pH 6.0					FcRn pH 7.4	
	濃度範囲	定常状態での親和性		1:1 結合モデルの親和性		濃度範囲	RUmax (RU)*
		RUmax (RU)	K_D (nM)	RUmax (RU)	K_D (nM)		
R3_DC23hum-Fc(LS)	250-0.97 nM	149,8	4.5	135.2	3.5	1500-7.8 nM	22.4
ベブテロビマブ	1500-7.8 nM	57.1	19.4	N/D	N/D	1500-7.8 nM	8.2
huIgG1 アイソタイプ対照	1500-7.8 nM	37.5	15.0	N/D	N/D	1500-7.8 nM	16.2

【０３１８】
ｐＨ６．０において、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ－ＬＳは対照のベブテロビマブバイオシミラーと比較して、ＦｃＲｎに対する定常状態での親和性の改善を示した。３．５～４．５ｎＭ（それぞれ定常状態の親和性および１：１結合モデル）において、ｈｕＲ３ＤＣ２３－Ｆｃ＿ＬＳのヒトＦｃＲｎに対する親和性は、ＬＳ変異を有さないＩｇＧ１アイソタイプおよびベブテロビマブバイオシミラー対照の１／３～１／５だった（図３１Ｃおよび表７）。結合と解離の速度が速いため、対照抗体の会合速度と解離速度を決定するために１：１結合モデルを適用することはできなかった。Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＬＳ）については、定常状態および１：１結合モデルによって計算された親和性値は一致していた。ｐＨ７．４では、すべての試験項目で予想されたようにＦｃＲｎへの結合が非常に低いことが観察された。
【０３１９】
実施例１７：ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に対するＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＬＳ）の結合の特異性
特異的なオフターゲット結合の欠如を評価するために、Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）は、固定したヒトＨＥＫ２９３細胞を使用して、ヒト細胞膜タンパク質セルアレイを使用してスクリーニングされ、この細胞は、６１０１個の全長ヒト細胞膜タンパク質、分泌タンパク質および細胞表面に係留されたヒト分泌タンパク質と、さらに３９６個のヒトヘテロ二量体およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質とを個別に発現する。プレスクリーニングでは、Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）のトランスフェクトされていない固定ＨＥＫ２９３細胞、およびＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をオーバーレイした細胞への結合レベルを調べた結果、Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）の２．５μｇ／ｍＬが好適なスクリーニング濃度であることが示された。ライブラリースクリーニングでは、Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）を含む試験抗体のプールをスクリーニングした。確認スクリーニングでは、各ライブラリーの相互作用を２つの対照受容体と共に再発現させ、Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）または対照処置を用いて再試験した。これを固定細胞と生細胞の両方で実施した。
【０３２０】
Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）は、固定細胞マイクロアレイ上で、主要な標的であるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質と単一の有意な特異的相互作用を示した（図３２）。生細胞マイクロアレイでは、有意な特異的相互作用は観察されなかった（技術

的制限のため、生細胞マイクロアレイでＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質をスポットすることはできなかった）（データは示さず）。これらのデータは、Ｒ３＿ＤＣ２３ｈｕｍ－Ｆｃ（ＬＳ）の主要な標的：ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に対する高い特異性を示す。

【０３２１】

実施例１８：Ｓ１およびＳ２を標的とするＶＨＨに基づく多特異的構築物の作製

二重特異性タンデム（ＴＤ）ＶＨＨｘ－ＶＨＨｙ－Ｆｃ構築物を作製し、ここでＳ２を標的とするＶＨＨ、特にＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３のヒト化形態、およびＳ１を標的とするＶＨＨ、特にＶＨＨ３．１１７のヒト化形態を、１０、２０または３０　ＧＳリンカー、特に（$Ｇ_4Ｓ)_2$（配列番号１２１）、（$Ｇ_4Ｓ)_4$（配列番号１２３）、または（$Ｇ_4Ｓ)_6$（配列番号１２０）を介してヘッドトゥーテール融合させ、ヘッドトゥーテール融合構築物を、それぞれ、図３３（Ａ）、図３３（Ｂ）、図３３（Ｃ）に対応する１０　ＧＳリンカー（$(Ｇ_4Ｓ)_2$（配列番号１２１））、（ＴＤ　Ｒ３ＤＣ２３－１１７（１０）－Ｆｃ（配列番号１１２）、ＴＤ　Ｒ３ＤＣ２３－１１７（２０）－Ｆｃ（配列番号１１３）およびＴＤ　Ｒ３ＤＣ２３－１１７（３０）－Ｆｃ（配列番号１１４））を介してＦｃドメインに融合させた。

【０３２２】

同様に、三重特異性タンデムＶＨＨｘ－ＶＨＨｙ－ＶＨＨｚ－Ｆｃ構築物を作製し、ここで、Ｓ２を標的とするＶＨＨ、特にＶＨＨ　Ｒ３－ＤＣ２３のヒト化形態、ＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合するＳ１を標的とするＶＨＨ、特にＶＨＨ３．１１７のヒト化形態、およびＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合するＳ１を標的とするＶＨＨ、特にＶＨＨ３．８３のヒト化形態を２０　ＧＳリンカー（$(Ｇ_4Ｓ)_4$（配列番号１２３））を介してヘッドトゥーテール融合させ、このヘッドトゥーテール融合構築物を１０　ＧＳリンカー（$(Ｇ_4Ｓ)_2$（配列番号１２１））を介してＦｃドメインに融合させた（ＴＤ　Ｒ３ＤＣ２３－１１７－８３（２０）－Ｆｃ（配列番号１１７および図３３（Ｆ））。

【０３２３】

また、ＶＨＨ７２エピトープ、特にＶＨＨ３．８３のヒト化形態に結合するかまたはそれをめぐって競合するＳ１を標的とするＶＨＨ、およびＶＨＨ３．１１７エピトープ、特にＶＨＨ３．１１７のヒト化形態に結合するかまたはそれをめぐって競合するＳ１を標的とするＶＨＨを、２０　ＧＳリンカー（$(Ｇ_4Ｓ)_4$（配列番号１２３））を介してヘッドトゥーテール融合させ、このヘッドトゥーテール融合構築物を１０　ＧＳリンカー（$(Ｇ_4Ｓ)_2$（配列番号１２１））を介してＦｃドメインに融合させた（ＴＤ　８３－１１７（２０）－Ｆｃ（配列番号１１６）および図３３（Ｅ））。配列番号１１６により定義される配列も以下に示されている。

【化２０】

DVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCVLSGGVFTSYAMGWFRQAPGKEREFLAAITFNSDATYYADSVKG
RFTISRDNAKNTAYLQMNSLRPEDTAVYSCAAGGNHYNPQYYHDYDKYDHWGQGTLVTVSSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATI
TKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGT
LVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG（　配列番号 116）

【０３２４】

四価の二重特異性ＶＨＨｘ－Ｆｃ－ＶＨＨｙ融合構築物（本明細書においてムーンランダー構築物とも呼ばれる）を作製し、この構築物では、Ｓ１およびＳ２をそれぞれ標的と

する２つのＶＨＨ、特にＶＨＨ　Ｒ３＿ＤＣ２３のヒト化形態およびＶＨＨ３．１１７のヒト化形態を、それぞれ１０　ＧＳリンカー（（Ｇ$_4$Ｓ）$_2$（配列番号１２１））および１５　ＧＳリンカー（（Ｇ$_4$Ｓ）$_3$（配列番号１２２））を介してＦｃドメインのＮ末端およびＣ末端にそれぞれ融合させた（Ｒ３ＤＣ２３－Ｆｃ－１１７（配列番号１１５）および図３３（Ｄ））。

【０３２５】

使用したＦｃドメインは、ＬＳ変異（Ｍ４２８ＬをＮ４３４Ｓと組み合わせた）を含有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃであった。

【０３２６】

図３３は、異なる構築物の概略図を示す。

【０３２７】

構築物は、ピキアパストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）および／もしくはＣＨＯ細胞、または任意の代替的な好適な生産宿主で発現され、続いて、本明細書に記載される、および／または当業者に公知のように、精製ならびに生化学的および生物物理学的特徴付けを行った。

【０３２８】

実施例１９：Ｓ１およびＳ２を標的とする結合剤は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントＤ６１４Ｇ、オミクロンＢＡ．２およびＢＡ．５を中和する（生ウイルスアッセイ）

実施例１８で作製したＳ１およびＳ２を標的とする多重特異性構築物の中和効力を、生ウイルスアッセイ（マイクロ中和法）で試験した。すべての多重特異性構築物は、試験したバリアント（６１４Ｇ、オミクロンＢＡ．２およびオミクロンＢＡ．５）を中和することができた（表１０）。

【０３２９】

【表１２】

表 10: マイクロ中和法により決定された実施例 18 で生成した S1 および S2 を標的とする多特異性構築物による真正 SARS-CoV-2 バリアント(614G、デルタ、オミクロン BA.2 およびオミクロン BA.5)の中和。幾何平均 IC_{50} 値(ng/mL)が示されている。

		D614G (n=3)	オミクロン BA.2 (n = 3)	オミクロン BA.5 (n=3)
	構築物	IC50 (ng/mL)	IC50 (ng/mL)	IC50 (ng/mL)
S2	R3DC23 VHH-Fc	3,7	2,8	3,6
S1	TD 83-117 (20)- Fc	227,1	429,9	322,4
S1 + S2	TD R3DC23-117(10)-Fc	9,8	8,7	8,3
S1 + S2	TD R3DC23-117(20)-Fc	7,7	7,8	8,8
S1 + S2	TD R3DC23-117(30)-Fc	10,3	8,0	7,7
S1 + S2	R3DC23-Fc-117	14,4	10,7	11,1
S1 + S2	TD R3DC23-117-83 (20)- Fc	16,5	12,6	13,2

【０３３０】

実施例２０：Ｓ１およびＳ２を標的とする結合剤の組成物（ＸＶＲ０１２）は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質でシュードタイプ化されたＶＳＶ－ＧＦＰレポーターウイルスを中和する

ＶＨＨ－Ｆｃ構築物を作製し、ここで、Ｒ３＿ＤＣ２３のヒト化形態が、Ｎ末端に（Ｇ$_4$Ｓ）$_2$リンカー（配列番号１２１）を介してＬＳ変異を含有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合した（ＸＶＲ０１３）（配列番号１１８）。ＶＨＨｘ－Ｆｃ－ＶＨＨｙ構築物を作製し、ここで、ＶＨＨ３．１１７エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能なＳ１を標的とするＶＨＨ３．１１７のヒト化形態が、ＦｃドメインのＮ末端で

（Ｇ$_4$Ｓ）$_2$リンカー（配列番号１２１）を介してＬＳ変異を含有するヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合され、およびＶＨＨ７２エピトープに結合するかまたはそれをめぐって競合することが可能なＳ１を標的とするＶＨＨ３．８３のヒト化形態は、（Ｇ$_4$Ｓ）$_2$リンカー（配列番号１２１）を介してＣ末端に融合される（ＸＶＲ０１４）（配列番号１１９）。

【０３３１】

ＸＶＲ０１４：

【化２１】

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKGR
FTISRDNTKNTVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCVLSGG
VFTSYAMGWFRQAPGKEREFLAAITFNSDATYYADSVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLRPEDTAV
YSCAAGGNHYNPQYYHDYDKYDHWGQGTLVTVSS（配列番号 119）

【０３３２】

ＸＶＲ０１３とＸＶＲ０１４を１：１の比率で混合し、組成物またはカクテルを作製した（ＸＶＲ０１２）（図３４）。

【０３３３】

ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４の中和効力を、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２Ｄ６１４Ｇ参照株、またはＯｍｉｃｒｏｎバリアント ＢＡ．２．７５．２、ＢＡ．４．６、ＢＦ．７、ＢＱ．１．１、ＸＢＢおよびＸＢＢ．１．５のいずれかのスパイクでシュードタイプ化されたＶＳＶ粒子を使用するシュードウイルス中和アッセイにおいて試験した。陰性対照抗体（アイソタイプ対照）もアッセイに含まれた。

【０３３４】

ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４は、試験したすべてのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアント（Ｄ６１４Ｇ、オミクロンＢＡ．２．７５．２、ＢＡ４．６、ＢＦ．７、ＢＱ１．１、ＸＢＢおよびＸＢＢ．１．５）を、ＸＶＲ０１２では１．１～２３．９ｎｇ／ｍＬ、ＸＶＲ０１３では０．６ｎｇ／ｍＬ～１８，５ｎｇ／ｍＬ、およびＸＶＲ０１４では６６．８～２３９．８ｎｇ／ｍＬの範囲の平均ＩＣ$_{50}$値で中和することができた（表１１）。ＢＡ．２．７５．２バリアントに対するＸＶＲ０１２およびＸＶＲ０１３について、ＩＣ$_{50}$値のわずかな増加だけが観察された。

【０３３５】

【表１３】

表 11: 擬似ウイルス中和アッセイにおいて決定された XVR012、XVR013 および XVR014 による SARS-CoV-2 バリアント(D614G、オミクロン BA.2.75.2、BA4.6、BF.7、BQ1.1、XBB、XBB.1.5)の中和。Vero E6 細胞は、SARS-CoV-2 D614G のスパイクタンパク質または SARS-CoV-2 バリアント BA.2.75.2、BA.4.6、BF.7、BQ.1.1、XBB もしくは XBB.1.5 のスパイクタンパク質によりシュードタイプ化された VSV-GFP レポーターウイルスにより形質導入され、これらのウイルスは、異なる濃度の構築物または組成物と共にプレインキュベートされた。16 時間後、GFP 蛍光は蛍光光度計を用いて測定された。計算された平均 IC_{50} 値(ng/ml; XBB を除くすべてのバリアントについて N=3±SD)が示されている。平均 IC50 値は、非線形回帰曲線フィッティング、正規化された応答に対する log(阻害剤)(4 つのパラメーター)により計算された。

スパイク標的	抗体	D614G	BA.2.75.2	BA.4.6	BF.7	BQ.1.1	XBB	XBB.1.5
S1+S2	XVR012	1,7	23,9	1,2	1,2	1,5	1,8	1,1
S2	XVR013	0,8	18,5	0,6	0,6	0,7	0,9	0,51
S1	XVR014	47,6	180,1	57,6	66,8	186,1	239,8	152,8

【０３３６】

実施例２１：Ｓ１およびＳ２を標的とする結合剤の組成物（ＸＶＲ０１２）は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントＤ６１４Ｇ、オミクロンＢＡ．２およびＢＡ．５を中和する（生ウイルスアッセイ）

実施例２０において記載した構築物および組成物の中和効力を、生ウイルスアッセイ（マイクロ中和法）において試験した。ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４は、試験したすべてのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２バリアントを、ＸＶＲ０１２では０．６～１．９ｎｇ／ｍＬ、ＸＶＲ０１３では２．８ｎｇ／ｍＬ～３，７ｎｇ／ｍＬ、およびＸＶＲ０１４では９８～１２４．５ｎｇ／ｍＬの範囲の幾何平均$ＩＣ_{５０}$値で中和することができた。（表１２）。

【０３３７】

【表１４】

表 12: 生ウイルスによる方法で決定された実施例 20 に記載の XVR012、XVR013 および XVR014 による真正 SARS-CoV-2 バリアント(614G、デルタ、オミクロン BA.2、およびオミクロン BA.5)の中和。幾何平均 IC_{50} 値(ng/mL; N=3)が示されている。

スパイク標的	抗体	D614G	オミクロン BA.2	オミクロン BA.5
S1+S2	XVR012	1,9	1,4	0,6
S2	XVR013	3,7	2,8	3,6
S1	XVR014	124,5	98,0	117,1

【０３３８】

実施例２２：シリアンゴールデンハムスターＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷モデルにおけるＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４のｉｎ　ｖｉｖｏ有効性

実施例２０において記載したＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４のｉｎ　ｖｉｖｏ　での有効性を、シリアゴールデンハムスターの感染後負荷モデル（武漢株）に

おいて評価した。ＸＶＲ０１２の４ｍｇ／ｋｇおよび２０ｍｇ／ｋｇ、ならびにＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４の２ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇの用量を、負荷の４時間後に腹腔内投与した（治療設定）。対照動物は、ヒト呼吸器シンシチアウイルスの融合タンパク質を対象とするヒト化モノクローナル抗体であるパリビズマブ１０ｍｇ／ｋｇを受け（陰性対照）、１群の動物はベブテロビマブ１０ｍｇ／ｋｇを受けた（陽性対照）。

【０３３９】

肺におけるウイルス複製は、陽性対照と同様に、高用量と低用量の両方でＸＶＲ０１２およびＸＶＲ０１３で処置した動物で完全に消失した（図３５Ａ）。肺におけるウイルス複製に対する用量依存的な効果は、ＸＶＲ０１４に関して観察された。ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３、ＸＶＲ０１４または陽性対照による処置は、陰性対照群と比較して、肺組織におけるウイルスＲＮＡ負荷量を低減させた（図３５Ｂ）。

【０３４０】

実施例２３：ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４の抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）

実施例２０に記載されたＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４の抗体依存性細胞傷害を評価するために、ＦｃγＲＩＩＩａレポーターアッセイを実施した。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質標的細胞株を発現するＣＨＯ－Ｋ１を標的細胞として、Ｊｕｒｋａｔ　ＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６）Ｖ１７６－ＮＦＡＴ－ＲＥ　Ｌｕｃをレポーター細胞として使用した。３回の独立したアッセイの実行を行った。アッセイでは、エフェクターの標的細胞に対する比率を４０：１とし、試料はＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４では３０μｇ／ｍＬから、ＸＶＲ０１２では６０μｇ／ｍＬから開始する８点希釈系列で、３つの独立した複製として評価した（１回につき３つのアッセイプレート）。アイソタイプ対照を３０μｇ／ｍｌの単一濃度で評価した。アッセイプレートは、Ｓｔｅａｄｙ　Ｇｌｏ（発光エンドポイント）を添加する前に一晩（２１時間±１時間）インキュベートした。

【０３４１】

ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４は、用量依存的にＡＤＣＣ応答を媒介し、アイソタイプ対照（ＩＣ）またはアッセイ対照（エフェクター細胞および標的細胞）の応答と比較して、反応は実質的に大きかった（図３６）。

【０３４２】

実施例２４：シリアンゴールデンハムスターＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷モデルにおけるＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４のｉｎ　ｖｉｖｏ予防有効性

実施例２０において記載したＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４のｉｎ　ｖｉｖｏでの有効性を、シリアゴールデンハムスターの負荷モデル（武漢株）において評価した。注射のおよそ２４時間前に、１０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４と１ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３（ＸＶＲ０１２）とのカクテル、１ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３と１０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４とのカクテルを腹腔内注射により投与した。

【０３４３】

この予防的設定において、ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４で処置した動物では、肺におけるウイルス複製が消失した（図３７）。

【０３４４】

実施例２５：シリアンゴールデンハムスターＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷モデルにおけるＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３およびＸＶＲ０１４のｉｎ　ｖｉｖｏ治療有効性

５ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４と０．５ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３、１０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４と１ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３、および２０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４と２ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３（ＸＶＲ０１２）のカクテル；０．５、１および２ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１３；５、１０および２０ｍｇ／ｋｇのＸＶＲ０１４をＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２負荷の４時間後に腹腔内注射により投与した。対照動物は、１０ｍｇ／ｋｇのパリビズマブ（陰性対照）を受け、１群の動物は、１０ｍｇ／ｋｇのベブテロビマブ（陽性対照として使用された）を受けた。

【０３４５】
治療設定において、肺におけるウイルス複製は、ＸＶＲ０１２、ＸＶＲ０１３、ＸＶＲ０１４および陽性対照で処置した動物で阻害されたが、対照処置動物は肺のウイルス負荷量が多かった（図３８）。
【０３４６】
実施例２６：Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃによる予防的処置は、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染症に対してＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスを保護する
ヒトＡＣＥ２をそれらの上皮細胞表面に発現するＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスを、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇバリアントウイルスによる致死的感染の１日前に、１００μｇのＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ（ＹＴＥ）（Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃ；配列番号９６）または１００μｇのアイソタイプ対照ＩｇＧ（パリビズマブ）で腹腔内注射により処置した。パリビズマブで処置した、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染症に対して非許容性の、感染した野生型（ＷＴ）マウスを、保護のための対照として使用した。
【０３４７】
予想通り、パリビズマブで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２はすべて顕著な体重減少を示し、ウイルス負荷により死亡した。際立って対照的に、Ｒ３－ＤＣ２３－Ｆｃは、パリビズマブで処置したＷＴマウスと同様に、感染したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスを体重減少および死亡から保護した。このことは、Ｒ３－ＤＣ２３－Ｆｃが致死的なＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染症からマウスを保護できることを例示する（図３９Ａおよび図３９Ｂ）。
【０３４８】
Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃが肺におけるウイルス複製も制御できるかどうかを試験するために、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスに、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　６１４Ｇバリアントウイルスによる感染の１日前に１００μｇのＲ３＿ＤＣ２３－Ｆｃまたは１００μｇのアイソタイプ対照ＩｇＧ（パリビズマブ）を腹腔内注射により処置した。感染の５日後にマウスの一部を　　殺して肺を単離し、プラークアッセイとｑＰＣＲによるウイルス複製の定量を行い、マウスの一部は体重と死亡率のモニタリングに使用した。
【０３４９】
Ｒ３＿ＤＣ２３－Ｆｃによる処置は、Ｋ１８－ｈＡＣＥ２マウスをウイルス負荷による体重減少および致死から保護した（図４０Ａおよび図４０Ｂ）。パリビズマブで処置したすべてのＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスの肺から高レベルの複製ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスが単離されたのに対し、Ｒ３－ＤＣ２３－Ｆｃで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスまたはＷＴマウスの肺では、複製ウイルスを検出することができなかった（図４０Ｃ）。同様に、パリビズマブで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスとは対照的に、Ｒ３－ＤＣ２３－Ｆｃで処置したＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスまたはＷＴマウスの肺ではウイルスＲＮＡを検出することができなかった（図４０Ｄ）。これらのデータは、Ｒ３－ＤＣ２３－Ｆｃによる予防的処置が、高度に許容されるＫ１８－ｈＡＣＥ２マウスにおけるウイルス複製を防止または強力に低下させ得ることを示す。
【０３５０】
実施例２７：ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク２Ｐ（Ｓ－２Ｐ）タンパク質に対するＲ３＿ＤＣ２３の化学量論および結合速度論
Ｒ３＿ＤＣ２３のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク２Ｐ（Ｓ２Ｐ）結合動力学を生物層干渉法で評価した。
【０３５１】
リガンドをバイオセンサーに、それが分析物の結合に完全に利用できるように捕捉すると、リガンドと分析物との間の相互作用の化学量論は、捕捉されたリガンドの飽和時に以下の式によって決定することができる：
【数１】

$$化学量論 = \frac{応答_{解析物} \cdot MW_{リガンド}}{応答_{リガンド} \cdot MW_{解析物}}$$

【０３５２】

三連の実験は、各Ｓ－２Ｐ三量体に対するおよそ３．５モルのＲ３＿ＤＣ２３　ＶＨＨの化学量論を示し、これは、Ｓ－２Ｐ三量体における各単量体が１個のＲ３＿ＤＣ２３ＶＨＨに結合することを示唆する（表１３、図４１）。

【０３５３】

【表１５】

表 13 Strep タグで捕捉した S-2P 三量体(MW:456.4kDa; リガンド)と飽和(20nM)R3__DC13 単量体(MW:16.6kDa; 解析物)との相互作用について上記の式を使用して決定された化学量論。

実験のタイプ	反復	**S-2P 三量体 (nM での RU)**	**R3_DC23 (nM での RU)**	化学量論
動力学 20 nM***	1	1.710	0.2283	1:3.678
	2	1.725	0.2140	1:3.417
	3	1.540	0.1956	1:3.499

【０３５４】

Ｓ－２ＰとＲ３＿ＤＣ２３の２０～１．２５ｎＭ希釈系列との相互作用の会合相は、グローバルな指数関数的１：１結合モデルでは説明できなかった。解離速度はk_{off}＝２．３・１０$^{-4}$±５．２・１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$であると決定した。

【０３５５】

【表１６－１】

配列表フリーテキスト

配列番号	フリーテキスト(<223>)
1	VHH R3_C4
2	VHH R4_DC16
3	VHH R3_DC20
4	VHH R3_DC2
5	VHH R4_DC20
6	VHH R4_DC9
7	VHH R4_DC6
8	VHH R3_DC23
9	VHH R3_DC9
10	VHH R4_DC13
11	VHH R3_C4, VHH R4_DC16, VHH R3_DC20, VHH R3_DC2, VHH R4_DC20, VHH R4_DC9, VHH R3_DC23, VHH R3_DC9, VHH R4_DC13 Kabat の CDR1
12	VHH R4_DC6 Kabat の CDR1
13	VHH R3_C4, VHH R4_DC16, VHH R3_DC20 Kabat の CDR2
14	VHH R3_DC9 Kabat の CDR2
15	VHH R3_DC2 Kabat の CDR2
16	VHH R4_DC20 Kabat の CDR2
17	VHH R4_DC13 Kabat の CDR2
18	VHH R4_DC9 Kabat の CDR2
19	VHH R4_DC6 Kabat の CDR2
20	VHH R3_DC23 Kabat の CDR2
21	VHH R3_C4 Kabat の CDR3
22	VHH R4_DC16 Kabat の CDR3
23	VHH R3_DC20, VHH R3_DC9, VHH R3_DC2, VHH R4_DC20 Kabat の CDR3
22	VHH R4_DC16 Kabat の CDR3
23	VHH R3_DC20, VHH R3_DC9, VHH R3_DC2, VHH R4_DC20 Kabat の CDR3
24	VHH R4_DC13 Kabat の CDR3
25	VHH R4_DC9 Kabat の CDR3
26	VHH R4_DC6 Kabat の CDR3
27	VHH R3_DC23 Kabat の CDR3
28	VHH R3_C4, VHH R4_DC16, VHH R3_DC20 Kabat の FR1
29	VHH R3_DC9, VHH R3_DC2, VHH R4_DC20, VHH R4_DC13 Kabat の FR1
30	VHH R4_DC9 Kabat の FR1

【０３５６】

【表１６－２】

31	VHH R4_DC6 Kabat の FR1
32	VHH R3_DC23 Kabat の FR1
33	VHH R3_C4, VHH R4_DC16, VHH R3_DC20, VHH R3_DC2, VHH R4_DC20, VHH R4_DC6, HH R3_DC23, VHH R3_DC9, VHH R4_DC13 Kabat, Martin の FR2
34	VHH R4_DC9 Kabat, Martin の FR2
35	VHH R3_C4 Kabat の FR3
36	VHH R4_DC16 Kabat の FR3
37	VHH R3_DC20 Kabat の FR3
38	VHH R3_DC9 Kabat の FR3
39	VHH R3_DC2 Kabat の FR3
40	VHH R4_DC20 Kabat の FR3
41	VHH R4_DC13 Kabat の FR3
42	VHH R4_DC9 Kabat の FR3
43	VHH R4_DC6 Kabat の FR3
44	VHH R3_DC23 Kabat の FR3
45	VHH R3_C4, VHH R4_DC16, VHH R3_DC20, VHH R3_DC9, VHH R3_DC2, VHH R4_DC20, VHH R4_DC13, VHH R4_DC9, VHH R4_DC6, VHH R3_DC23 Kabat, Martin の FR4
46	CDR1 Kabat
47	CDR2 Kabat
48	CDR3 Kabat, Martin
49	変異 CDR1 Kabat
50	変異 CDR2 Kabat
51	変異 CDR3 Kabat, Martin
52	CDR1 R3_C4, R4_DC16, R3_DC20, R3_DC9, R3_DC2, R4_DC20, R4_DC13 Martin
53	CDR1 R3_DC23, R4_DC9 Martin
54	CDR1 R4_DC6 Martin
55	VHH R3_C4, VHH R4_DC16, VHH R3_DC20 Martin の CDR2
56	VHH R3_DC9 Marti の CDR2
57	VHH R3_DC2 Martin の CDR2
58	VHH R4_DC20 Martin の CDR2
59	VHH R4_DC13 Martin の CDR2
60	VHH R4_DC9 Martin の CDR2
61	VHH R4_DC6 Martin の CDR2

【０３５７】

【表１６－３】

62	VHH R3_DC23 Martin の CDR2
63	CDR1 Martin, AbM, IMGT
64	CDR2 Martin, AbM
65	変異 CDR1 Martin, AbM, IMGT
66	変異 CDR2 Martin, AbM
67	CDR3 AbM, Chothia
68	変異 CDR3 AbM, Chothia
69	CDR1 Chothia
70	CDR2 Chothia
71	変異 CDR1 Chothia
72	変異 CDR2 Chothia
73	CDR2 IMGT
74	CDR3 IMGT
75	変異 CDR2 IMGT
76	変異 CDR3 IMGT
77	CDR1 MacCallum
78	CDR2 MacCallum
79	CDR3 MacCallum
80	変異 CDR1 MacCallum
81	変異 CDR2 MacCallum
82	変異 CDR3 MacCallum
83	VHH R3_DC19
84	VHH R3_DC21, VHH R3_DC22
85	VHH R3_DC5
96	R3_DC23(hum)-Fc(YTE)
97	VHH R3_C4, VHH R4_DC16, VHH R3_DC20 Martin の FR1
98	VHH R3_DC9, VHH R3_DC2, VHH R4_DC20, VHH R4_DC13 Martin の FR1
99	VHH R4_DC9, R4_DC6 Martin の FR1
100	VHH R3_DC23 Martin の FR1
101	VHH R3_C4 Martin の FR3
102	VHH R4_DC16 Martin の FR3
103	VHH R3_DC20 Martin の FR3
104	VHH R3_DC9 Martin の FR3
105	VHH R3_DC2 Martin の FR3
106	VHH R4_DC20 Martin の FR3
107	VHH R4_DC13 Martin の FR3

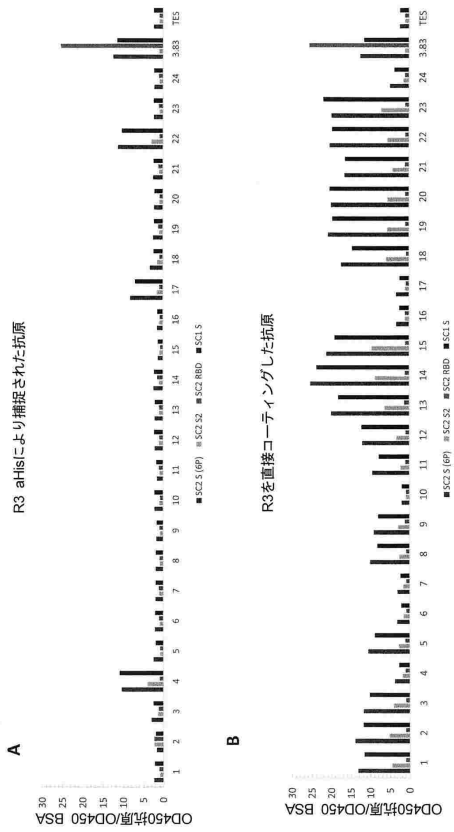
【０３５８】

【表１６－４】

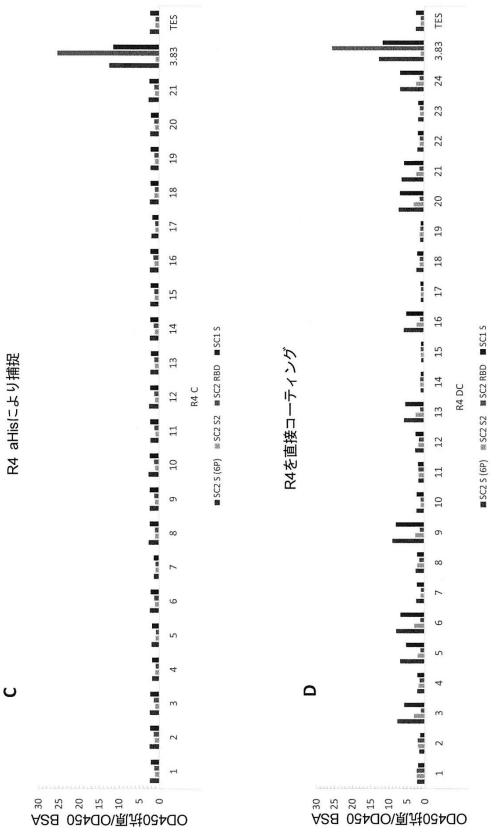
108	VHH R4_DC9 Martin の FR3
109	VHH R4_DC6 Martin の FR3
110	VHH R3_DC23 Martin の FR3
112	TD R3DC23-117(10)-Fc
113	TD R3DC23-117(20)-Fc
114	TD R3DC23-117(30)-Fc
115	R3DC23-Fc-117
116	TD 83-117 (20)- Fc
117	TD R3DC23-117-83 (20)- Fc
118	XVR013
119	XVR014
120	Gly-Ser リンカー$(G_4S)_6$
121	Gly-Ser リンカー$(G_4S)_2$
122	Gly-Ser リンカー$(G_4S)_3$
123	Gly-Ser リンカー$(G_4S)_4$
124	VHH72
125	VHH83
126	VHH3.117
127	ヒト化 R3_DC23
128	ヒト化 R3_C4
129	ヒト化 R4_DC20
130	huR3C4-Fc
131	huR4DC20-Fc

【図面】

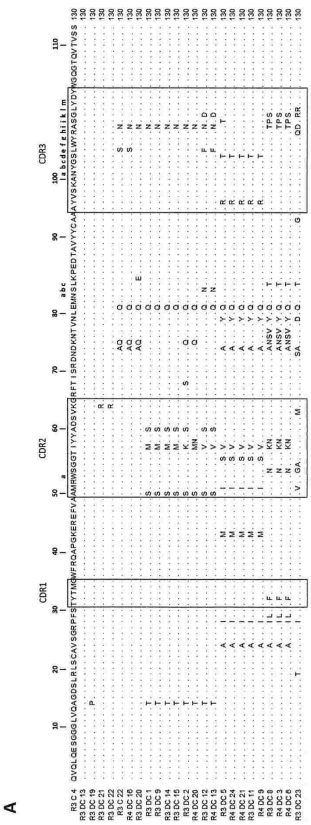
【図１－１】



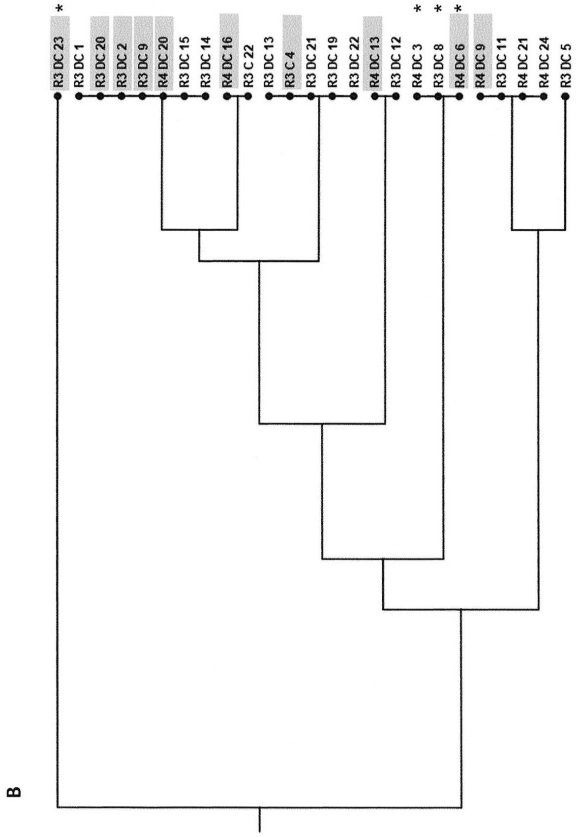
【図１－２】



【図２－１】

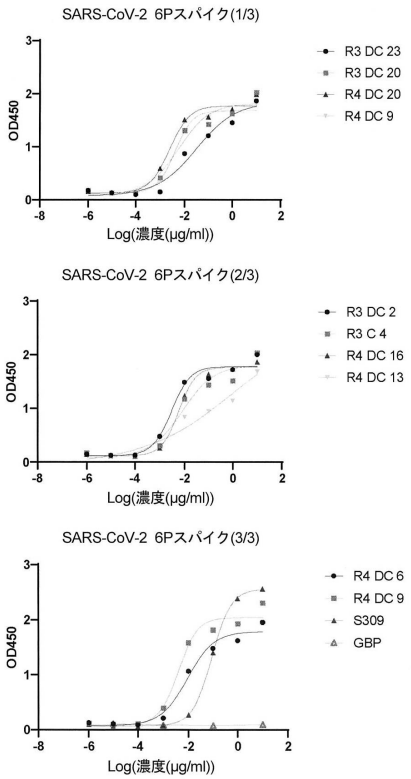


【図２－２】



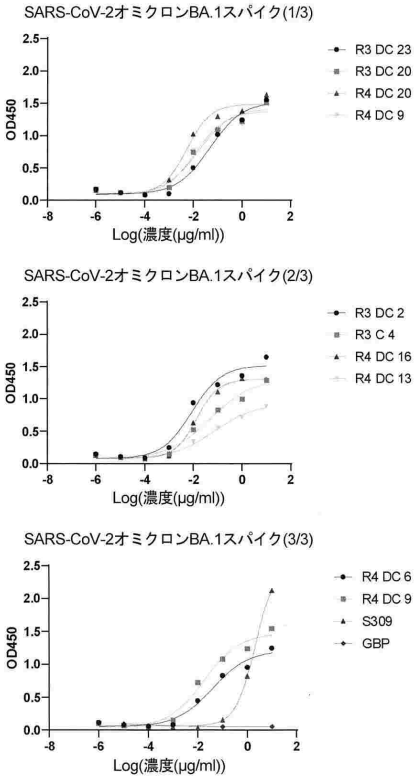
【図３－１】

A



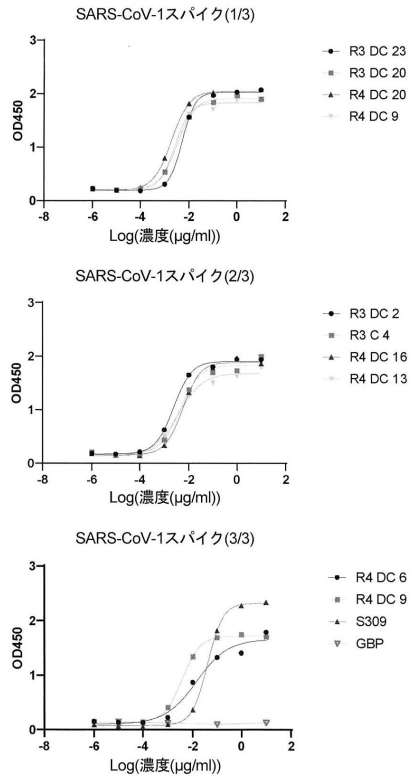
【図３－２】

B



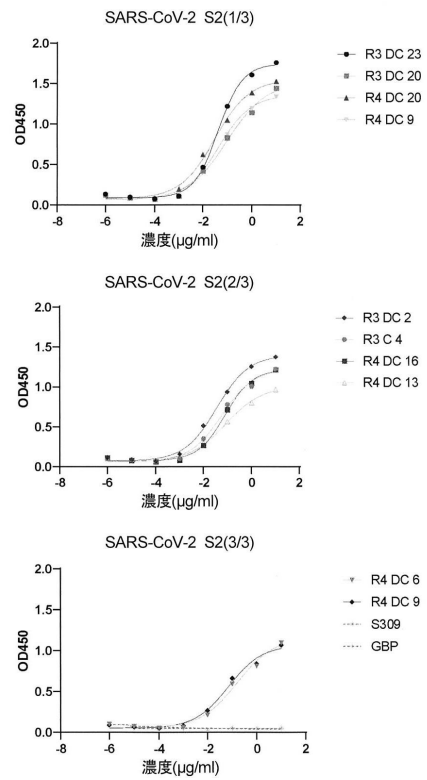
【図３－３】

C



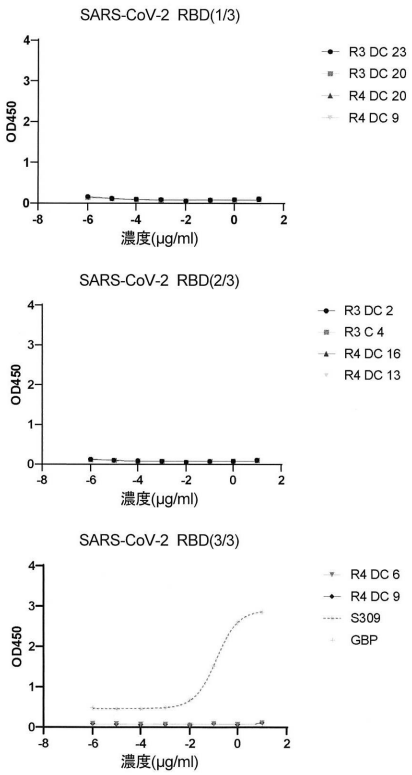
【図３－４】

D



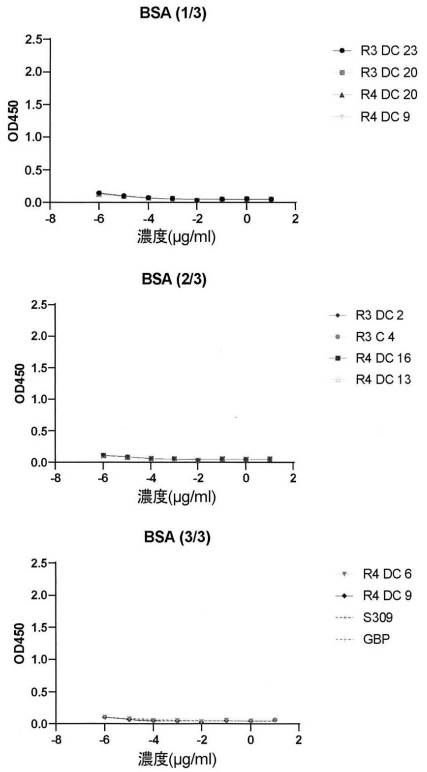
【図３－５】

E



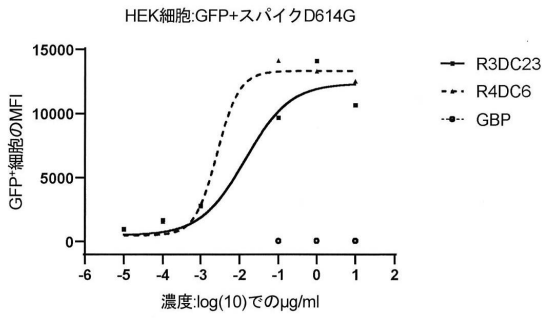
【図３－６】

F

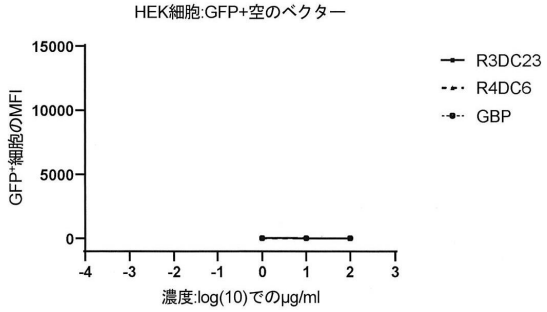


【図４】

A

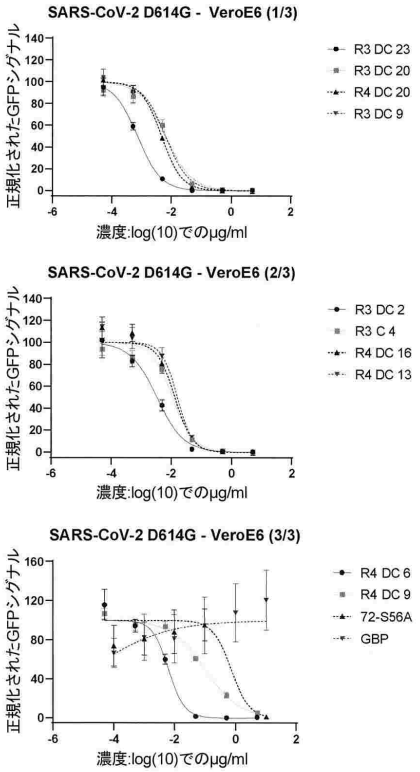


B



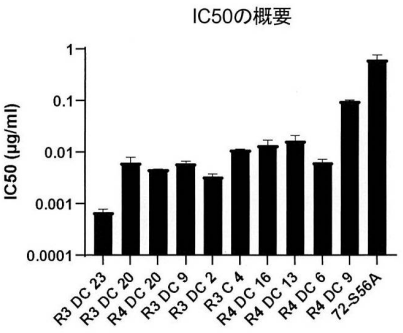
【図５－１】

A



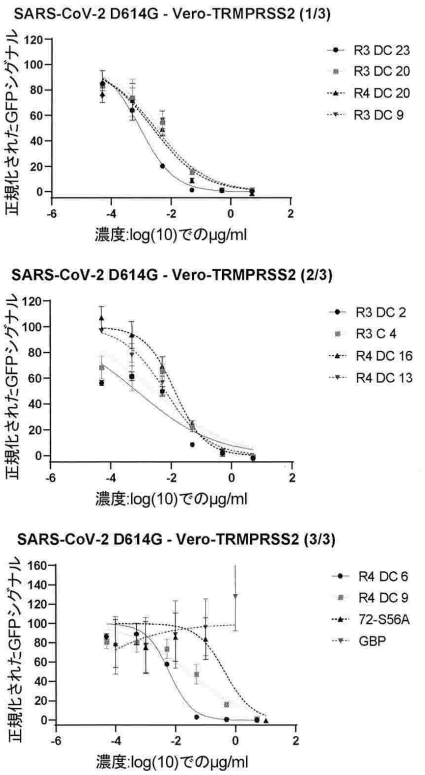
【図５－２】

B



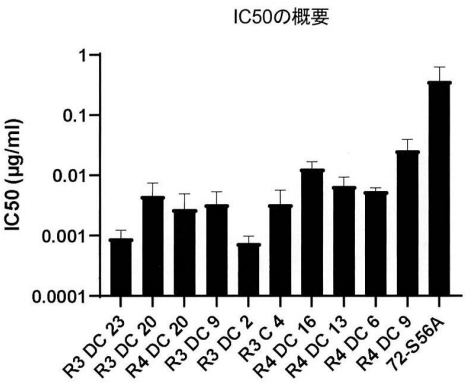
【図６－１】

A



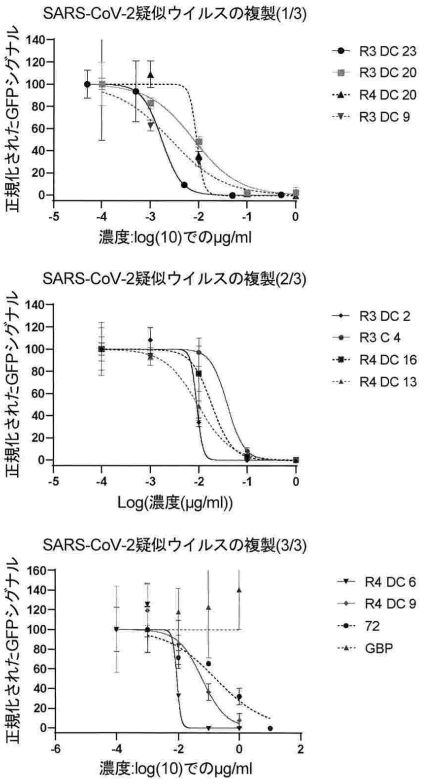
【図６－２】

B



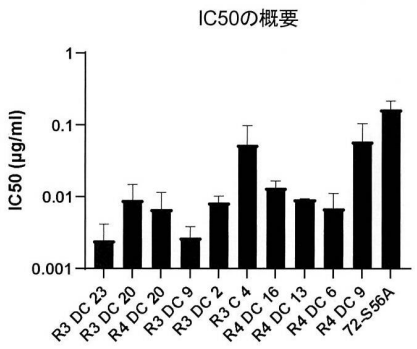
【図７－１】

A



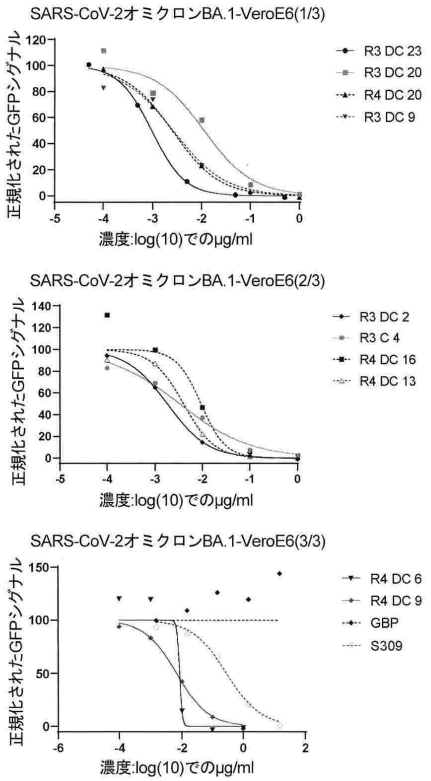
【図７－２】

B



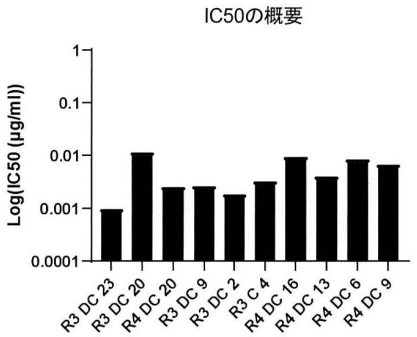
【図８－１】

A



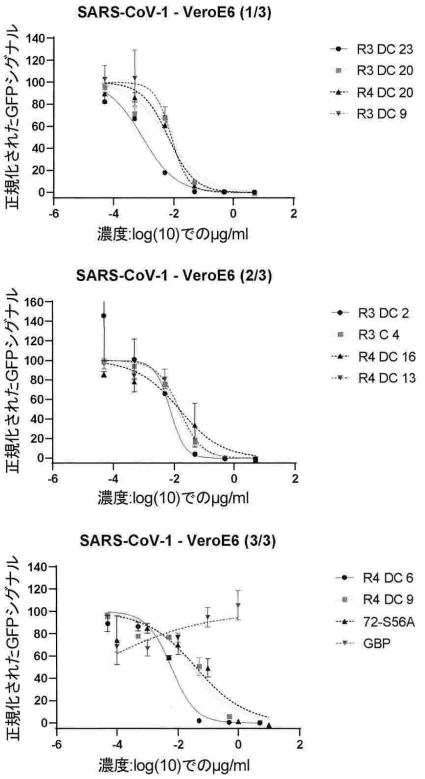
【図８－２】

B



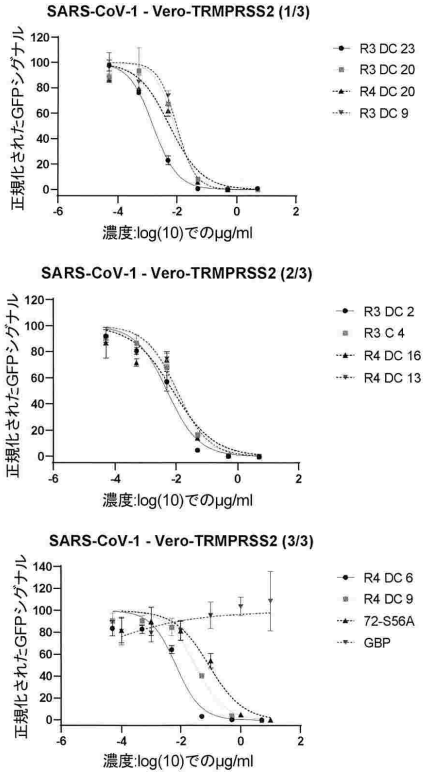
【図９－１】

A



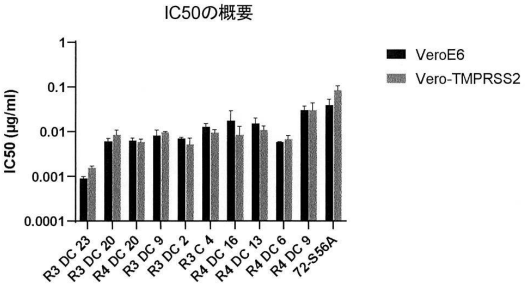
【図９－２】

B



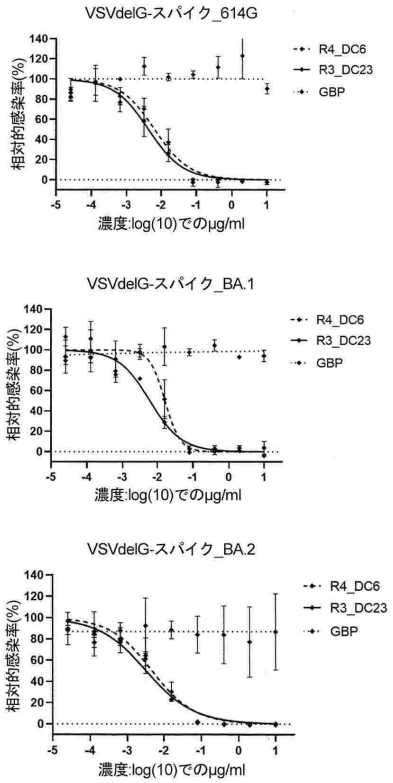
【図９－３】

C



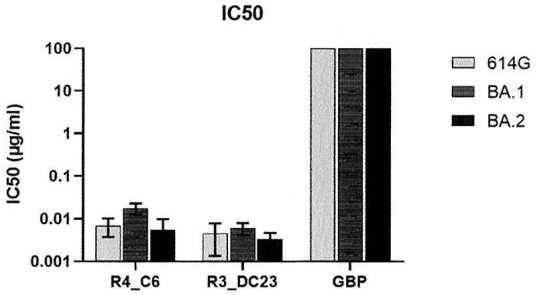
【図１０－１】

A

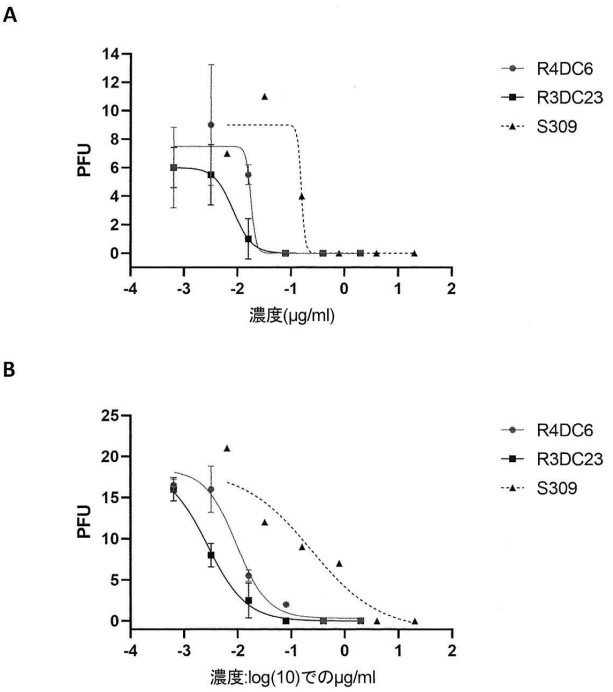


【図１０－２】

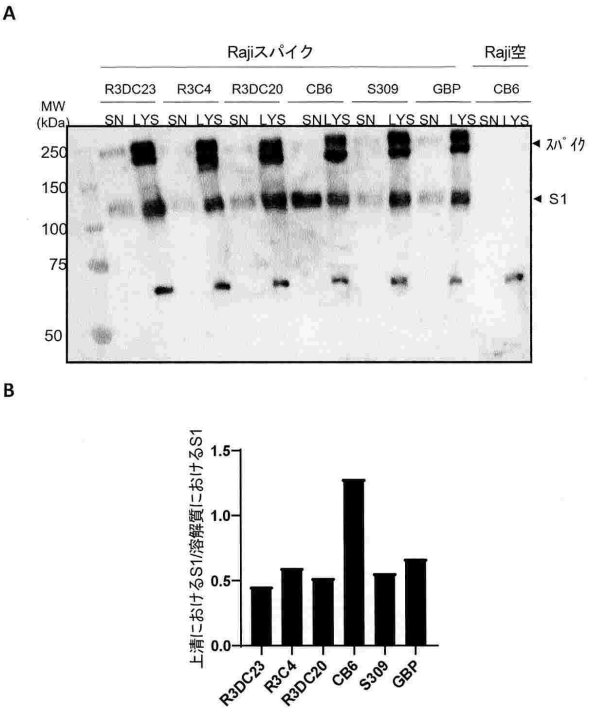
B



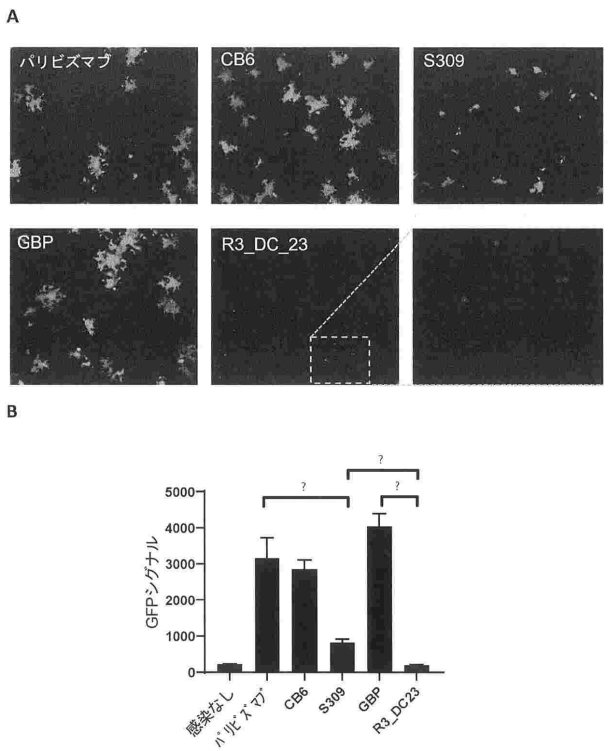
【図１１】



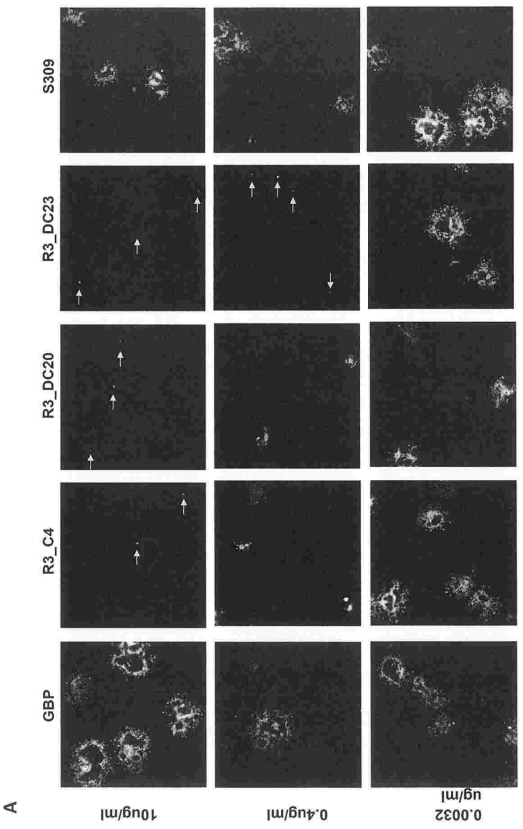
【図１２】



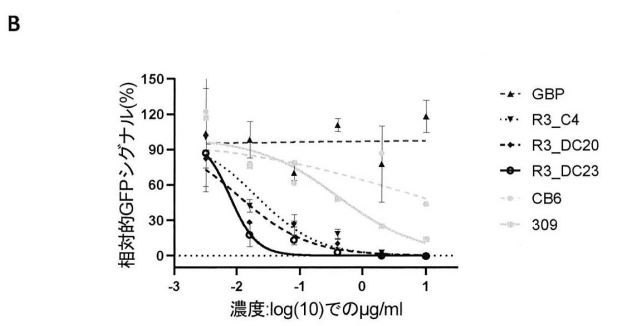
【図１３】



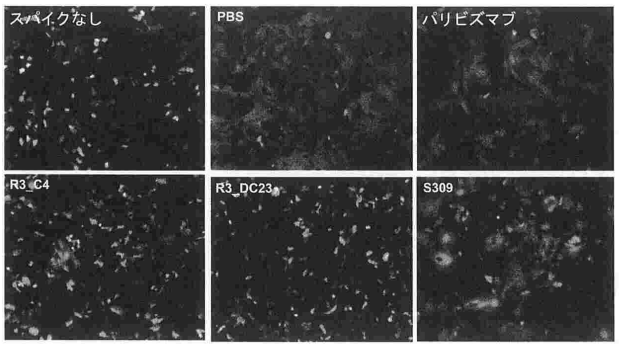
【図１４－１】



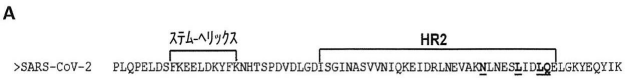
【図１４－２】



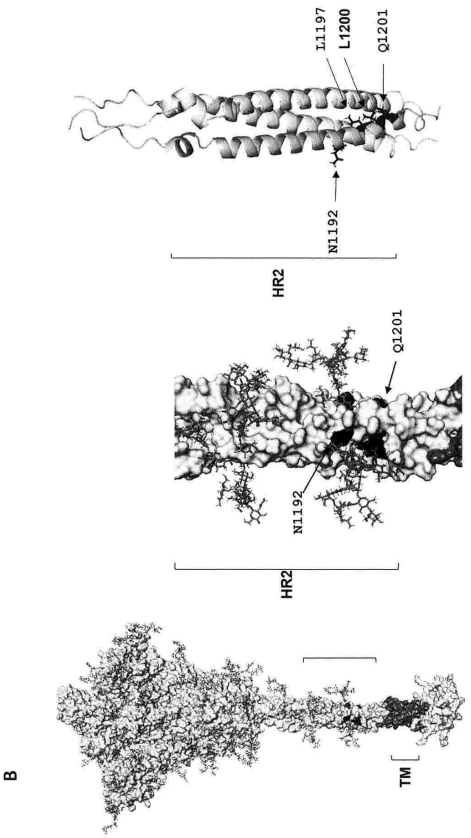
【図１５】



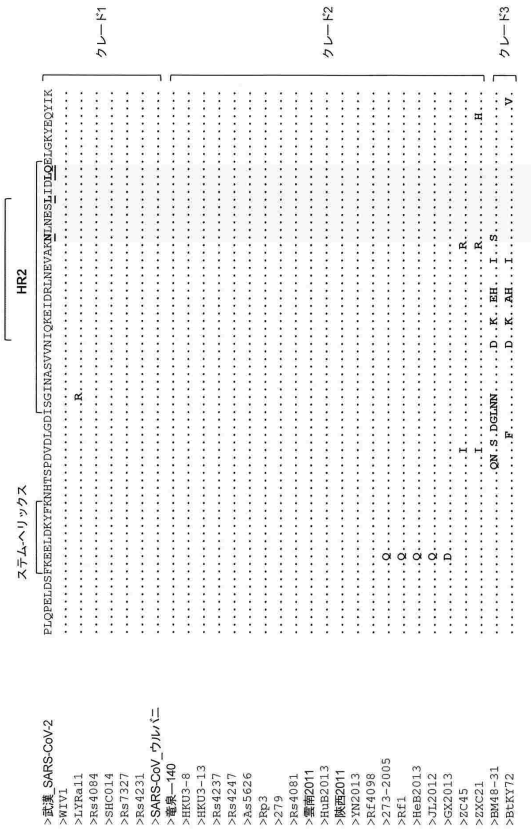
【図１６－１】



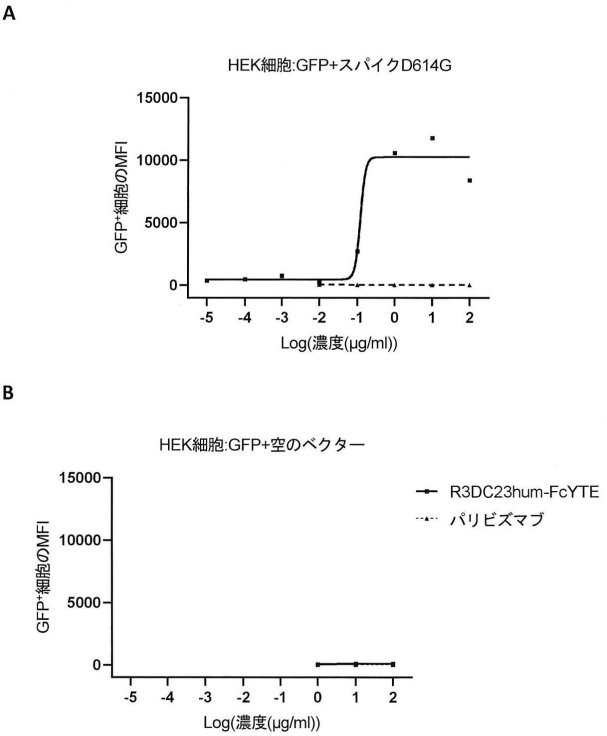
【図１６－２】



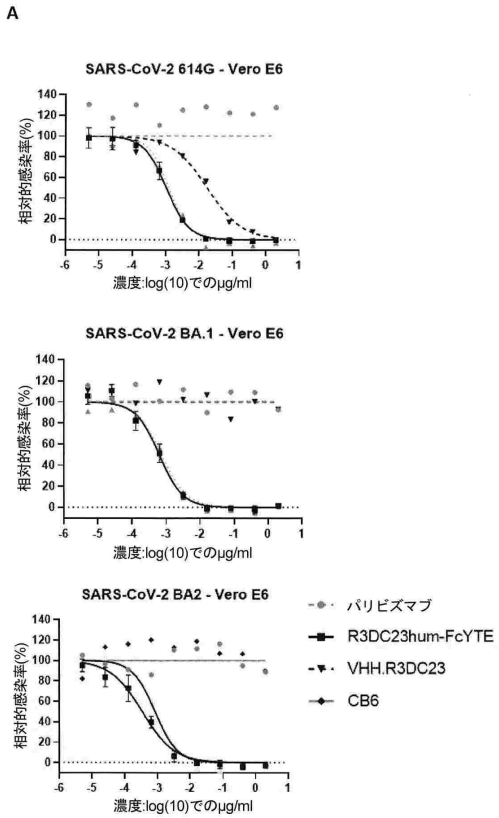
【図１７】



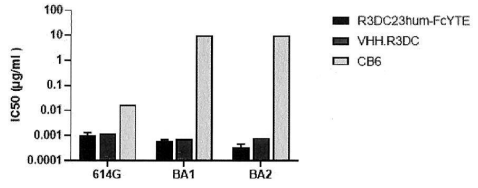
【図１８】



【図１９－１】

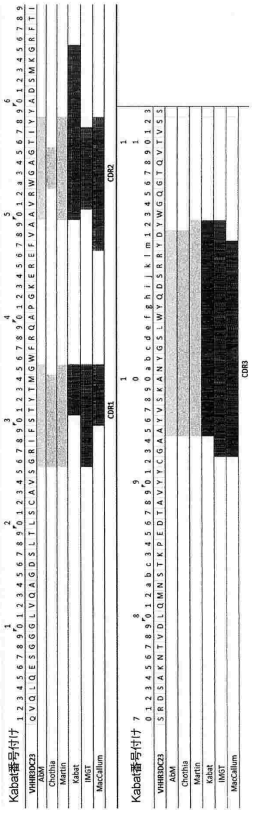


【図１９－２】

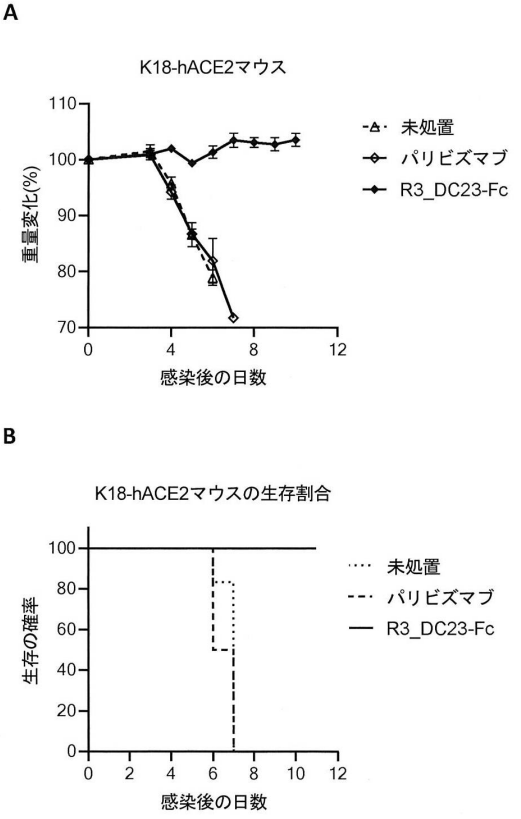


		614G	BA1	BA2
R3DC23hum-FcYTE	平均	0.001	0.001	3.523e-004
	SD	0.0002	0.0001	0.0001
	N	3	3	3
VHH.R3DC	平均	0.001	0.001	0.001
	SD	0.000	0.000	0.000
	N	1	1	1
CB6	平均	0.018	10.000	10.000
	SD	0.000	0.000	0.000
	N	1	1	1

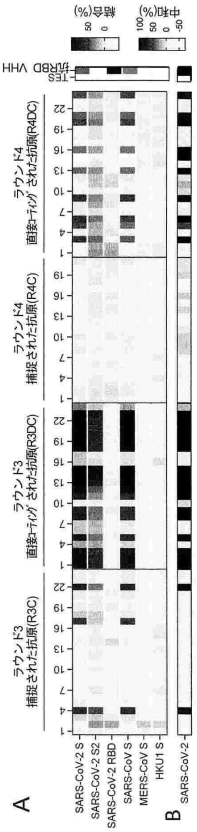
【図２０】



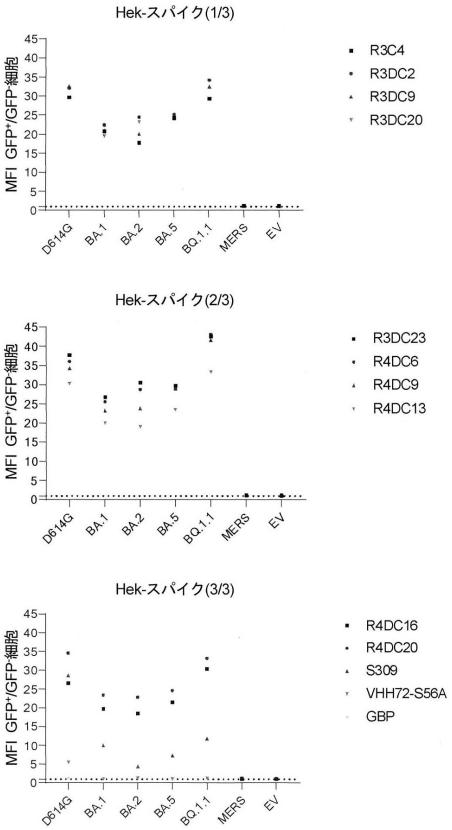
【図２１】



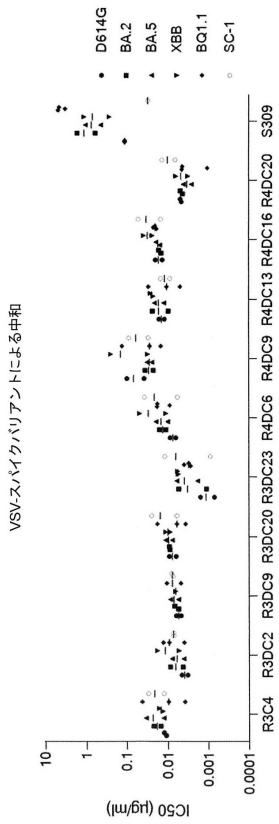
【図２２】



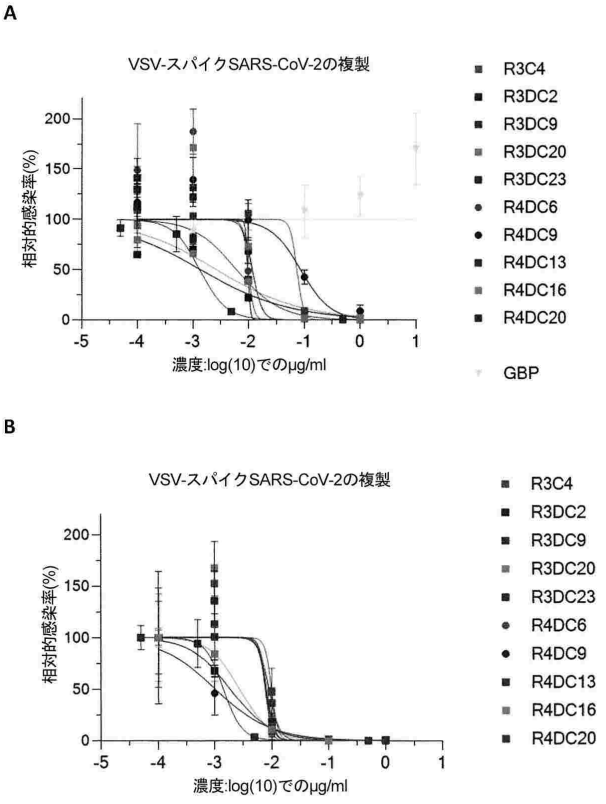
【図２３】



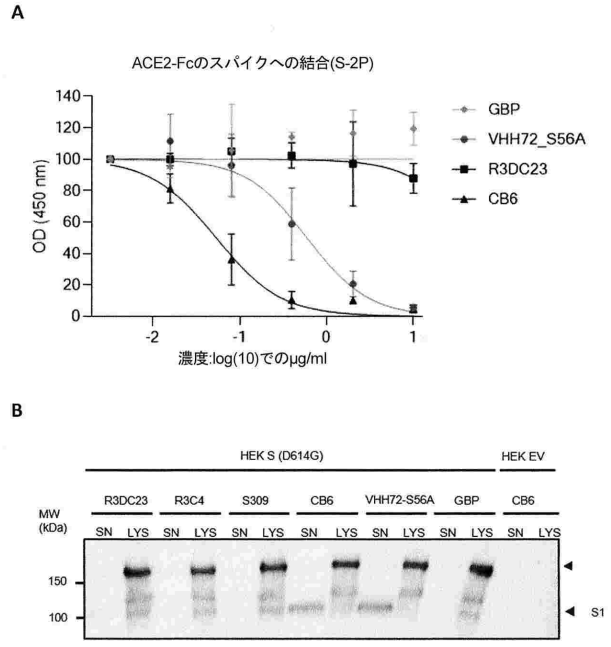
【図２４】



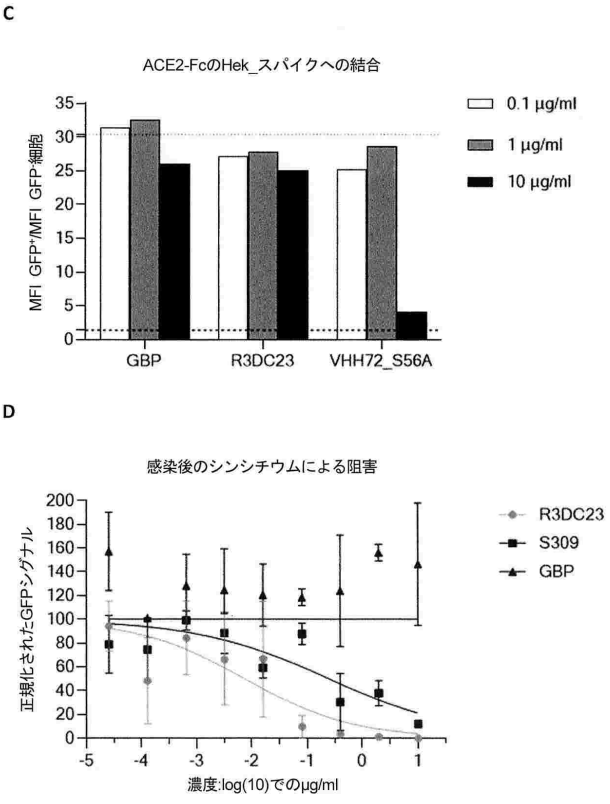
【図２５】



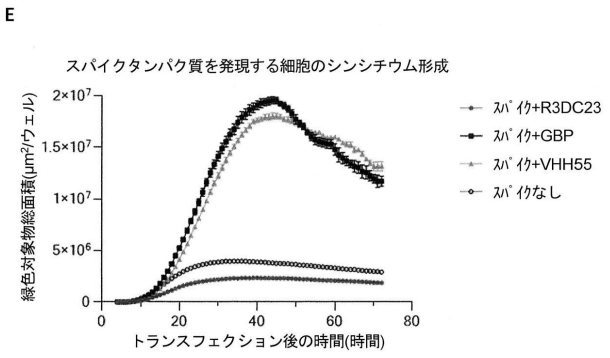
【図２６－１】



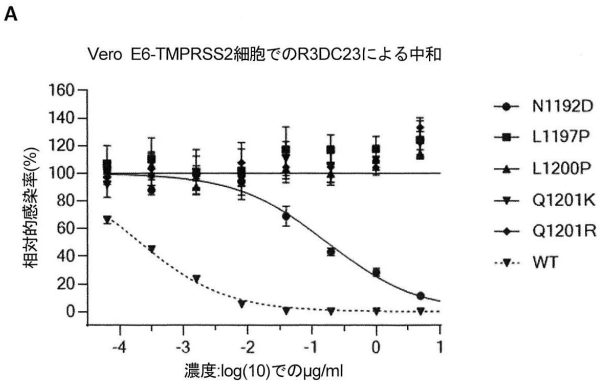
【図２６－２】



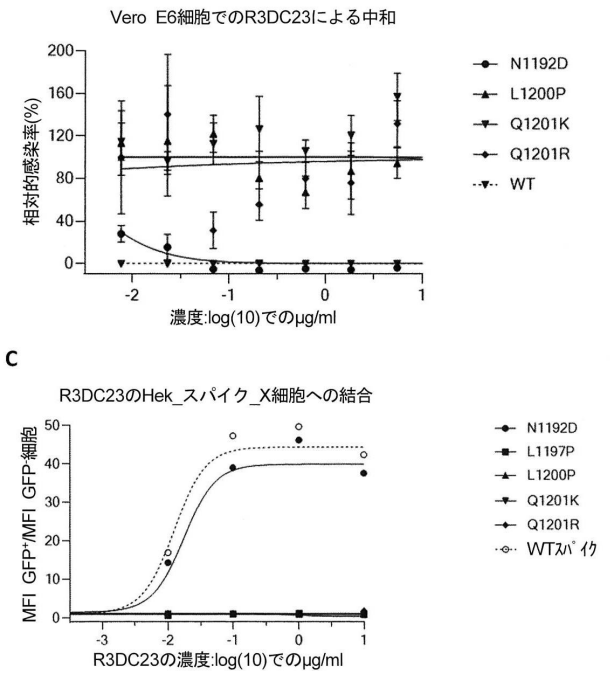
【図２６－３】



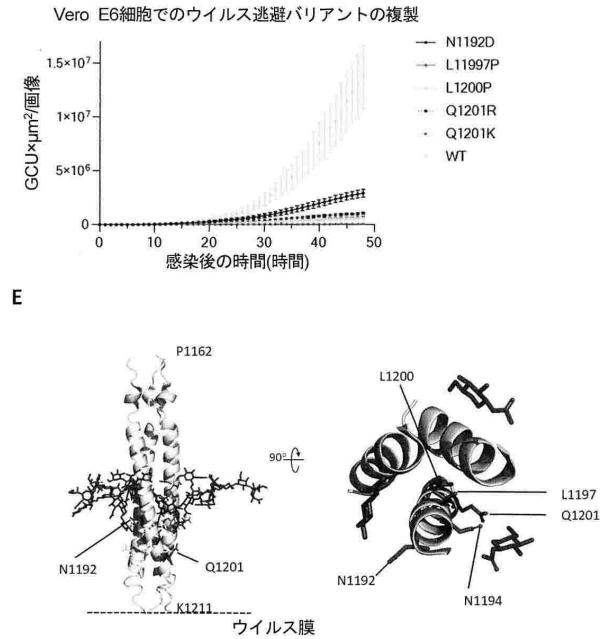
【図２７－１】



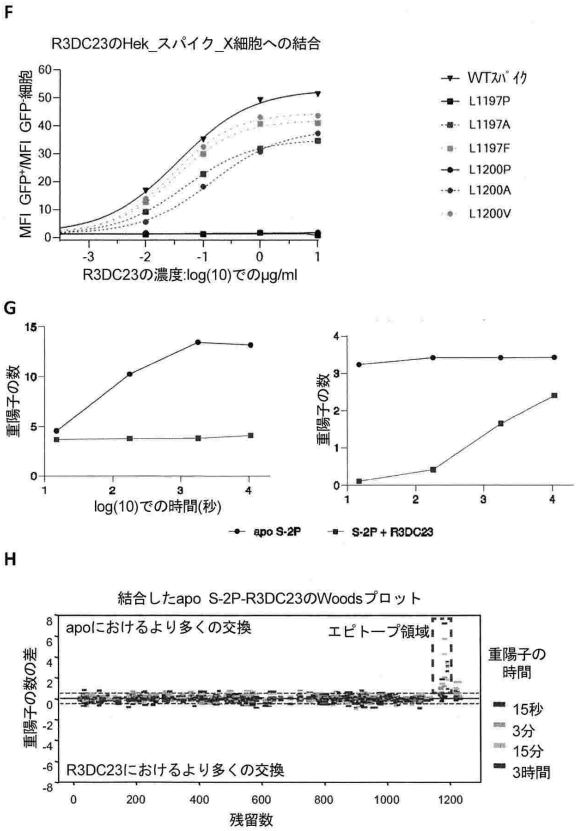
【図２７－２】



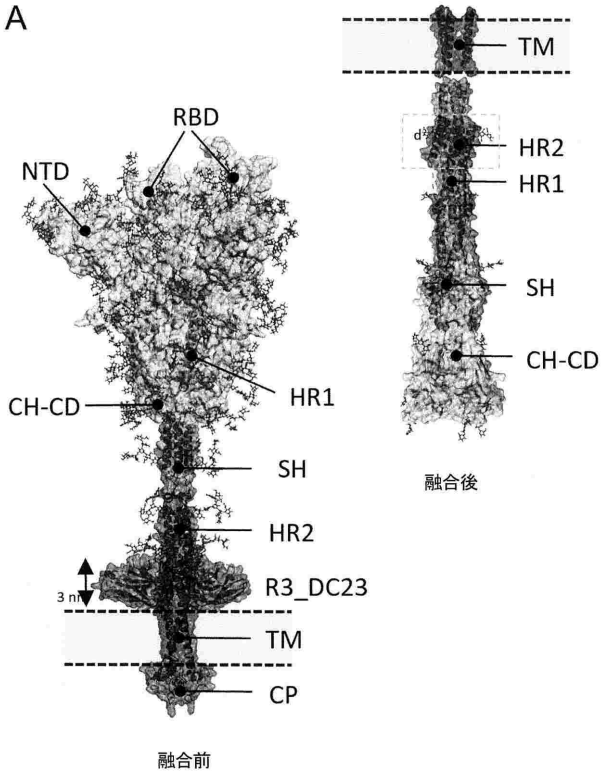
【図２７－３】



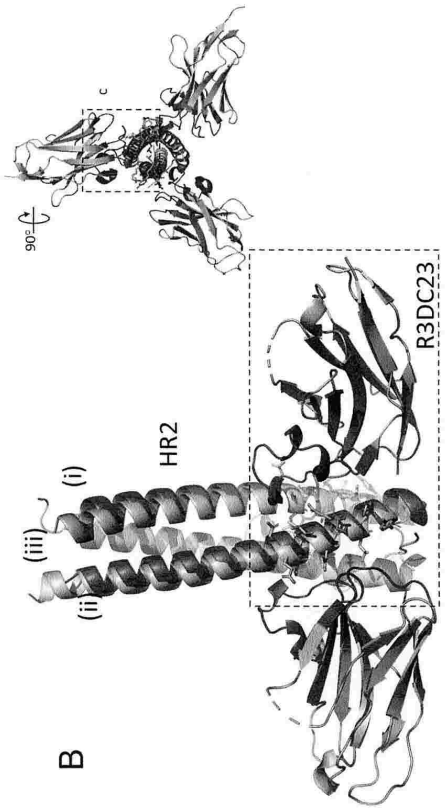
【図２７－４】



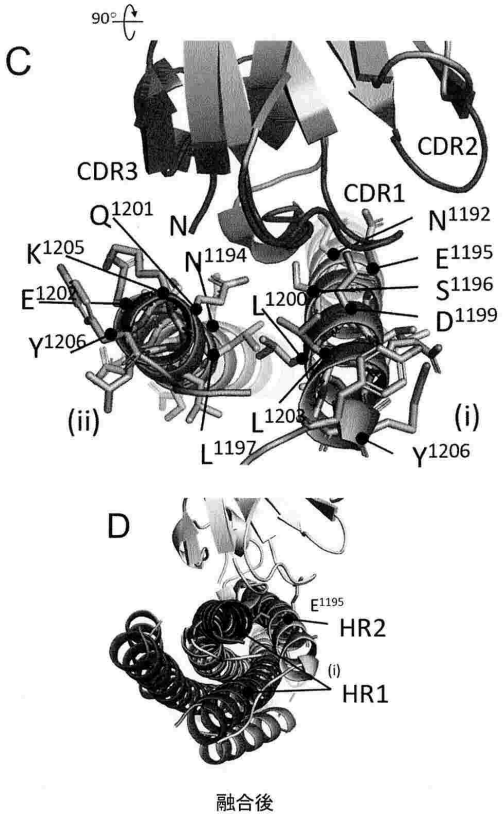
【図２８－１】



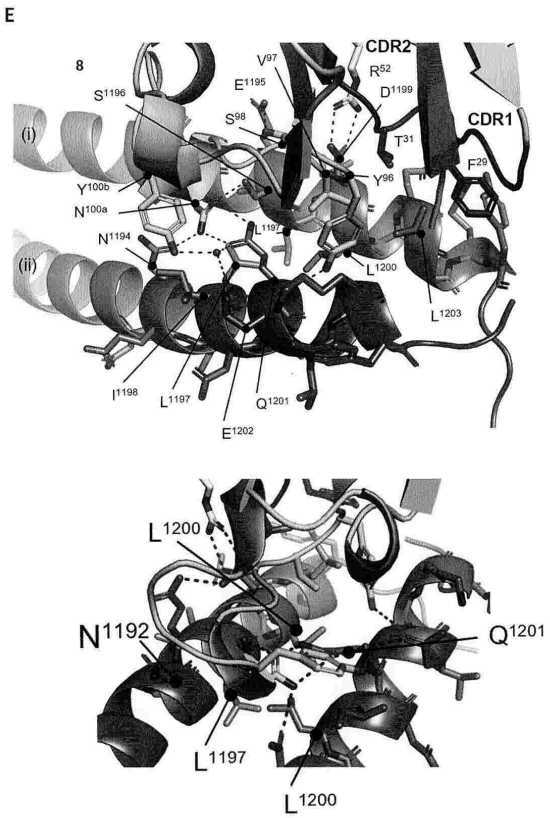
【図２８－２】



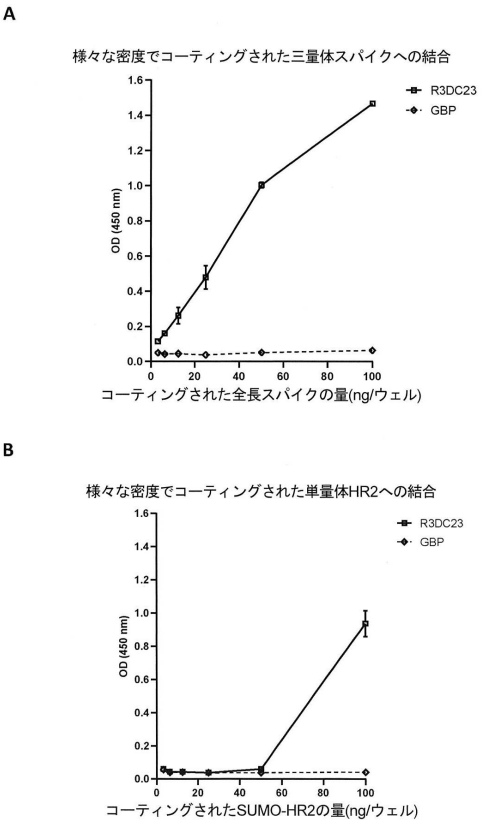
【図２８－３】



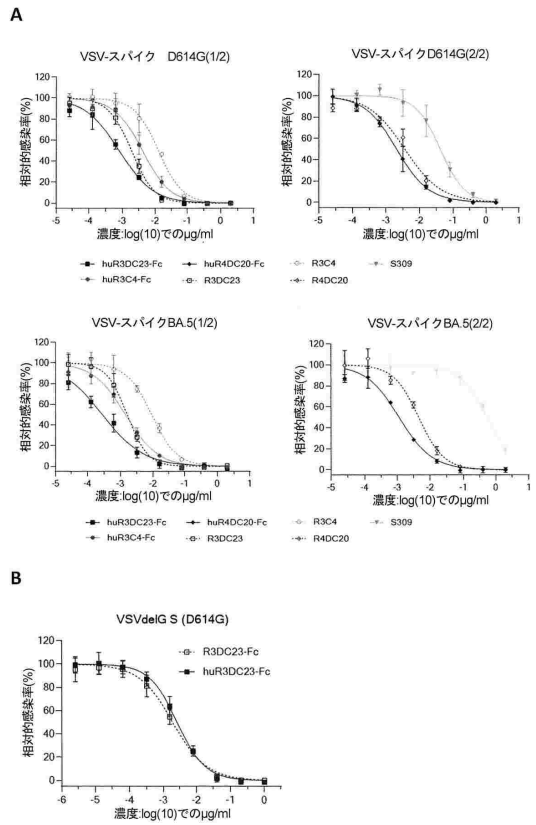
【図２８－４】



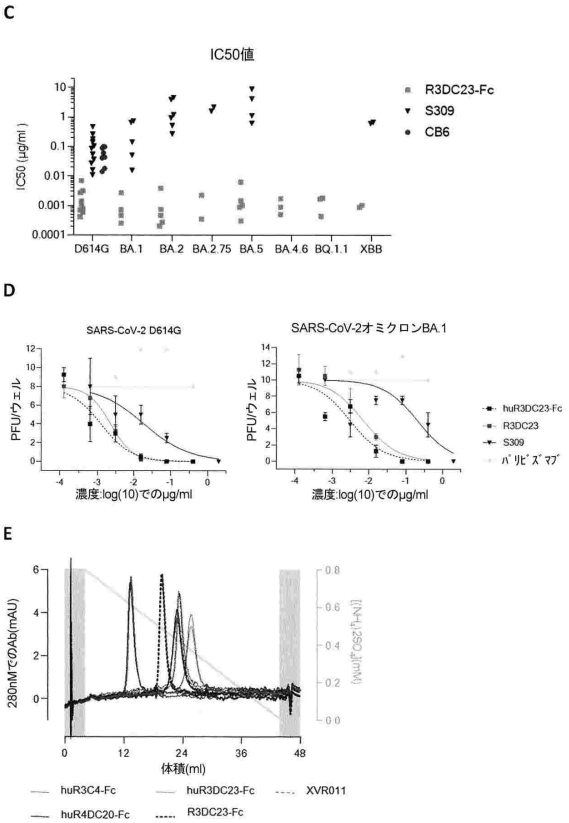
【図２９】



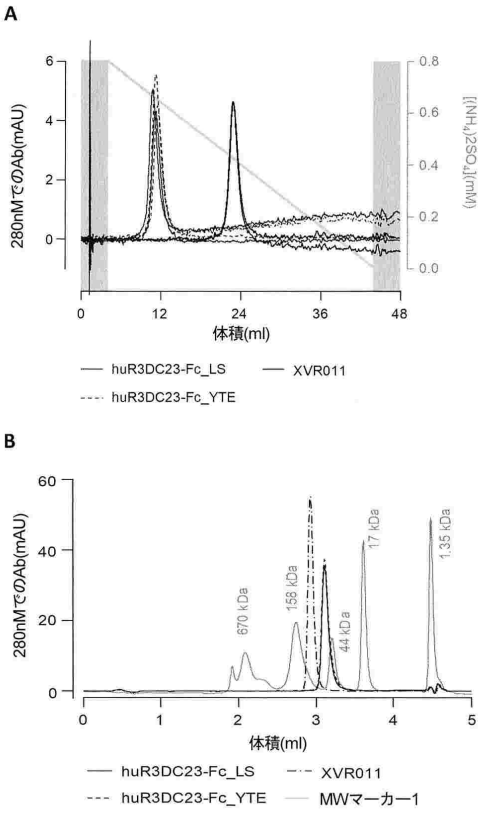
【図３０－１】



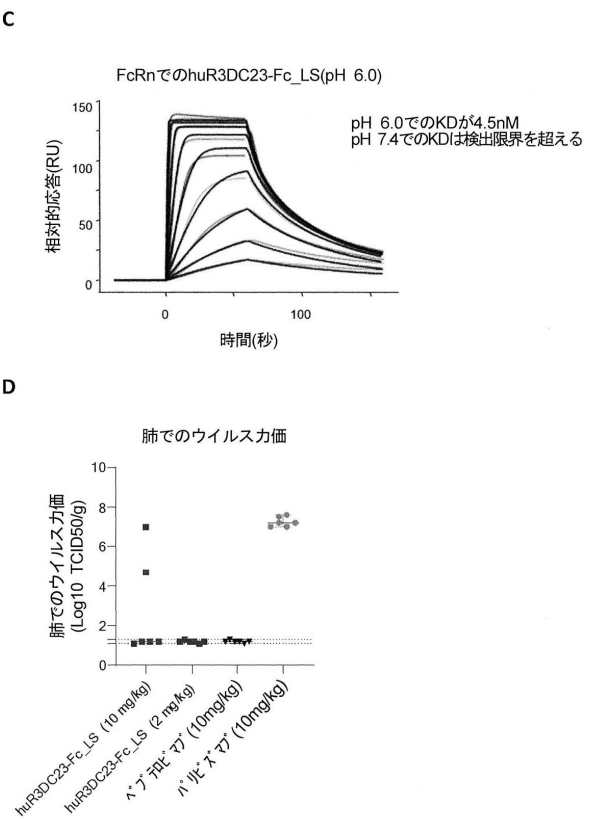
【図３０－２】



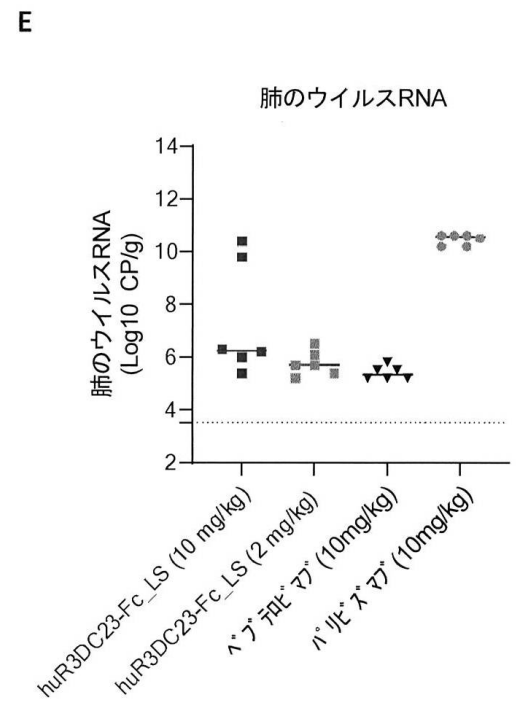
【図３１－１】



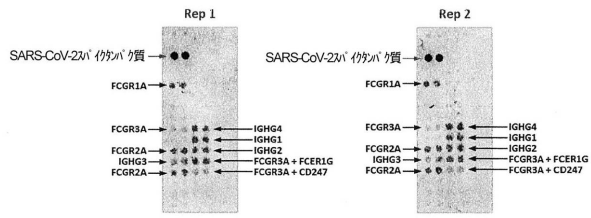
【図３１－２】



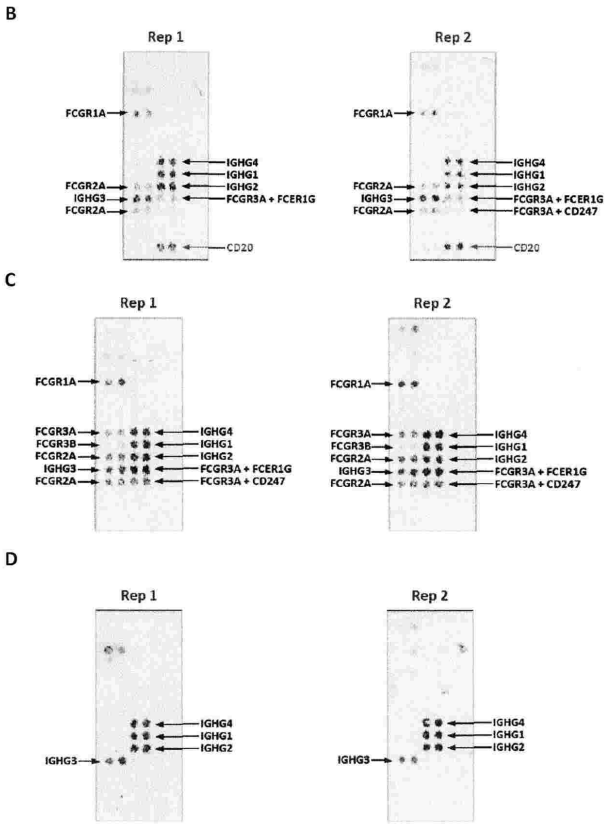
【図３１－３】



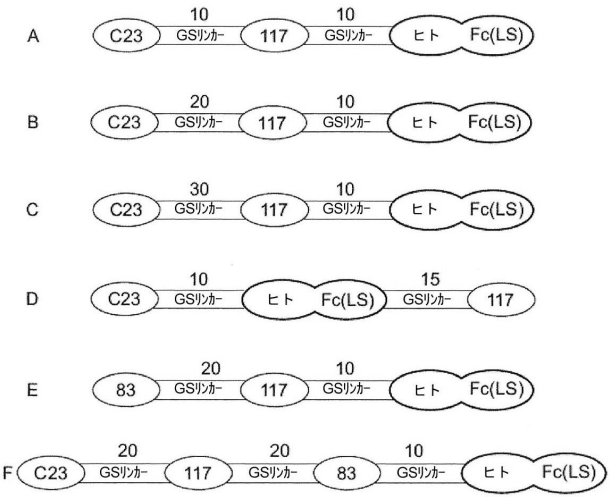
【図３２－１】



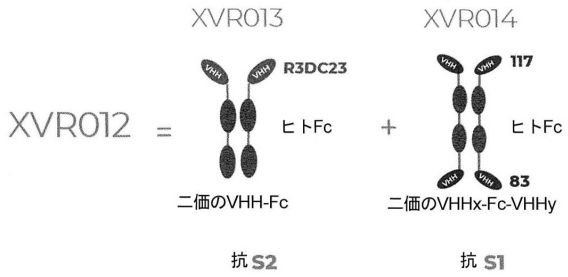
【図３２－２】



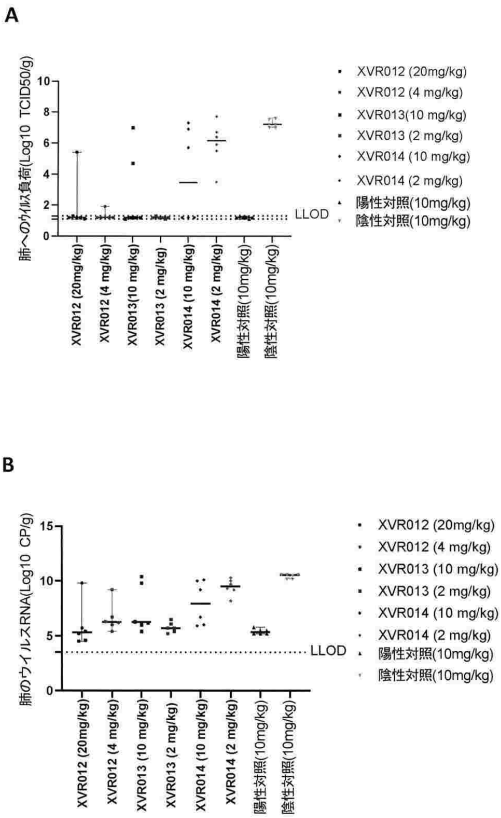
【図３３】



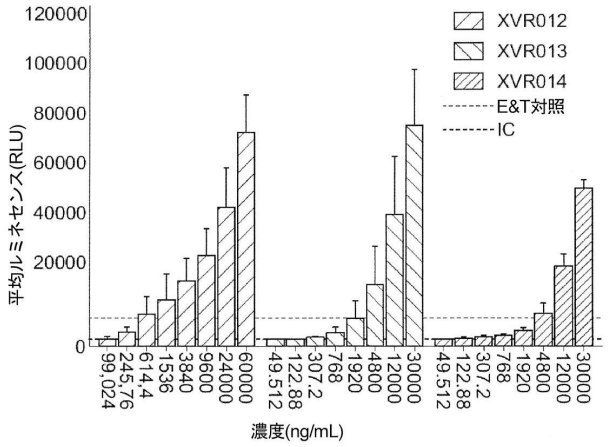
【図３４】



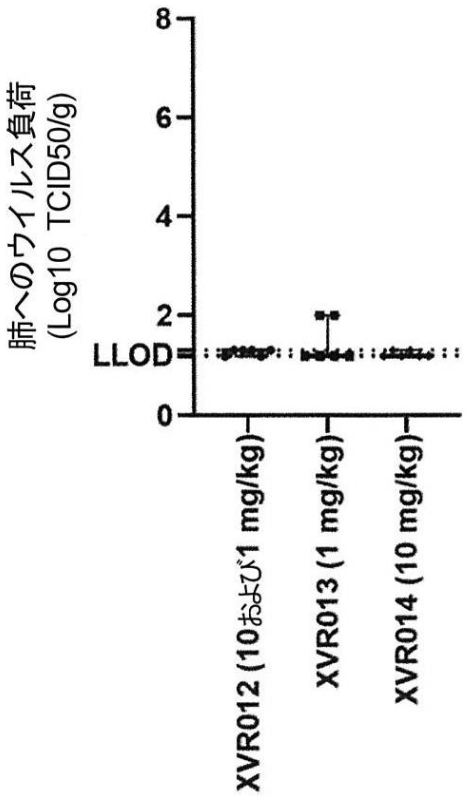
【図３５】



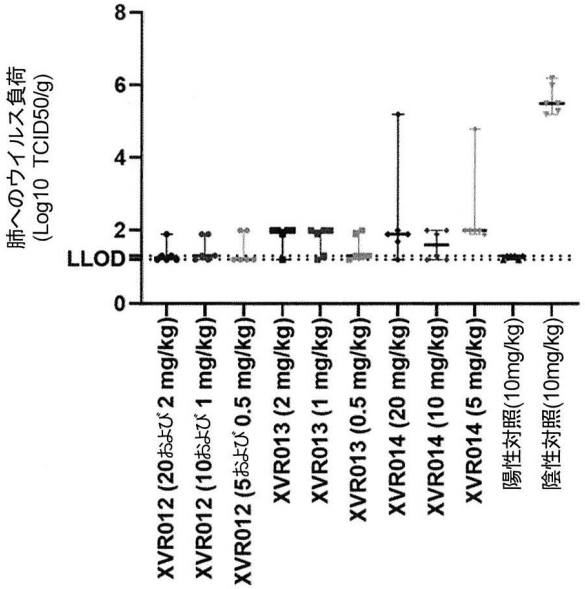
【図３６】



【図３７】

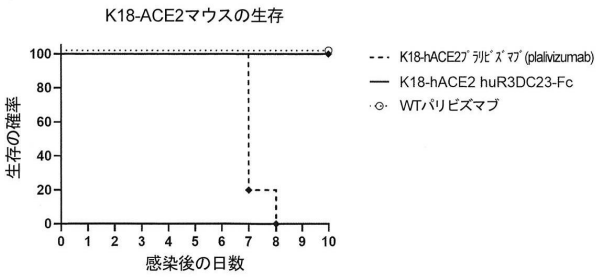


【図３８】



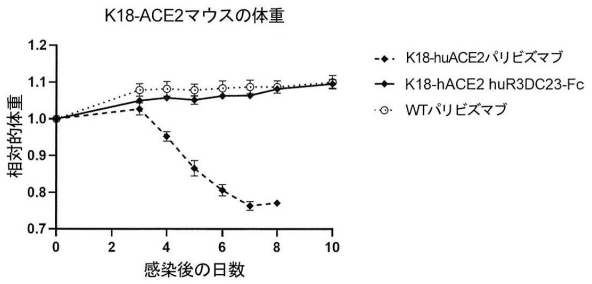
【図３９－１】

A



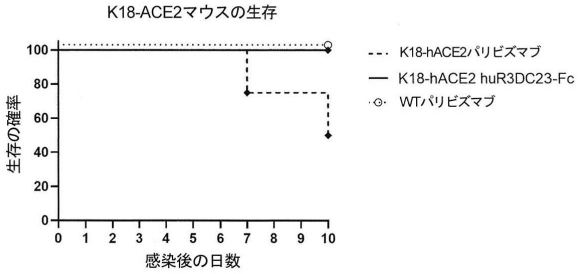
【図３９－２】

B



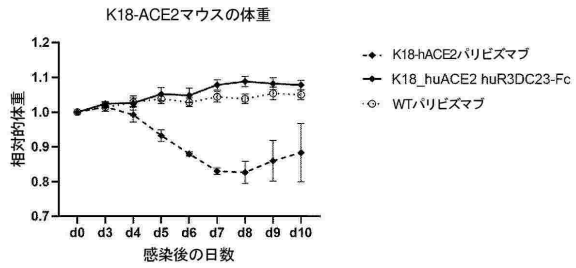
【図４０－１】

A

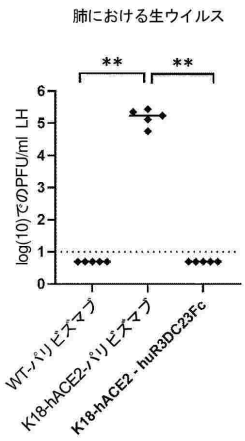


【図４０－２】

B

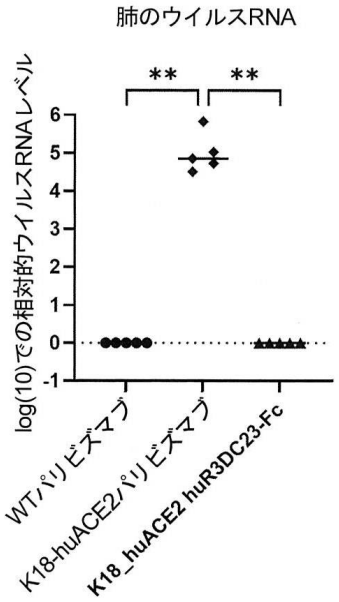


C

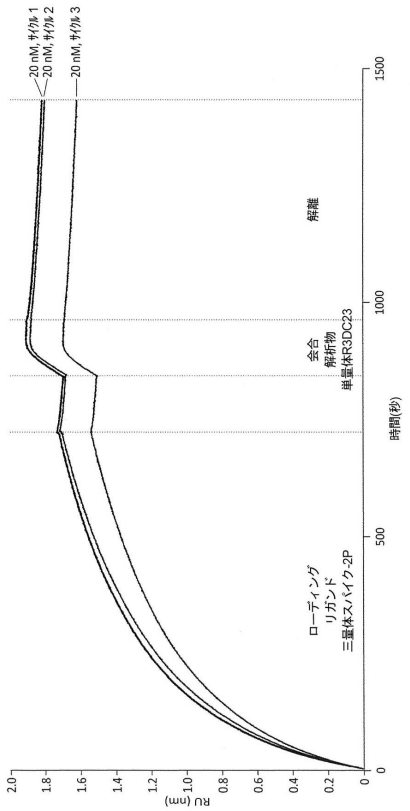


【図４０－３】

D



【図４１】



【配列表】

<u>２０２５５１７７２８０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/063375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/10 A61P31/14
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUO-MING LIP ET AL: "Monoclonal antibodies targeting the HR2 domain and the region immediately upstream of the HR2 of the S protein neutralize in vitro infection of severe acute respiratory syndrome coronavirus.", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80, no. 2, 15 January 2006 (2006-01-15), pages 941-950, XP055695042, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.80.2.941-950.2006 figures 1-3 ----- -/--	1-31

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 August 2023	17/08/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Brouns, Gaby

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/063375

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HATEM A. ELSHABRAWY ET AL: "Human Monoclonal Antibodies against Highly Conserved HR1 and HR2 Domains of the SARS-CoV Spike Protein Are More Broadly Neutralizing", PLOS ONE, vol. 7, no. 11, 21 November 2012 (2012-11-21), page e50366, XP055695602, DOI: 10.1371/journal.pone.0050366 table 1	1-31
X	SZU-CHIA LAI ET AL: "Characterization of neutralizing monoclonal antibodies recognizing a 15-residues epitope on the spike protein HR2 region of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)", JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 12, no. 5, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 711-727, XP019272217, ISSN: 1423-0127 figure 5 table 1	1-31
X	HU HONGBO ET AL: "Screening and Identification of Linear B-Cell Epitopes and Entry-Blocking Peptide of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Associated Coronavirus Using Synthetic Overlapping Peptide Library", JOURNAL OF COMBINATORIAL CHEMISTRY. , vol. 7, no. 5 1 September 2005 (2005-09-01), pages 648-656, XP055814671, US ISSN: 1520-4766, DOI: 10.1021/cc0500607 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cc0500607 table 2	1-31

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/063375

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XING LIXIAO ET AL: "A Five-Helix-Based SARS-CoV-2 Fusion Inhibitor Targeting Heptad Repeat 2 Domain against SARS-CoV-2 and Its Variants of Concern", VIRUSES , vol. 14, no. 3 13 March 2022 (2022-03-13), page 597, XP055972563, DOI: 10.3390/v14030597 Retrieved from the Internet: URL:https://www.mdpi.com/1999-4915/14/3/597 figure 1A -& XING LIXIAO ET AL: "A Five-Helix-Based SARS-CoV-2 Fusion Inhibitor Targeting Heptad Repeat 2 Domain against SARS-CoV-2 and Its Variants of Concern - supplementary information", VIRUSES, vol. 14, no. 3, 13 March 2022 (2022-03-13) , page 597, XP055972569, DOI: 10.3390/v14030597 Retrieved from the Internet: URL:https://www.mdpi.com/1999-4915/14/3/597> figure S1	1-31
A	GUO Y ET AL: "Identification of a New Region of SARS-CoV S Protein Critical for Viral Entry", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 394, no. 4, 11 December 2009 (2009-12-11), pages 600-605, XP026793444, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2009.10.032 [retrieved on 2009-10-21] Legend fig. 1	1-31
A	ARIA HAMID ET AL: "Outlook of therapeutic and diagnostic competency of nanobodies against SARS-CoV-2: A systematic review", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 640, 4 January 2022 (2022-01-04), XP086937989, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2022.114546 [retrieved on 2022-01-04] the whole document	1-31

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/063375

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RABETS ANDRII ET AL: "The Potential of Developing Pan-Coronaviral Antibodies to Spike Peptides in Convalescent COVID-19 Patients", ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS, BIRKHAEUSER VERLAG AG, CH, vol. 69, no. 1, 6 March 2021 (2021-03-06), XP037637077, ISSN: 0004-069X, DOI: 10.1007/S00005-021-00607-8 [retrieved on 2021-03-06] -----	1-31
T	De Cae Sieglinde ET AL: "Ultrapotent SARS coronavirus-neutralizing single-domain antibodies that bind a conserved membrane proximal epitope of the spike", bioRxiv, 1 March 2023 (2023-03-01), XP093070242, DOI: 10.1101/2023.03.10.531533 Retrieved from the Internet: URL:www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.10.531533v1.full.pdf [retrieved on 2023-08-03] the whole document -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/063375

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N	*1/15 (2006.01)*	C12N	1/15	
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10	
C12Q	*1/02 (2006.01)*	C12Q	1/02	
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	39/395	N
A61P	*31/14 (2006.01)*	A61P	31/14	
G01N	*33/569 (2006.01)*	G01N	33/569	L
G01N	*33/53 (2006.01)*	G01N	33/53	D

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

ＶＲＩＪＥ ＵＮＩＶＥＲＳＩＥＩＴ ＢＲＵＳＳＥＬ
ベルギー国、１０５０ ブリュッセル、プレインラーン ２
(71)出願人 522313916
エグゼヴィル バイオ ベーファウ
ベルギー国 ９０５２ ズウェイナールデ，テフノロギーパルク－ズウェイナールデ ９４
(74)代理人 100118902
弁理士 山本 修
(74)代理人 100106208
弁理士 宮前 徹
(74)代理人 100196508
弁理士 松尾 淳一
(74)代理人 100196243
弁理士 運 敬太
(72)発明者 デ カエ，ジークリンデ
ベルギー国 １７５０ レニク，カーレル・カイモーレンストラート ６２
(72)発明者 スケーペンス，ベルト
ベルギー国 ９０３１ ヘント，エルスハウト １
(72)発明者 セーレンス，シャビエル
ベルギー国 ８９００ イーペル，スポルトストラート １８
(72)発明者 ファン シー，レース
ベルギー国 ９０３２ ヘント，ピーテル・ファン・ヘンクトストラート ３３カー
(72)発明者 ネリンクス，ウィム
ベルギー国 ９８００ アステネ，ペネマンストラート ３２
(72)発明者 ルース，ケニー
ベルギー国 ９０４０ ヘント，トゥコムストストラート ３
(72)発明者 カレベールト，ニコ
ベルギー国 ９８５０ ネフェレ，ベガインホフラーン １５
(72)発明者 ハッセンザデ・ガサベ，ゴラムレザ
ベルギー国 １６４０ サン－ジュネーズ－ロド，ケルクフェルトベーク ３

(72)発明者　レマウト，ハン
ベルギー国　３３７０　ロースベーク，カステールストラート　１０アー
(72)発明者　ファン　モーレ，インゲ
ベルギー国　１０６０　サン－ジル，ヤマーラーン　１９　アー１．１３
(72)発明者　ボックスタル，ヴィキ
ベルギー国　９１２０　メルセレ，ヨゼフ・ファン・フルストラート　８
(72)発明者　リナルディ，マヌエラ
ベルギー国　９２８０　ウィーゼ，ローイエン　１１４ベ
(72)発明者　ブランシェトット，クリストフ
ベルギー国　９０７０　デステルベーゲン，フォルデルレーデ　４９

Ｆターム（参考）　4B063　QA01 QA18 QA20 QQ10 QR48 QS33 QX01
4B065　AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085　AA14 BA71 BB50 CC07 CC23 DD62 EE01
4H045　AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 FA74