(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119998313 A
(43)申请公布日 2025.05.13

(21)申请号 202380054762.7

(22)申请日 2023.05.17

(30)优先权数据
22174102.8 2022.05.18 EP
23160838.1 2023.03.08 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/063375 2023.05.17

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/222825 EN 2023.11.23

(71)申请人 VIB研究所
地址 比利时根特
申请人 根特大学 荷语布鲁塞尔自由大学
艾塞韦生物有限公司

(72)发明人 S·德卡 B·谢彭斯 X·赛伦斯
L·范斯奇 W·尼瑞克斯
K·罗斯 N·卡莱外特
G·哈森扎德·加萨贝 H·瑞姆特
I·范莫勒 V·博克斯特尔
M·里纳尔迪 C·布朗什托

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 水文钰 王卫彬

(51)Int.Cl.
C07K 16/10(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)

权利要求书3页 说明书94页
序列表（电子公布） 附图65页

(54)发明名称

沙贝病毒刺突蛋白S2亚基结合剂

(57)摘要

本发明涉及沙贝病毒结合剂,特别是抗体及其抗原结合片段,该结合剂能够有效中和沙贝病毒,特别是能够中和SARS-CoV-2(包括SARS-CoV-2变体)和SARS-CoV-1中的任一者或两者。该结合剂,特别是抗体和抗体片段,与沙贝病毒刺突蛋白的七肽重复2(HR2)结构域结合,更特别地,与位于2个相邻HR2结构域内的四级表位结合。本发明还涉及使用这些结合剂的方法及其用途。

CN 119998313 A

1.一种能够中和沙贝病毒(Sarbecovirus)的结合剂,其特征在于所述结合剂特异性结合至所述沙贝病毒刺突蛋白的区域或结合于所述区域内,所述区域对应于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸E1188至氨基酸Y1206的区域。

2.根据权利要求1所述的结合剂,所述结合剂特异性结合至所述刺突蛋白的区域或结合于所述区域内,所述区域对应于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸E1188至氨基酸L1203的区域,或优选氨基酸E1188至氨基酸L1202的区域。

3.根据权利要求1或2所述的结合剂,所述结合剂特异性结合至所述刺突蛋白的区域或结合于所述区域内,所述区域对应于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸N1194至氨基酸L1203的区域,或优选氨基酸E1194至氨基酸L1202的区域。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合至所述沙贝病毒刺突蛋白的七肽重复2(HR2)结构域靠近病毒膜的区域。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合至刺突蛋白三聚体中的四级表位。

6.根据权利要求5所述的结合剂,其中来自所述刺突蛋白三聚体的至少两个单体的氨基酸残基对所述四级表位有贡献。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合至与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199或Q1201对应的刺突蛋白的至少一个氨基酸残基;或者其中与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的所述氨基酸残基N1194、S1196、D1199或Q1201对应的刺突蛋白的至少一个氨基酸残基对于所述结合剂与刺突蛋白的结合是必不可少的。

8.根据权利要求1至6中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合至与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196或Q1201对应的刺突蛋白的至少一个氨基酸残基;或者其中与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的所述氨基酸残基S1196或Q1201对应的刺突蛋白的至少一个氨基酸残基对于所述结合剂与刺突蛋白的结合是必不可少的。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合至与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196和Q1201对应的刺突蛋白氨基酸残基,可选地特异性结合至与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201对应的刺突蛋白氨基酸残基;或者其中SEQ ID NO:86所定义的所述SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196和Q1201,可选地与所述SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201对应的刺突蛋白氨基酸残基对于所述结合剂与刺突蛋白的结合是必不可少的。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂稳定刺突蛋白的融合前构象,例如其中所述结合剂稳定刺突蛋白中的HR2卷曲线圈结构。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的结合剂,其中:

-所述结合剂能够中和沙贝病毒,其中50%抑制浓度(IC_{50})为100ng/ml或更低,优选10ng/ml或更低,更优选1ng/ml或更低,如在沙贝病毒刺突蛋白假病毒中和测定(诸如水泡性口炎病毒(VSV)-沙贝病毒刺突蛋白假病毒中和测定)中测定的;

-所述结合剂能够中和SARS-CoV-2和SARS-CoV-1中的任一者或两者,所述SARS-CoV-2

诸如SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1毒株、SARS-CoV-2Alpha变体、SARS-CoV-2OmicronBA.1变体、SARS-CoV-2Omicron BA.2变体、SARS-CoV-2Omicron BA.5变体、SARS-CoV-2Omicron BA.2.75.2变体、SARS-CoV-2Omicron BA.4.6变体、SARS-CoV-2Omicron BF.7变体、SARS-CoV-2Omicron BQ.1.1变体、SARS-CoV-2Omicron XBB变体和SARS-CoV-2Omicron XBB.1.5变体中的一者或多者;

-所述结合剂能够抑制表达所述沙贝病毒刺突蛋白的细胞与表达血管紧张素转化酶2(ACE2)受体的细胞之间的刺突蛋白介导的合胞体形成;并且/或者

-所述结合剂不结合中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的结合剂,所述结合剂包含抗体或抗体片段,或由其组成。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的结合剂,所述结合剂包含免疫球蛋白单可变结构域(ISVD),优选VHH。

14.根据权利要求13所述的结合剂,其中所述ISVD包含由SEQ ID NO:63、46、69或77中任一者所定义的互补决定区1(CDR1)、由SEQ ID NO:64、47、70、73或78中任一者所定义的互补决定区2(CDR2)以及由SEQ ID NO:48、67、74或79中任一者所定义的互补决定区3(CDR3);优选地由SEQ ID NO:65、71、49或80中任一者所定义的CDR1、由SEQ ID NO:66、72、50、75或81中任一者所定义的CDR2以及由SEQ ID NO:51、68、76或82中任一者所定义的CDR3。

15.根据权利要求13或14所述的结合剂,其中所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3,各自独立地存在于SEQ ID NO:1-10中的任一者中,其中所述CDR1、CDR2和CDR3根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释;优选地,其中所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3的组合,其中所述CDR1、CDR2和CDR3存在于由SEQ ID NO:1-10列出的序列的特定序列中,其中所述CDR1、CDR2和CDR3根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。

16.根据权利要求13至15中任一项所述的结合剂,其中所述ISVD包含由SEQ ID NO:63所定义的CDR1、由SEQ ID NO:64所定义的CDR2和由SEQ ID NO:48所定义的CDR3;优选地由SEQ ID NO:65所定义的CDR1、由SEQ ID NO:66所定义的CDR2和由SEQ ID NO:51所定义的CDR3;更优选地由SEQ ID NO:52-54中的任一者所定义的CDR1、由SEQ ID NO:55-62中的任一者所定义的CDR2和由SEQ ID NO:21-27中的任一者所定义的CDR3。

17.根据权利要求14至16中任一项所述的结合剂,其中所述ISVD包含与选自SEQ ID NO:1-10和127-129的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的结合剂,所述结合剂包含ISVD,所述ISVD包含选自SEQ ID NO:1-10和127-129的氨基酸序列。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的结合剂,所述结合剂为多价形式,优选地其中所述结合剂包含与Fc结构域融合的ISVD。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的结合剂,所述结合剂包含由SEQ ID NO:96、118、130或131中的任一者所定义的氨基酸序列。

21.一种多特异性结合剂,所述多特异性结合剂包括如权利要求1至20中任一项所定义的结合剂,并且还包括特异性结合至沙贝病毒刺突蛋白受体结合域(RBD)的结合剂。

22.根据权利要求21所述的多特异性结合剂,其中特异性结合至所述RBD的所述结合剂

包含能够结合或竞争由SEQ ID NO:124定义的VHH72特异性结合的表位的至少一个ISVD,诸如包含由SEQ ID NO:125或SEQ ID NO:124列出的序列的ISVD或其人源化形式。

23.根据权利要求21或22所述的多特异性结合剂,其中特异性结合至所述RBD的所述结合剂包含能够结合或竞争由SEQ ID NO:126定义的VHH3.117特异性结合的表位的至少一个ISVD,诸如包含由SEQ ID NO:126列出的序列的ISVD或其人源化形式。

24.根据权利要求21至23中任一项所述的多特异性结合剂,所述多特异性结合剂包含由SEQ ID NO:112-117中的任一者所定义的氨基酸序列。

25.一种包含编码根据权利要求1至24中任一项所述的结合剂的多核苷酸序列的核酸分子;包含所述核酸分子的载体;或表达根据权利要求1至24中任一项所述的结合剂或者包含所述核酸分子或所述载体的细胞。

26.一种组合物,所述组合物包含如权利要求1至20中任一项所定义的结合剂,并且还包含特异性结合至沙贝病毒刺突蛋白受体结合域(RBD)的结合剂。

27.根据权利要求26所述的组合物,其中特异性结合至所述RBD的所述结合剂包含能够结合或竞争由SEQ ID NO:124所定义的VHH72特异性结合的表位的至少一个ISVD和能够结合或竞争由SEQ ID NO:126所定义的VHH3.117特异性结合的表位的至少一个ISVD,诸如由SEQ ID NO:119所定义的结合剂。

28.根据权利要求26或27所述的组合物,所述组合物包含由SEQ ID NO:118所定义的结合剂和由SEQ ID NO:119所定义的结合剂。

29.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至20中任一项所述的结合剂、根据权利要求21至24中任一项所述的多特异性结合剂、根据权利要求25所述的核酸分子、根据权利要求25所述的载体或根据权利要求26至28中任一项所述的组合物,以及药学上可接受的载剂;或一种试剂盒,诸如诊断试剂盒,包含根据权利要求1至20中任一项所述的结合剂、根据权利要求21至24中任一项所述的多特异性结合剂或根据权利要求26至28中任一项所述的组合物。

30.根据权利要求1至20中任一项所述的结合剂、根据权利要求21至24中任一项所述的多特异性结合剂、根据权利要求25所述的核酸分子、根据权利要求25所述的载体、根据权利要求26至28中任一项所述的组合物、根据权利要求29所述的药物组合物、或根据权利要求29所述的试剂盒,用于药物用途;优选用于预防或治疗受试者的沙贝病毒感染,或用于诊断受试者的沙贝病毒感染。

31.一种用于检测样品中的沙贝病毒的体外或离体方法,所述方法包括:

-使所述样品与根据权利要求1至20中任一项所述的结合剂或根据权利要求21至24中任一项所述的多特异性结合剂接触,以及

-确定所述结合剂与沙贝病毒或其部分的结合。

沙贝病毒刺突蛋白S2亚基结合剂

技术领域

[0001] 本发明大体上涉及结合剂领域,特别是抗体领域。更具体地,本发明涉及与沙贝病毒(Sarbecovirus)的刺突蛋白(spike)结合的结合剂(特别是抗体及其抗原结合片段),其能够有效中和沙贝病毒(例如SARS-CoV-2,包括SARS-CoV-2变体和SARS-CoV-1)。本发明还涉及使用这些结合剂的方法及其用途。

背景技术

[0002] 严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)是COVID-19的病原体(Zhu等人,2020,N Engl J Med 382:727-733)。SARS-CoV-2感染可能无症状,或可能出现轻度至中度严重症状。然而,在大约10%的患者中,COVID-19会进展到以呼吸困难和低氧血症为特征的更严重阶段,其可能进一步进展为急性呼吸窘迫,通常需要长期重症监护,并导致部分患者死亡。并且,“长期-COVID”(“Long-COVID”)指的是COVID-19感染的长期影响,即使不再检测到SARS-CoV-2病毒。

[0003] 一种特定类型的治疗方法可能依赖于中和抗体,即被动抗体疗法/免疫疗法。SARS冠状病毒的刺突蛋白是中和抗体的主要靶点。该刺突蛋白是I类融合蛋白,由膜远端S1亚基和膜近端S2亚基组成。所述S1亚基包含受体结合域(RBD),针对该结构域的抗体可以具有非常强的中和活性(Whealey等人,2021,Cell Rep 37:109822)。所述S1亚基,特别是N末端结构域和RBD,可以耐受导致抗原变异和免疫逃逸的突变。RBD也是免疫显性的(Piccoli等人,2020,Cell 183:1024-1042)。

[0004] 所述S2亚基负责膜融合,在此过程中S2经历主要的构象变化(Dodero-Rojas等人,2021,eLife 10:e70362)。所述S2亚基更加保守,因此,至少在理论上,其似乎是开发具有广泛抗沙贝病毒保护潜力的中和抗体的有吸引力的靶点。本领域已经描述了几种识别SARS冠状病毒S2亚基保守表位的单克隆抗体。然而,一般来说,这些单克隆抗体表现出较差的病毒中和活性。例如,S2亚基特异性的单克隆抗体L19以9.9-19.8μg/ml的IC_{100}中和真实的SARS-CoV-2病毒(Andreano等人,2021,Cell 184:1821-1835)。Wu等人(2022,JCI Insight 7:ee157597)鉴定出单克隆抗体Mab5和Mab3-2,它们在位于HR2结构域N末端的表位处靶向HR2结构域。两种mAb均具有针对SARS-CoV-2的中和能力,Mab5的IC_{50}值为12.3μg/mL,Mab3-2的IC_{50}值为87.4μg/mL。本领域还报道了针对SARS-CoV-2 S2亚基的单域抗体(也称为纳米抗体或VHH)(Mast等人,2021,eLife 110:e73027;Rossotti等人,2021,DOI:10.1101/2021.12.20.473401)。同样,报道的结合S2亚基的VHH显示出非常低的SARS-CoV-2中和效力。与IgG1-Fc融合的S2亚基特异性VHH S2A3,如Rossotti等人(2021)所述,能够以12.2nM的IC_{50}中和SARS-CoV-2的Wuhan-Hu-1毒株,但不在该模式的情况下是不具有中和性的。

[0005] 因此,本领域仍然需要靶向沙贝病毒的刺突蛋白的有效中和抗体。

发明内容

[0006] 如说明本发明某些实施方式的实验部分所证明的,发明人鉴定了有效中和SARS-

CoV-2的沙贝病毒特异性重链抗体可变结构域(VHH),包括SARS-CoV-2变体,例如SARS-CoV-2D614G变体、SARS-CoV-2Alpha变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.5变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.4.6变体、SARS-CoV-2 Omicron BF.7变体、SARS-CoV-2 Omicron BQ.1.1变体、SARS-CoV-2 Omicron XBB变体和SARS-CoV-2 Omicron XBB.1.5变体和SARS-CoV-1。通过进一步分析,发现这些VHH与刺突蛋白S2亚基内(特别是S2亚基的七肽重复2(HR2)的结构域内,更特别地是HR2结构域的靠近病毒膜的C端区域内)的氨基酸相互作用,这些氨基酸在多个进化枝的沙贝病毒的刺突蛋白中非常保守。因此,该区域预计会更加稳定,且不易受到频繁突变的影响。

[0007] 因此,在一个方面,本发明涉及能够中和沙贝病毒的结合剂,其特征在于所述结合剂特异性结合至沙贝病毒刺突蛋白的七肽重复2(HR2)结构域的邻近病毒膜区域。

[0008] 一个方面提供了能够中和沙贝病毒的结合剂,其特征在于所述结合剂特异性结合沙贝病毒的刺突蛋白或结合于其一个区域内,所述区域对应于所述SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸E1188至氨基酸Y1206的区域,如SEQ ID NO:86中所定义。

[0009] 在特定的优选实施方式中,所述结合剂特异性结合刺突蛋白或结合于其一个区域内,所述区域对应于所述SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸E1188至氨基酸L1203的区域,如SEQ ID NO:86中所定义。

[0010] 在特定的优选实施方式中,所述结合剂特异性结合刺突蛋白或结合于其一个区域内,所述区域对应于所述SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸E1188至氨基酸L1202的区域,如SEQ ID NO:86中所定义。

[0011] 这种与刺突蛋白更保守的S2亚基结合的沙贝病毒中和结合剂是有价值的工具,可以添加到SARS-CoV-2的可选治疗方案中,目前的SARS-CoV-2的可选治疗方案数量仍然有限,特别是考虑到多种新出现的SARS-CoV-2变体,其中一些更具传染性和/或导致更严重的疾病症状(包括在年轻人中)和/或逃避一些现有的疫苗和/或诊断测试。

[0012] 在另一方面,本发明涉及一种包括编码根据本发明的结合剂的多核苷酸序列的核酸分子,以及包括所述核酸分子的载体;和包括所述核酸分子或所述载体的细胞,或表达根据本发明的结合剂的细胞。

[0013] 本发明还涉及药物组合物,所述药物组合物包括根据本发明的结合剂,或如上所述的核酸分子或载体;和药学上可接受的载体;以及涉及包含根据本发明的结合剂的试剂盒,例如诊断试剂盒。

[0014] 另一方面涉及根据本发明的结合剂、如上所述的核酸分子或载体、用于医学用途的如上所述的药物组合物或试剂盒,例如用于预防或治疗受试者中的沙贝病毒感染的用途或用于诊断在受试者中的沙贝病毒感染的用途。

[0015] 本发明还涉及用于检测样品中的沙贝病毒的体外或离体方法,所述方法包括:

[0016] -使样品与根据本发明的结合剂接触,和

[0017] -确定所述结合剂与沙贝病毒或其部分的结合。

[0018] 从下面提供的详细描述和实施例,本领域技术人员将认识到本发明的方法、用途或产品的许多其他效果和优势,以及本发明的最终用途的多种可能性。

附图说明

[0019] 图1:分离克隆的大肠杆菌(E.coli)周质提取物(PE)中存在的VHH在ELISA中结合重组SARS-CoV-2刺突蛋白(SC2 S(6P))、SARS-CoV-2RBD(SC2RBD)、SARS-CoV-2 S2亚基(SC2 S2)和SARS-CoV-1刺突蛋白(SC1 S)。(A)用ELISA板上包被的抗His抗体捕获的SARS-CoV-2刺突蛋白进行3轮生物淘选(R1-R3)后分离的克隆(R3_Cxx)的ELISA。(B)用抗His抗体捕获的SARS-CoV-2刺突蛋白进行3轮生物淘选(R1-2),然后用直接包被的SARS-CoV-2刺突蛋白进行生物分选(R3),分离的克隆(R3_DCxx)的ELISA。(C)用ELISA板上包被的抗His抗体捕获的SARS-CoV-2刺突蛋白进行4轮生物淘选(R1-R4)后分离的克隆(R4_Cxx)的ELISA。(D)用抗His抗体捕获的SARS-CoV-2刺突蛋白进行4轮生物淘选(R1-2),然后用直接包被的SARS-CoV-2刺突蛋白进行生物分选(R3-R4),分离的克隆(R4_DCxx)的ELISA。该图显示了对于每个PE样品的指定抗原的ELISA OD450信号与相应PE样品的对照抗原(BSA)的ELISA OD450信号的比率。从表达结合RBD的VHH、VHH3.83(3.83)的大肠杆菌细胞制备的周质提取物被用作对照。用于制备周质提取物的缓冲液被用作阴性对照(TES)。

[0020] 图2:能够结合SARS-CoV刺突蛋白S2亚基的VHH的序列分析。(A)结合SARS-CoV刺突蛋白S2亚基的家族1 VHH的比对。基于完整VHH序列的比对,可以鉴定结合S2的VHH的两个家族(家族1和家族2)。显示了家族1 VHH的序列:R3_C4和R3_DC13(SEQ ID NO:1)、R3_DC19(SEQ ID NO:83)、R3_DC21和R3_DC22(SEQ ID NO:84)、R3_C22和R4_DC16(SEQ ID NO:2)、R3_DC20(SEQ ID NO:3)、R3_DC1、R3_DC9、R3_DC14和R3_DC15(SEQ ID NO:9)、R3_DC2(SEQ ID NO:4)、R4_DC20(SEQ ID NO:5)、R3_DC12和R4_DC13(SEQ ID NO:10)、R3_DC5(SEQ ID NO:85)、R4_DC24、R4_DC21、R3_DC11和R4_DC9(SEQ ID NO:6)、R3_DC8、R4_DC3和R4_DC6(SEQ ID NO:7)、R3_DC23(SEQ ID NO:8)。氨基酸残基编号根据Kabat编号进行。根据Kabat注释的CDR1、2和3分别由左、中、右框表示。(B)基于CDR3氨基酸序列对家族1 VHH进行种系进化分析。选择灰色标记的VHH用于中等规模生产和Ni-NTA纯化。用“*”表示的VHH包含N-糖基化位点基序。

[0021] 图3:选定的结合S2的VHH识别SARS-CoV-1、SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体的刺突蛋白和SARS-CoV-2 S2亚基,但不识别SARS-CoV-2RBD。图表显示了指定VHH(包括结合GFP的VHH对照(GBP)、S309对照单克隆抗体)的梯度稀释液针对包被在基质上的SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1的刺突蛋白S-6P(A)、RBD(E)和S2亚基(D)、Omicron BA.1 SARS-CoV-2的刺突蛋白(B)和SARS-CoV-1的刺突蛋白(C),以及针对包被有BSA的基质(F)的OD450 ELISA信号。

[0022] 图4:靶向S2的VHH有效结合细胞表面表达的刺突蛋白。(A)R3_DC23、R4_DC6和结合GFP的VHH(GBP)对照与表达SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞的结合的流式细胞术分析。该图显示了AF647缀合的抗小鼠IgG的平均荧光强度(MFI),用于检测VHH与表达GFP的细胞的结合,这些细胞用GFP表达载体与SARS-CoV-2刺突蛋白(614G-del18)表达载体(刺突蛋白D614G)组合转染。(B)R3_DC23、R4_DC6和GBP对照VHH与不表达SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞的结合的流式细胞术分析。该图显示了AF647缀合的抗小鼠IgG的MFI,用于检测VHH与表达GFP的细胞的结合,这些细胞用GFP表达载体与对照表达载体组合转染。

[0023] 图5:靶向S2的VHH中和用SARS-CoV-2 614G刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒。Vero E6细胞用SARS-CoV-2 614G刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒转导,该病毒已与不

同浓度的指定VHH预孵育。15小时后,用荧光计测量GFP荧光值。(A)图表显示VHH梯度稀释液(N＝3±SD)的平均GFP荧光强度,每个均基于为未感染的对照细胞和未处理的感染细胞的GFP荧光强度值标准化,在每个梯度稀释液中都包括这两者。(B)对于每个VHH梯度稀释液,使用线性回归曲线拟合计算IC50(对数(抑制剂)vs.标准化反应,具有可变斜率)。该图显示了每个测试的中和VHH的IC50计算值(N＝3±SD)。

[0024] 图6:靶向S2的VHH可以阻碍TMPRSS2介导的用SARS-CoV-2 614G刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒的感染。Vero E6-TMPRSS2细胞用SARS-CoV-2 614G刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒转导,该病毒已与不同浓度的指定VHH预孵育。15小时后,用荧光计测量GFP荧光值。(A)图表显示VHH梯度稀释液(N＝3±SD)的平均GFP荧光强度,每个均基于未感染的对照细胞和未处理的感染细胞的GFP荧光强度值标准化,在每个板上都包括这两者。(B)对于每个VHH梯度稀释液,使用线性回归曲线拟合计算IC50(对数(抑制剂)vs.标准化反应,具有可变斜率)。该图显示了每个测试的中和VHH的IC50计算值(N＝3±SD)。

[0025] 图7:靶向S2的VHH中和具有复制能力的VSV-GFP报告病毒,其用SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1刺突蛋白假型化。将100PFU的Koenig等人(2021)描述的具有复制能力的VSV-GFP报告病毒(VSV-ΔG SC2S EGFP S10a)与指定VHH进行预孵育并用于感染Vero E6细胞。感染后的2天,用荧光计测量GFP荧光值。(A)图表显示VHH梯度稀释液(N＝2±SD)的平均GFP荧光强度,每个均基于未感染的对照细胞和未处理的感染细胞的GFP荧光强度值标准化,在每个梯度稀释液中都包括这两者。(B)对于每个VHH梯度稀释液,使用线性回归曲线拟合计算IC50(对数(抑制剂)vs.标准化反应,具有可变斜率)。该图显示了每个测试的中和VHH的IC50计算值(N＝2±SD)。

[0026] 图8:靶向S2的VHH中和用SARS-CoV-2 Omicron BA.1刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒。Vero E6细胞用SARS-CoV-2 Omicron BA.1刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒转导,该病毒已与不同浓度的指定VHH预孵育。已知可中和SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体的S309单克隆抗体被用作阳性对照。15小时后,用荧光计测量GFP荧光值。(A)图表显示VHH梯度稀释液(N＝1)的平均GFP荧光强度,每个均基于未感染的对照细胞和用最低VHH浓度处理的感染细胞的GFP荧光强度值标准化,在每个梯度稀释液中都包括这两者。(B)对于每个VHH梯度稀释液,使用线性回归曲线拟合计算IC50(对数(抑制剂)vs.标准化反应,具有可变斜率)。该图显示了每个测试的中和VHH的IC50计算值(N＝1)。

[0027] 图9:靶向S2的VHH中和用SARS-CoV-1刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒。Vero E6细胞(A)或VeroE6-TMPRSS2细胞(B)用SARS-CoV-1刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒转导,该病毒已与不同浓度的指定VHH预孵育。已知可中和SARS-CoV-1的VHH72-S56A纳米抗体被用作阳性对照。15小时后,用荧光计测量GFP荧光值。图表显示VHH梯度稀释液(N＝2±SD)的平均GFP荧光强度,每个均基于未感染的对照细胞和未处理的感染细胞的GFP荧光强度值标准化,在每个梯度稀释液中都包括这两者。(C)对于每个VHH梯度稀释液,使用线性回归曲线拟合计算IC50(对数(抑制剂)vs.标准化反应,具有可变斜率)。该图显示了在Vero E6和Vero E6-TMPRSS2细胞两者中每个测试的中和VHH的IC50计算值(N＝2±SD)。

[0028] 图10:靶向S2的VHH中和用SARS-CoV-2 Omicron BA.2刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒。VeroE6细胞用614G刺突蛋白或Omicron BA.1或Omicron BA.2变体刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒转导,该病毒已与不同浓度的指定VHH预孵育。15小时后,用荧光计测

量GFP荧光值。(A)图表显示VHH梯度稀释液(N＝2±SD)的平均GFP荧光强度,每个均基于未感染的对照细胞和未处理的感染细胞的GFP荧光强度值标准化,在每个梯度稀释液中都包括这两者。(B)对于每个VHH梯度稀释液,使用线性回归曲线拟合计算IC50(对数(抑制剂)vs.标准化反应,具有可变斜率)。该图显示了用SARS-CoV-2 614G刺突蛋白(614G)或Omicron BA.1(BA.1)或Omicron BA.2(BA.2)变体刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒转导的Vero E6细胞上每个测试的中和VHH的计算ICS0值(N＝2±SD)。

[0029] 图11:靶向S2的VHH能够中和真实的614G和Omicron SARS-CoV-2病毒。将R3_DC23或R4_DC6系列稀释液与约40PFU的614G变体SARS-CoV-2或Omicron BA.1SARS-CoV-2病毒在37℃下预孵育1小时,随后用于感染Vero E6-TMPRSS2细胞。已知可中和Alpha和Omicron BA.1 SARS-CoV-2变体的抗体S309被用作阳性对照。感染2天后,固定细胞并用结晶紫染色以观察病毒噬菌斑。该图显示了指定VHH或抗体浓度下614G(A)或Omicron BA.1(B)病毒噬菌斑的平均数量(对于R3_DC23和R4_DC6,N＝2±SD;对于S309,N＝1)。使用非线性回归(对数(抑制剂)与具有可变斜率的反应(四个参数))拟合曲线。

[0030] 图12:靶向S2的VHH不会引起S1亚基的脱落。(A)显示表达(Raji刺突蛋白)或不表达(Raji)SARS-CoV-2刺突蛋白Raji细胞的生长培养基(SN)和细胞裂解物(LYS)的抗S1蛋白质印迹(Western blot)分析的图,所述Raji细胞与指定的VHH构建体共孵育了30分钟。已知分别引起和不引起S1脱落的CB6和S309抗体被用作对照。印迹图右侧的下方三角形和上方三角形分别表示弗林蛋白酶(furin)介导的刺突蛋白切割后生成的S1刺突蛋白亚基和细胞未切割的刺突蛋白。(B)S1脱落的量化。该图显示了在生长培养基中检测到的S1蛋白质印迹信号(脱落)和在细胞裂解物中检测到的S1蛋白质印迹信号(非脱落+细胞内)的计算比率。

[0031] 图13:靶向S2的VHH有效抑制融合。VHHR3_DC23可阻碍感染了由SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的具有复制能力的表达GFP的VSV病毒的Vero E6-TMPRSS2细胞汇合单层的合胞体形成。Vero E6-TMPRSS2细胞用40PFU的SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的具有复制能力的VSV病毒感染,2小时后将指定的单克隆抗体(帕利珠单抗(palivizumab)、S309或CB6)或VHH(GBP或R3_DC23)添加到最终浓度为10μg/ml。未感染的细胞被用作阴性对照。将细胞孵育过夜并用荧光显微镜成像。用荧光计测量GFP荧光值。(A)用指定VHH或单克隆抗体处理的感染细胞表达的GFP的代表性图像。(B)显示GFP荧光强度的图(平均值±SEM,N＝4)。在S309处理的样品中测量的GFP荧光值显著低于在用帕利珠单抗对照抗体处理的样品中的GFP荧光值($p<0.05$,曼-惠特尼检验(Mann-Whitney))。在R3_DC23处理的样品中测量的GFP荧光值显著低于在用GBP对照VHH处理的样品中的GFP荧光值($p<0.05$,曼-惠特尼检验(Mann-Whitney))。在R3_DC23处理的样品中测量的GFP荧光值显着低于在用S309处理的样品中的GFP荧光值($p<0.05$,曼-惠特尼检验(Mann-Whitney))。

[0032] 图14:靶向S2的VHH有效抑制融合。Vero E6-TMPRSS2细胞用40PFU的SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的具有复制能力的VSV病毒感染,2小时后添加指定单克隆抗体(S309或CB6)或VHH(GBP、R3_DC23、R3_C4或R3_DC20)的梯度稀释液。未感染的细胞被用作阴性对照。将细胞孵育过夜并用荧光显微镜成像。用荧光计测量GFP荧光值。(A)用10、0.4或0.0032μg/ml的指定VHH或单克隆抗体处理的感染细胞表达的GFP的代表性图像。箭头表示单个GFP阳性感染细胞。(B)显示GFP荧光强度的图(平均值±SEM,N＝2)。

[0033] 图15:靶向S2的VHH有效抑制表达刺突蛋白的Vero E6细胞的融合。Vero E6细胞用

GFP表达载体与对照表达载体(无刺突蛋白)或SARS-CoV-2刺突蛋白表达载体组合转染。转染后2小时,添加PBS或指定单克隆抗体(S309或帕利珠单抗)或VHH(R3_DC23或R3_C4)至终浓度为10μg/ml。转染后22小时,将细胞固定并使用荧光显微镜成像。图显示了指定样品的代表性图像。无刺突蛋白＝PBS处理的细胞,其用GFP表达载体与对照表达载体组合转染;PBS、帕利珠单抗、R3_DC23、R3_C4和S309＝用GFP表达载体与SARS-CoV-2刺突蛋白表达载体组合转染的细胞,并用各自的构建体处理。

[0034] 图16:VHH.R3_DC23在HR2区域的近膜位点处结合刺突蛋白。使用具有复制能力的表达GFP的VSV病毒在Vero E6-TMPSS2细胞上进行病毒逃逸选择,该病毒用具有完整的弗林蛋白酶切割位点的SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1刺突蛋白进行假型化。使用有限稀释从在10μg/ml的VHH.R3_DC23存在下显示合胞体形成的孔中分离出单个噬菌斑。对获得的逃逸变体的刺突蛋白编码序列进行测序并与WT病毒的序列进行比对。每种选定的病毒都含有一个氨基酸取代。(A)R3_DC23结合区的序列。VHH.R3_DC23的病毒逃逸选择与HR2内受限的膜近端区域内4个位置的5个不同AA取代相关。所示序列(SEQ ID NO:88)对应于由茎(stem)-螺旋(helix)和七肽重复2(HR2)结构域组成的刺突蛋白茎区(氨基酸1140-1211)。粗体和下划线的氨基酸表示在分离的9个逃逸变体中突变的位置。Asp(N)和Leu(L)之间粗体且带下划线的Asn(N)是N-糖基化位点(B)R3_DC23结合区的结构细节。左边的图代表全长SARS-CoV-2刺突蛋白的模型,其上标有跨膜区(TM)和HR2(Casalino等人(2020)ACS Cent Sci.6:1722-1734)。中间的图和右边的图是分别以表面图和卡通图形式显示了HR2结构域的放大图(2FXP,Hakansson-McReynolds等人(2006)J Biol Chem.281:11965-71)。在表面图显示的图像中,棒代表模型中的糖部分,TM用灰色表示,所选突变位于3个原聚体(protomer)中的位置用黑色表示。在中间的图中,箭头分别指出原聚体1内的N1192和Q1201突变位置。另外2个可见的逃逸突变(以黑色表示)分别位于原聚体3和2中。在卡通图中显示的原聚体中的一个中,观察到突变的位置以黑色棒表示。

[0035] 图17:VHH.R3_DC23在HR2结构域中的一位点处结合刺突蛋白,该位点在沙贝病毒中高度保守。Letko等人(2020,Nature Microbiology 5:562-569)研究了一组1、2和3进化枝沙贝病毒的刺突蛋白茎区的氨基酸序列,并补充了BtKY72分支3沙贝病毒的氨基酸序列,对其进行了比对以可视化其保守性:Wuhan_SARS-CoV-2、WIV1、Rs4084、SHC014、Rs7327、Rs4231、SARS-CoV_Urbani、Longquan-140、HKU3-8、HKU3-13、Rs4237、Rs4247、As5626、Rp3、279、Rs4081、Yunnan2011、Hub2013、Shaanxi2011、YN2013和Rf4098(SEQ ID NO:88);LYRa11(SEQ ID NO:89);273-2005、Rf1、HeB2013和JL2012(SEQ ID NO:90);GX2013(SEQ ID NO:91);ZC45(SEQ ID NO:92);ZXC21(SEQ ID NO:93);BM48-31(SEQ ID NO:94);和BtKY72(SEQ ID NO:95)。以灰色标记的线性序列(对应于SEQ ID NO:86所示的SARS-CoV2 Wuhan-Hu-1毒株刺突蛋白的氨基酸1192-1201)包含在分离的R3_DC23逃逸变体中突变的位置。粗体和下划线的氨基酸是在分离的R3_DC23逃逸变体中突变的氨基酸。序列根据相应沙贝病毒的进化枝(如右侧所示)进行分组。

[0036] 图18:VHH.R3_DC23的Fc融合蛋白有效结合细胞表面表达的刺突蛋白。对R3_DC23-Fc(YTE)和对照抗体帕利珠单抗与表达SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞的结合进行流式细胞术分析。该图显示了AlexaFluor(AF)633缀合的抗人IgG的平均荧光强度(MFI),用于检测与(A)与SARS-CoV-2刺突蛋白(614G-del18)表达载体(刺突蛋白D614G)组合,或与(B)对照表

达载体组合(空载体)组合的情况下,R3_DC23-Fc(YTE)或帕利珠单抗与用GFP表达载体转染的表达GFP的细胞的结合。

[0037] 图19:R3_DC23-Fc(YTE)可有效中和用SARS-CoV-2 614G刺突蛋白或Omicron BA.1和BA.2刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒。Vero E6细胞用使用SARS-CoV-2刺突蛋白614G或使用SARS-CoV-2 Omicron BA.1或Omicron BA.2变体的刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒转导,这些报告病毒已与不同浓度的R3_DC23-Fc(YTE)(N=3)、帕利珠单抗(N=1)、CB6(N=1)或单价VHH.R3_DC23(N=1)预孵育。15小时后,用荧光计测量GFP荧光值。(A)图表显示VHH梯度稀释液(对于R3_DC23-Fc(YTE),N=3±SD)的平均GFP荧光强度,每个均基于未感染的对照细胞和未处理的感染细胞的GFP荧光强度值标准化,在每个梯度稀释液中都包括这两者。(B)对于每个VHH梯度稀释液,使用线性回归曲线拟合计算IC50(对数(抑制剂)vs.标准化反应,具有可变斜率)。该图显示了每个测试的抗体构建体的IC50计算值(对于R3 DC23-Fc(YTE),N=3±SD)。

[0038] 图20:VHH R3_DC23氨基酸序列和本文使用的不同CDR标注的图示。根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT和MacCallum的CDR标注,位于对应于VHH R3_DC23(SEQ ID NO:8)序列的灰色标记框中。

[0039] 图21:使用R3_DC23-Fc进行预防性治疗可保护K18-hACE2小鼠免受致命的SC2感染。在气管内感染3*10^2pFU的SARS-CoV-2 614G变体病毒前20小时,K18-hACE2小鼠腹腔注射100μg R3_DC23-Fc或同型对照抗体(帕利珠单抗),或不进行治疗。通过测量体重变化和人道终点评分来每天监测动物。(A)该图显示用R3_DC23-Fc(n=3±SEM)、帕利珠单抗(n=2±SEM)治疗的小鼠,或未治疗小鼠(n=6±SEM)的平均相对体重变化。与用帕利珠单抗治疗的小鼠($p<0.05$)或未治疗的小鼠($p<0.01$)相比,用R3_DC23-Fc治疗的小鼠表现出显著较少的体重减轻(使用Šídák的多重比较测试进行混合效应分析)。(B)该图显示了指定组动物存活部分的Kaplan-Meier曲线。当小鼠在体重减轻超过25%(根据第0天的体重定义)或达到人道终点的高分时,进行安乐死。

[0040] 图22:SARS-CoV-1和-2S2亚基特异性VHH的鉴定(A)在用SARS-CoV-2刺突蛋白进行3(R3)或4(R4)次生物淘选后分离的VHH克隆的大肠杆菌周质提取物(PE)的筛选,所述SARS-CoV-2直接包被(DC)或通过包被的抗HIS IgG(C)捕获,以用于与指定的重组刺突蛋白或其片段结合。热图显示了对于每个PE样品(10倍稀释)的指定抗原的ELISA OD450信号与相应PE样品的对照抗原(BSA)的ELISA OD450信号的比率。从表达结合RBD的VHH的大肠杆菌细胞制备的周质提取物被用作对照。用于制备周质提取物(TES)的缓冲液被用作阴性对照。(B)在用SARS-CoV-2刺突蛋白进行3(R3)或4(R4)次生物淘选后分离的VHH克隆的大肠杆菌周质提取物(PE)的筛选,所述SARS-CoV-2直接包被(DC)或通过包被的抗HISIgG(C)捕获,以用于中和由SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的VSV颗粒。热图显示了每个PE样品(100倍稀释)的SARS-CoV-2刺突蛋白假型化VSV颗粒的中和水平。

[0041] 图23:靶向S2的VHH与表达SARS-CoV-2 614G、BA.1、BA.2、BA.5、BQ1.1和MERS刺突蛋白的细胞结合。结合SARS-CoV-2RBD的VHH72-S56A和S309被用作阳性对照,结合GFP的VHH GBP被用作阴性对照。通过MERS特异性VHH55的结合证实了MERS刺突蛋白的表达(数据未显示)。该图显示了转染(GFP+)细胞的MFI与未转染(GFP-)细胞的MFI的比率。

[0042] 图24:通过结合S2的VHH来中和用SARS-CoV-2 614G、BA2、BA.5、XBB、BQ1.1和SARS-

CoV-1的刺突蛋白假型化的VSV颗粒。该图显示了从至少2次独立中和测定(E)计算得出的平均值(线)和单独(点)IC50值。

[0043] 图25:靶向S2的VHH可有效中和具有复制能力的SARS-CoV-2假型化病毒。将Vero E6(A)或Vero E6-TMPRSS2(B)细胞用SARS-CoV-2 VSV-S假型化的具有复制能力的GFP报告病毒感染,该病毒已与指定VHH的梯度稀释液预孵育。VHH72-S56A作为阳性对照,GFP结合蛋白(GBP)作为阴性对照。显示了每个稀释度的两次技术重复的平均GFP强度,误差条代表标准偏差。

[0044] 图26:靶向S2的VHH确实抑制刺突蛋白介导的膜融合。(A)靶向S2的VHH不会干扰刺突蛋白与ACE2的结合。该图显示了ELISA的OD450信号,其在R3DC23梯度稀释液存在的情况下测试了人ACE2-muFc与含有失活弗林蛋白酶切割位点的包被重组刺突蛋白的结合。结合GFP的VHH(GBP)被用作阴性对照,VHH72-S56A和CB6均与ACE2竞争结合RBD,被用作阳性对照。(B)靶向S2的VHH不会诱导S1的脱落。该图显示了表达(Raji刺突蛋白)或不表达(Raji)SARS-CoV-2刺突蛋白Raji细胞的生长培养基(SN)和细胞裂解物(LYS)的抗S1蛋白质印迹分析,所述Raji细胞与指定的VHH构建体共孵育了30分钟。已知分别引起和不引起S1脱落的CB6和S309抗体被用作对照。印迹图右侧的下方三角形和上方三角形分别表示弗林蛋白酶(furin)介导的刺突蛋白切割后生成的S1刺突蛋白亚基和细胞未切割的刺突蛋白。(C)靶向S2的VHH不会干扰人ACE2-muFc与表达具有完整弗林蛋白酶切割位点的刺突蛋白的细胞的结合。该图显示了在R3DC23存在的情况下,GFP+细胞与GFP-细胞的MFI(检测细胞结合ACE2-muFc)的比率。GBP被用作阴性对照,并且诱导S1脱落并与人ACE2竞争结合RBD的VHH72-S56A被用作阳性对照。虚线表示ACE2-muFc与不表达刺突蛋白的细胞的结合。点状线代表在不存在抗体的情况下ACE2-muFc与表达刺突蛋白的细胞的结合。(D)靶向S2的VHH有效防止受感染细胞形成合胞体。该图显示了在用Wuhan刺突蛋白假型化的复制VSV和含有GFP表达盒的复制VSV感染4小时后,用R3DC23、GBP或S309梯度稀释液处理的Vero E6细胞孔的GFP荧光平均值±SD(N=2)。左边的图像显示了感染40小时后,指定样品的GFP表达。(E)在活细胞成像过程中,在R3DC23、GBP或PBS存在的情况下,对表达刺突蛋白的细胞的合胞体形成进行定量。该图显示了在用GFP和刺突蛋白表达载体共感染或仅用GFP表达载体(无刺突蛋白)共转染4小时后,用所示VHH处理的孔的平均GFP+面积值±SD(N=3)。

[0045] 图27:VHH.R3_DC23在HR2区域的近膜位点处结合刺突蛋白。(A和B)在R3DC23存在的情况下,病毒逃逸变体N1192D、L1197P、L1200P、Q1201R和Q1201K在Vero E6-TMPRSS2和Vero E6细胞中的复制。该图显示了通过模拟感染细胞和不存在R3DC23情况下的感染细胞的GFP荧光值标准化的GFP水平的平均值±SEM(N=4)。(C)R3DC23与表达Wuhan和N1192D、L1197P、L1200P、Q1201R或Q1201K刺突蛋白变体的细胞的结合。该图显示了用指定浓度的R3DC23、10μg/ml VHH55或1μg/ml S309染色的转染细胞(GFP+)的MFI与未转染细胞(GFP-)的MFI之比。(D)通过经感染的VeroE6细胞的生命细胞成像(life cellimaging)测定,用SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1(亲本)或选定的逃逸变体假型化的具有复制能力的VSV的病毒复制动力学。该图显示了感染后指定时间点受感染细胞每孔的GFP+面积平均值±SEM(N=5)。(E)HR2卷曲线圈结构(coiled coil)(PDB:2FXP)的展示,其中显示了在逃逸变体中观察到取代的位置(N1192、L1197、L1200和Q1201)。6XVV_1_1_1中建模的N1194处偶联的聚糖以棒状图表示。虚线代表病毒膜。左图中间卷曲线圈结构的α螺旋对应于(A)中下划线的序列。右

图表示具有N1192、L1197、L1200和Q1201的HR2卷曲线圈结构的俯视图。标出了N1194糖基化位点,并以棒状图标出了6XVV_1_1_1中建模的N-聚糖的第一个GlcNac(参考与6vSB_1_1_2相同)。(F)R3DC23与表达指定SARS-CoV-2刺突蛋白变体的细胞的结合。该图显示了用指定浓度的R3DC23、10μg/ml GBP或1μg/ml S309染色的转染细胞(GFP+)的MFI与未转染细胞(GFP-)的MFI之比。(G和H)通过HDX-MS对重组刺突蛋白上的R3DC23表位的鉴定。这些图显示了两种肽的HDX-MS摄取图:在与R3DC23结合后具有高度的氘化保护的肽(1187-1199)(左图)和肽(1200-1205)(右图)。肽(1187-1199)第1194位的残基被糖基化,糖基化的肽吸收的氘比主链可交换位点的数量(11个位点)更多,因为聚糖可以与主链类似地在酰胺位点吸收并保留氘,如Guttman、Scian和Lee所指出的(2011,ACS分析化学)。(H)Woods图显示对于指定时间点的每个指定肽(由x轴中的残基编号表示),apo刺突蛋白和R3DC23结合的S-2P刺突蛋白之间获得的氘核数量的差异。

[0046] 图28:R3_DC23-HR2复合物的X射线(X-ray)结构。(A)左图:融合前全长S蛋白(6VSB_1_1_2;Woo等人(2020 J.Phys.Chem B 124:7128-7137)与R3_DC23-HR2复合物叠加的模型,全部以分子表面展示的形式展示,N-聚糖以棒状图表示。标记的S蛋白区域为:胞质结构域(CP)、跨膜结构域(TM)、七肽重复2(HR2)、S2茎螺旋(SH)、七肽重复1(HR1)、中央螺旋和连接结构域(CH-CD)。包含N末端结构域(NTD)和受体结合域(RBD)的S1区在融合后构象改变(transition)之前被蛋白水解去除。右图:经蛋白水解处理的融合后S蛋白模型(7E9T;Tai等人(2021 PNAS118:e2112703118))。(B)R3_DC23-HR2复合物与融合前HR2卷曲线圈结构叠加的侧视图和轴向视图(插图)。包含N1192-Y1206的HR2结合表位以棒状图显示。(C)B的方框区的特写,其包含一个VHH和两个HR2拷贝(i和ii),形成相邻的结合表位。标出了逃逸突变位置(N1192、L1197、Q1201)。(D)融合后S蛋白HR1-HR2区域的轴向视图,叠加了R3-DC23-HR2复合物。(E)R3_DC23-HR2复合物中互补位(paratope)-表位接触的结构视图。与两个HR2螺旋(i和ii)结合的单个R3_DC23拷贝的特写视图,互补位和表位中的关键相互作用残基以棒状图显示。候选氢键和盐桥如虚线所示。显示了逃逸突变位置(N1192、L1197、L1200和Q1201)。

[0047] 图29:R3DC23在HR2卷曲线圈结构内与四级(quaternarv)表位结合。左图和右图显示了R3DC23分别与以不同的量包被到半孔96孔ELISA板的三聚体全长刺突蛋白(S-2P)和单体SUMO-HR3的结合(OD450nm),如x轴所示。结合GFP的VHH(GBP)被用作阴性对照。

[0048] 图30:R3DC23的Fc融合蛋白可有效中和多种SARS-CoV-2变体。(A)通过单价的R3DC23、R3C4和R4DC20以及其含有延长半衰期的YTE突变的人IgG1 Fc融合蛋白的人源化对应物(huR3DC23-Fc、huR3C4-Fc和huR4DC20-Fc),对SARS-CoV-2 614G和BA.5刺突蛋白VSV假型化病毒进行中和。这些符号代表通过感染细胞的GFP荧光值测量的相对感染平均值±SD(N=3)。(B)通过人源化(huR3DC23-Fc)和非人源化(R3DC23-Fc)R3DC23的Fc融合蛋白中和SARS-CoV-2 614G刺突蛋白VSV假型化病毒。(C)图表显示了中值(线)和单个(菱形)IC50值,其是通过至少2次独立中和测定计算得到的,这些中和测定使用由指定SARS-CoV-2变体的刺突蛋白进行假型化的VSV。(D)通过结合S2的huR3DC23-Fc和/或R3DC23 VHH中和真实的SARS-CoV-2D614G和BA.1病毒。该图显示了每个VHH稀释梯度的噬菌斑计数平均值±SEM(对于R3DC23和huR3DC23-Fc的N=4,对于S309的N=2)。(E)与临床验证的VHH-Fc XVR011相比,R3DC23-Fc、huR3DC23-Fc、huR3C4-Fc和huR4DC20-Fc的分析疏水相互作用色谱。在ProPac

HIC-10 HPLC上通过(NH4)2SO4梯度洗脱进行表面疏水性的评估,较短的保留时间表明表面疏水性较低。该图显示了每个指定VHH-Fc构建体的重复曲线。

[0049] 图31:人源化R3DC23 Fc融合蛋白的LS突变体可有效中和多种SARS-CoV-2变体并控制仓鼠中的病毒复制。(A)huR3DC23-Fc的LS和YTE变体的分析疏水相互作用色谱的重叠图。在ProPac HIC-10 HPLC上通过$(NH_4)_2SO_4$梯度洗脱进行表面疏水性的评估,较短的保留时间表明表面疏水性较低。显示了每个VHH-Fc的重复曲线。(B)huR3DC23-Fc的LS和YTE变体在分析型SEC中均作为单个(重叠)峰被洗脱。凝胶过滤标准品(Bio-Rad)的摩尔重量标记以灰色表示。曲线和阴影表示三次重复运行的平均值和标准差。(C)经SPR测定的在pH 6.0下huR3DC23-Fc_LS的FcRn结合。将huR3DC23-Fc_LS低密度固定到传感器芯片上后,将250至0.97nM的人FcRn的两倍梯度稀释液注入溶液中(灰色曲线)。拟合了1:1结合模型(黑色曲线)。表9中的支持数据。(D-E)在叙利亚金仓鼠(SyrianGolden hamster)中用huR3DC23-Fc_LS治疗SARS-CoV-2Wuhan感染。雄性叙利亚金仓鼠在第0天经鼻内感染SARS-CoV-2(Wuhan-Hu-1毒株),并在感染4小时后接受腹腔内注射10或2mg/kg的huR3DC23-Fc_LS、10mg/kg的贝贝替洛单抗(bebtelovimab)(阳性对照)或10mg/kg的帕利珠单抗(阴性对照)。第4天对动物实施安乐死,并在第4天测量肺组织中的感染性病毒(D)和病毒RNA(E)。水平条表示肺组织的中位TCID50/克(左图)和RNA拷贝数/克(右图)。点状水平线表示LLOD。*高剂量(10mg/kg)组的2只动物经实验证实未接受过R3DC23hum-Fc_LS治疗。使用单向方差分析(ANOVA)和Dunn多重比较检验(Dunn's multiple comparisontest)对数据进行分析(***P<0.0001)。(#)统计分析中省略了与血清中未检测到或检测到极低水平huR3DC23-Fc_LS的仓鼠相对应的数据点。

[0050] 图32:R3_DC23-Fc(LS)与SARS-CoV-2刺突蛋白结合的特异性。评估了2.5μg/mL的R3_DC23hum-Fc(LS)与6101个全长人质膜蛋白和细胞表面束缚分泌蛋白以及人质膜蛋白细胞阵列中转染的HEK293细胞上表达的396个人异二聚体的结合。显示了文库筛选中初始命中的固定细胞确认筛选。(A)R3_DC23hum-Fc(LS)在2.5μg/mL下的结合。(B)利妥昔单抗(Rituximab)在1μg/mL下的结合。(C)IgG1同种型对照的结合。(D)二抗的结合(PBS代替一抗)。Rep:复制。

[0051] 图33:包含靶向S1和S2的VHH的多特异性构建体。(A、B、C)双特异性串联VHHx-VHHy-Fc构建体的示意图,其中包含靶向S2的VHH(C23)(VHHR3_DC23的人源化形式)和靶向S1的VHH(117)(VHH3.117的人源化形式),其两者间通过10(A)、20(B)或30(C)GS接头间隔开,并通过10GS接头与Fc结构域(人Fc(LS))融合。(D)VHHx-Fc-VHHy构建体的示意图,其中包含靶向S2的VHH(C23)(VHH R3_DC23的人源化形式),其通过10GS接头融合到Fc结构域(人Fc(LS))的N末端,和靶向S1的VHH(117)(VHH3.117的人源化形式),其通过15GS接头融合到C末端。(E)串联VHHx-VHHy-Fc构建体的示意图,其中包含靶向S1的VHH,其结合或竞争VHH72表位(83)(VHH3.83的人源化形式),和靶向S1的VHH,其结合或竞争VHH3.117表位(117)(VHH3.117的人源化形式),其两者间通过20GS接头间隔开,通过10GS接头与Fc结构域(人Fc(LS))融合。(F)三特异性串联VHHx-VHHy-VHHz-Fc构建体的示意图,其中包含靶向S2的VHH(C23)(VHH R3_DC23的人源化形式)、靶向S1的VHH,其结合或竞争VHH3.117表位(117)(VHH3.117的人源化形式),和靶向S1的VHH,其结合或竞争VHH72表位(83)(VHH3.83的人源化形式),其两者间通过20GS接头间隔开,通过10GS接头与Fc结构域(人Fc(LS))融合。

[0052] 图34:包含靶向S1和S2的VHH的组合物。包含靶向S1和S2的结合剂的组合物(XVR012)的示意图。该组合物包含靶向S2的VHH-Fc构建体(XVR013)(与人Fc结构域融合的R3_DC23的人源化形式)和靶向S1的VHHx-Fc-VHHy构建体(XVR014),后者包含能够结合或竞争VHH3.117表位(117)(VHH3.117的人源化形式)的VHH和能够结合或竞争VHH72表位(83)(VHH3.83的人源化形式)的VHH,其两者均与人Fc结构域融合。

[0053] 图35:XVR012、XVR013和XVR014在叙利亚金黄仓鼠SARS-CoV-2攻击模型中的体内功效。叙利亚金黄仓鼠经鼻腔感染了SARS-CoV-2(Wuhan-Hu-1毒株)。在SARS-CoV2攻击后4小时,通过腹腔内注射施用分子XVR012(4mg/kg和20mg/kg)、XVR013和XVR014(2mg/kg和10mg/kg)、帕利珠单抗(10mg/kg,阴性对照)和贝贝替洛单抗(10mg/kg,阳性对照)。图表显示了肺中的病毒复制(A)和肺组织中的病毒RNA载量(B)。每组均报告了具有95%置信区间的中值。虚线水平线表示检测下限(LLOD)。

[0054] 图36:XVR012、XVR013和XVR014介导的ADCC反应。研究进行了Fc γ RIIIa报告测定以评估XVR012、XVR013和XVR014的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。以表达SARS CoV-2刺突蛋白的CHO-K1靶细胞系为靶细胞,以JurkatFc γ RIIIa(CD16)V176-NFAT-RE Luc为报告细胞。研究进行了三次独立的测定运行。该测定采用的效应细胞与靶细胞比例为40:1,样品以8点梯度稀释液进行评估,XVR013和XVR014的起始浓度为30μg/mL,XVR012的起始浓度为60μg/mL,进行三次独立重复(每次运行3个测定板)。在30μg/ml的单一浓度下评估了同种型对照。在添加SteadyGlo(发光终点)之前,将测定板孵育过夜(21小时±1小时)。原始发光值表示为测试样品对照孔(反应)和阴性对照孔(不存在测试样品,包含靶细胞系的孔)的平均值。研究报告了XVR012、XVR013和XVR014的平均值(N=3±SD)。

[0055] 图37:XVR012、XVR013和XVR014在叙利亚金黄仓鼠SARS-CoV-2攻击模型中的体内预防功效。在SARS-CoV2攻击前约24小时,通过腹腔内注射给叙利亚金黄仓鼠施用10mg/kg XVR014和1mg/kg XVR013的混合物(XVR012)、1mg/kg XVR013或10mg/kgXVR014。图表显示了肺中的病毒载量。每组包含6只动物,并且每组均显示了具有95%置信区间的中值。图中的虚线水平线表示检测下限(LLOD)。

[0056] 图38:XVR012、XVR013和XVR014在叙利亚金黄仓鼠SARS-CoV-2攻击模型中的体内治疗功效。叙利亚金黄仓鼠感染了SARS-CoV-2(Wuhan-Hu-1毒株)。在SARS-CoV2攻击后4小时,通过腹腔内注射施用5mg/kgXVR014和0.5mg/kgXVR013的混合物、10mg/kgXVR014和1mg/kg XVR013的混合物、或20mg/kg XVR014和2mg/kg XVR013的混合物(XVR012);0.5mg/kg、1mg/kg或2mg/kg XVR013;或5mg/kg、10mg/kg或20mg/kg XVR014。对照组动物接受10mg/kg帕利珠单抗(阴性对照),并且一组动物接受10mg/kg贝贝替洛单抗(用作阳性对照)。图表显示了肺中的病毒载量。每组包含6只动物,并且每组均显示了具有95%置信区间的中值。图中的虚线水平线表示检测下限(LLOD)。

[0057] 图39.使用R3_DC23-Fc进行预防性治疗可保护K18-hACE2小鼠免受致命的SARS-CoV-2感染。在用3*10^2PFU SARS-CoV-2 614G变体病毒进行气管内感染前20小时,给K18-hACE2小鼠施用100μg R3_DC23-Fc,给第二组K18-hACE2小鼠和非易感野生型(WT)小鼠施用100μg同种型对照抗体(帕利珠单抗)。通过测量体重变化和人道终点评分来每天监测动物。(A)该图显示了指定组动物存活部分的Kaplan-Meier曲线。当小鼠在体重减轻超过25%(根据第0天的体重定义)或达到25项人道终点的高分时,进行安乐死。与用帕利珠单抗处理的

K18-hACE2小鼠(n＝5)相比,用R3_DC23-Fc处理的K18-hACE2小鼠(n＝5)显著避免了死亡(p＝0.0016,对数秩,Mantel-cox检验)。(B)该图显示了用R3_DC23-Fc(n＝5±SEM)或帕利珠单抗(n＝5±SEM)处理的K18-hACE2小鼠以及用帕利珠单抗处理(n＝5±SEM)的WT小鼠的平均相对体重。从第4天开始,与用帕利珠单抗处理的小鼠相比,用R3_DC23-Fc处理的小鼠表现出显著较少的体重减轻(p<0.001)(双向方差分析,Tukey多重比较检验)。

[0058] 图40.使用R3_DC23-Fc进行预防性治疗可降低受感染K18-hACE2小鼠肺中SARS-CoV-2的病毒复制。在用3*10^2PFUSARS-CoV-2 614G变体病毒进行气管内感染前20小时,给K18-hACE2小鼠施用100μg R3_DC23-Fc,给第二组K18-hACE2小鼠和非易感野生型(WT)小鼠施用100ug同种型对照抗体(帕利珠单抗)。通过测量体重变化和人道终点评分来每天监测动物。(A)该图显示了与用帕利珠单抗处理的K18-hACE2小鼠(n＝4)和用帕利珠单抗(n＝5)处理的WT小鼠相比,用R3_DC23-Fc(n＝5)处理的K18小鼠动物存活部分的Kaplan-Meier曲线。(B)该图显示了用R3_DC23-Fc(n＝5±SEM)或帕利珠单抗(n＝4±SEM)处理的K18-hACE2小鼠以及用帕利珠单抗(n＝5±SEM)处理的WT小鼠的平均相对体重。从第5天开始,与用帕利珠单抗处理的K18-hACE2小鼠相比,用R3_DC23-Fc处理的K18-hACE2小鼠表现出显著较少的体重减轻(p<0.01)(双向方差分析,Tukey多重比较检验)。(C)该图显示了感染后5天处死的指定组小鼠肺中的中值和单独病毒滴度。与用帕利珠单抗处理的K18-hACE2小鼠相比,用R3_DC23-Fc处理的K18-hACE2小鼠和用帕利珠单抗处理的WT小鼠肺中复制的SARS-CoV-2病毒显著减少(p<0.0005,Kruskal-Wallis检验,Dunn多重比较检验)。(D)该图显示了感染后5天处死的指定组小鼠肺中病毒RNA的中值和单独水平。与用帕利珠单抗处理的K18-hACE2小鼠相比,用R3_DC23-Fc处理的K18-hACE2小鼠和用帕利珠单抗处理的WT小鼠肺中复制的SARS-CoV-2病毒显著减少(p<0.005,Kruskal-Wallis检验,Dunn多重比较检验)。

[0059] 图41.通过BLI检测S-2P与R3_DC23的相互作用。将S-2P三聚体固定在生物层干涉生物传感器上,然后与溶液中的20nM R3_DC23单体结合。三次重复实验的原始数据(未进行参考扣除)。

具体实施方式

[0060] 如本文所用,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括单数和复数指代两者。

[0061] 如本文所用,术语“包含(comprising、comprises)”和“由……组成”与“包括(including、includes)”或“含有(containing、contains)”同义,并且是包容性的或开放式的,并且不排除额外的、未列举的成员、元素或方法步骤。术语还涵盖“由……组成”和“基本上由……组成”,这些术语在专利术语中具有明确的含义。

[0062] 通过端点列举的数值范围包括相应范围内包含的所有数字和分数,以及所列举的端点。

[0063] 如本文所用,术语“约”或“大约”在提及可测量值(诸如参数、量、时间长度等)时,旨在涵盖与指定值之间的变化,诸如与指定值之间±10%或更低的变化,优选地为±5%或更低,更优选地为±1%或更低,并且再优选地为±0.1%或更低的变化,只要这种变化适合在所公开的发明中实施即可。应当理解,修饰语“约”所指的值本身还是具体地且优选地公开的。

[0064] 尽管术语“一个或多个”或“至少一个”(诸如一个或多个成员或一组成员中的至少一个成员),本身是清楚的,但是通过进一步举例,该术语特别涵盖所述成员中的任一个成员,或所述成员中的任意两个或更多个成员,例如任意≥3个、≥4个、≥5个、≥6个或≥7个所述成员等,以及至多达所有所述成员。在另一个示例中,“一个或多个”或“至少一个”可以指1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或更多个。

[0065] 本文对本发明背景的讨论是为了解释本发明的内容。这不应理解为承认所提及的任何材料已在任何权利要求的优先权日之前,在任何国家出版、为人所知、或已成为公知常识的一部分。

[0066] 在本说明书中,各种出版物、专利和已公布的专利说明书均通过标识性引文来引用。本说明书中引用的所有文献均通过引用整体并入本文。特别地,本文中特别提及的此类文献的教导或章节通过引用并入。

[0067] 除非另有定义,否则本发明公开中使用的所有术语(包括技术术语和科学术语)均具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。通过进一步的指导,将术语定义包括在内以便更好地理解本发明的教导。当特定术语是结合本发明的特定方面或本发明的特定实施方案进行定义时,除非另有定义,否则这种含义旨在适用于整个说明书,即,还适用于本发明的其他方面或实施方案的上下文。

[0068] 在下面的段落中,将更详细地定义本发明的不同方面或实施方案。除非另有明确说明,否则如此定义的每个方面或实施方案均可与任何其他方面或实施方案相结合。特别地,任何指示为优选或有利的特征可以与任何其他指示为优选或有利的一个或多个特征组合。

[0069] 在整个说明书中提到“一个实施方案”、“实施方案”意味着结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,在本说明书中的各个地方出现的短语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定全部指代同一实施方案,而是可以指代同一实施方案。此外,本领域技术人员从本公开中可以清楚地看出,特定的特征、结构或特性可以以任何合适的方式在一个或多个实施方案中进行组合。此外,正如本领域技术人员所理解的,尽管本文描述的一些实施方案包括其他实施方案中包括的一些特征但不包括其他特征,但是不同实施方案的特征的组合旨在属于本发明的范围,并且形成不同的实施方案。例如,在所附的权利要求书中,任何要求保护的实施方案都可以以任意组合使用。

[0070] 如说明本发明某些代表性实施方案的实验部分所证实的那样,发明人鉴定出了特异性结合沙贝病毒刺突蛋白的VHH,特别是特异性结合沙贝病毒刺突蛋白S2亚基(诸如SARS-CoV-2和SARS-CoV-1刺突蛋白S2亚基)的VHH。研究发现VHH可以有效中和SARS-CoV-2和SARS-CoV-1,SARS-CoV-2包括SARS-CoV-2变体,诸如SARS-CoV-2D614G变体、SARS-CoV-2Alpha变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.5变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.4.6变体、SARS-CoV-2 Omicron BF.7变体、SARS-CoV-2 Omicron BQ.1.1变体、SARS-CoV-2 Omicron XBB变体和SARS-CoV-2 Omicron XBB.1.5变体。研究发现,这些VHH与七肽重复2(HR2)结构域中的S2氨基酸相互作用(更特别地是与HR2结构域靠近病毒膜的C末端区域内的氨基酸相互作用),这些氨基酸在多个进化枝的沙贝病毒刺突蛋白中非常保守。

[0071] 因此,一方面涉及能够中和沙贝病毒的结合剂(特别是抗体及其抗原结合片段),其特征在于,所述结合剂(特别是抗体和抗体片段)特异性结合沙贝病毒刺突蛋白的七肽重复2(HR2)结构域。

[0072] 一个方面提供了能够中和沙贝病毒的结合剂,其特征在于该结合剂特异性结合至该沙贝病毒刺突蛋白的区域或结合于该区域内,该区域对应于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸E1188至氨基酸Y1206的区域。

[0073] “结合剂”通常涉及能够结合至少一种其他分子的分子,其中所述结合优选是特异性结合,诸如在确定的结合位点、口袋或表位上的结合。结合剂可具有任何性质或类型并且不依赖于其来源。结合剂可以是化学合成的、天然存在的、重组产生的(并且可选地纯化的),以及设计和合成产生的(并且可选地纯化的)。因此,所述结合剂可以例如是小分子、化学品、肽、多肽、抗体或它们中任一者的任何衍生物,诸如肽模拟物、抗体模拟物、活性片段、化学衍生物等。结合剂的功能片段或结合剂的功能部分是指该结合剂的以下片段或部分,该片段或部分在功能上与该结合剂等同。特别地,本文所述结合剂的这种功能片段或部分理想地保留了该结合剂如本文其他地方广泛概述的功能特征(1)至(21)中的一个或多个功能特征。

[0074] 术语“抗体”是指与抗原及其多聚体特异性结合的免疫球蛋白(Ig)分子或包含免疫球蛋白(Ig)结构域的分子。“抗体”可以是完整的免疫球蛋白或完整免疫球蛋白的免疫反应部分。该术语涵盖天然、重组、半合成或合成产生的抗体。因此,例如,抗体可以存在于自然界中或从自然界中分离,例如由细胞或组织天然或内源性地产生或表达并且可选地从中分离;或者抗体可以是重组的,即通过重组DNA技术产生,以及/或者可以部分或全部化学或生物化学合成。

[0075] “分离的”或“纯化的”是指基本上或本质上不含在其天然状态下通常伴随它的组分的材料。例如,“分离的多肽”或“纯化的多肽”是指以下多肽,该多肽通过任何合适的方法从包含待分离或待纯化所关注多肽的分子混合物中分离或纯化。分离或纯化的所关注多肽可以例如是免疫球蛋白、抗体或纳米抗体,并且混合物可以是产生免疫球蛋白、抗体或纳米抗体的细胞中存在的混合物或分子,和/或免疫球蛋白、抗体或纳米抗体分泌到的培养基(可能与细胞分泌的其他分子混合在一起)。

[0076] 术语“抗体片段”、“抗原结合片段”、“功能性抗体片段”和“活性抗体片段”是指任何抗体的一部分,其本身对抗原决定簇或表位具有高亲和力,并且含有一个或多个决定这种特异性的互补决定区(CDR)。如本文所用,术语“抗体片段”和“抗原结合片段”和“活性抗体片段”和“功能性抗体片段”是指包含免疫球蛋白结构域或抗原结合域的蛋白质或肽,其能够特异性结合沙贝病毒刺突蛋白,诸如SARS-CoV-2刺突蛋白,特别是沙贝病毒刺突蛋白的S2亚基,更特别地是沙贝病毒刺突蛋白(的S2亚基)的HR2结构域。非限制性示例包括免疫球蛋白结构域、Fab、F(ab)′2、scFv、重-轻链二聚体、免疫球蛋白单可变结构域、纳米抗体(或VHH抗体)、结构域抗体和单链结构,诸如完整的轻链或完整的重链。

[0077] 术语“免疫球蛋白(Ig)结构域”,或更具体地“免疫球蛋白可变结构域”(缩写为“IVD”,本文中还称为“可变结构域”)是指基本上由四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域,这些框架区在本领域中和本文下文中分别称为“框架区1”或“FR1”;称为“框架区2”或“FR2”;称为“框架区3”或“FR3”;以及称为“框架区4”或“FR4”;这些框架区被三个“互补决定

区”或“CDR”中断,这些互补决定区或CDR在本领域中和本文下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;称为“互补决定区2”或“CDR2”;以及称为“互补决定区3”或“CDR3”。因此,免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可表示如下:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。正是免疫球蛋白可变结构域(IVD)(特别是其中的CDR,更特别地是其中的CDR3)通过携带抗原结合位点或表位结合位点赋予抗体对抗原的特异性。通常,在常规免疫球蛋白中,重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)相互作用以形成抗原结合位点。在这种情况下,VH和VL的互补决定区(CDR)都有助于(尽管不一定均匀)抗原结合位点,即总共6个CDR将参与抗原结合位点形成。鉴于上述定义,常规4链抗体(诸如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子;本领域已知的)或Fab片段、F(ab′)2片段、Fv片段诸如二硫键连接的Fv或scFv片段、或源自这种常规4链抗体的双抗体(本领域已知的)的抗原结合域通过一对(缔合的)免疫球蛋白结构域诸如轻链和重链可变结构域(即,通过免疫球蛋白结构域的VH-VL对)将与抗原的相应表位结合,这些免疫球蛋白结构域与相应抗原的表位共同结合。

[0078] “免疫球蛋白单可变结构域”(缩写为“ISVD”),等同于术语“单可变结构域”,定义了其中抗原-结合位点存在于单免疫球蛋白结构域上并由其形成的分子。这将免疫球蛋白单可变结构域与“常规”免疫球蛋白或其片段分开,其中两个免疫球蛋白结构域(具体地两个可变结构域)相互作用形成抗原结合位点。如本文所用,“免疫球蛋白单可变结构域”(或“ISVD”)是指具有包含4个框架区(FR)和3个互补决定区(CDR)的氨基酸序列的蛋白质或肽,该氨基酸序列根据FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的格式。免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合位点由单个VH/VHH或VL结构域形成。因此,免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合位点由不超过三个CDR形成。因此,单可变结构域可以是轻链可变结构域序列(例如,VL序列)或其合适的片段;或重链可变结构域序列(例如,VH序列或VHH序列)或其合适的片段;只要它能够形成单个抗原结合单位(即,基本上由单可变结构域组成的功能性抗原结合单位,使得单个抗原结合域不需要与另一个可变结构域相互作用以形成功能性抗原结合单位)。在某些实施方案中,免疫球蛋白单可变结构域是重链可变结构域序列(例如,VH序列或VHH序列);更特别地,免疫球蛋白单可变结构域可以是源自常规四链抗体的重链可变结构域序列或衍生自重链抗体的重链可变结构域序列。例如,免疫球蛋白单可变结构域可以是(单)结构域抗体(或适合用作(单)结构域抗体的氨基酸序列)、常规抗体(也称为“dAb”)的重链(VH)或轻链(VL)的可变结构域(或适合用作dAb的氨基酸序列)或Nanobody(如本文所定义,并且包括但不限于VHH);或它们中的任一者的任何合适片段。

[0079] 在实施方案中,免疫球蛋白单可变结构域可以是Nanobody(如本文所定义)或其合适片段。注意:Nanobody®、Nanobodies®和Nanoclone®是Ablynx N.V.(赛诺菲公司)的注册商标。对于纳米抗体的一般描述,参考下面的进一步的描述,以及本文引用的现有技术,例如WO2008/020079中所述。“VHH结构域”,还称为VHH、VHH结构域、VHH抗体片段和VHH抗体,最初被描述为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”;Hamers-Casterman等人,1993,Nature 363:446-448)的抗原结合免疫球蛋白(Ig)(可变)结构域。选择术语“VHH结构域”以将这些可变结构域与存在于常规4链抗体中的重链可变结构域(本文中称为“VH结构域”)和存在于常规4链抗体中的轻链可变结构域(本文中称为“VL结构域”)区分开来。对于VHH和Nanobody的进一步描述,参考Muyldermans的综述文章(2001.Rev Mol Biotechnol74:277-302)以及作为一般背景技术提及的下列专利申请:WO 94/04678、WO 95/04079、WO 96/34103;WO 94/

25591、WO 99/37681、WO 00/40968、WO 00/43507、WO 00/65057、WO 01/40310、WO 01/44301、EP 1134231、WO 02/48193;WO 97/49805、WO 01/21817、WO 03/035694、WO 03/054016、WO 03/055527;WO 03/050531;WO 01/90190;WO 03/025020(=EP 1433793);WO 04/041867、WO 04/041862、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858、WO 06/40153、WO 06/079372、WO 06/122786、WO 06/122787和WO 06/122825。如这些参考文献中所述,Nanobody(具体地VHH序列和部分人源化的Nanobody)的特征尤其可在于一个或多个框架序列中存在一个或多个"标志残基"。

[0080] 根据本发明的结合剂或沙贝病毒结合剂(可以互换使用),在一个方面可以通过任何单独功能/实施方案或通过下文描述的任意数量单独功能/实施方案的任何组合在功能上进行描述,并且在括号"(n)"之间给出任意数字"n"。这些单独功能的数值顺序是随机的,并且不会对单独功能施加任何偏好;同样,这种随机数值顺序不会对两个或更多个单独功能的任何组合施加任何偏好。此外,不应将任何此类组合都视为任意的,因为本文中的结合剂或沙贝病毒结合剂中发挥了这些单独功能的每一种。

[0081] 因此,本发明提供了结合剂(特别是抗体或其抗原结合片段),其(1)特异性结合沙贝病毒(诸如SARS-CoV-2和SARS-CoV-1),并且在本文中也可以称为沙贝病毒结合剂或沙贝病毒抗体和抗体片段。在某些实施方案中,结合剂(2)不结合中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。

[0082] "结合"是指任何直接或间接的相互作用。直接相互作用意味着两个结合配偶体之间的接触(例如物理或化学)。间接相互作用是指相互作用配偶体在多于两个分子的复合物中相互作用的任何相互作用。相互作用可以是完全间接的(例如,两个分子在一个或多个桥接分子的帮助下成为同一复合物的一部分,但在没有桥接分子的情况下就不会结合)。相互作用可以是部分直接或部分间接的:两个相互作用配偶体之间仍然存在直接接触,但是这种接触例如是不稳定的,并且需要通过与一个或多个额外分子的相互作用来稳定。

[0083] "结合的特异性"或"结合特异性"或"特异性结合"是指分子A在一定浓度下(例如足以抑制或中和所关注蛋白质或过程)结合所关注靶标(例如蛋白质)的亲和力比其可能(如果有的话)结合其他靶标(非所关注靶标)的亲和力高(例如高达至少2倍、5倍或至少10倍亲和力,例如高达至少20倍、50倍或100倍或更高亲和力)的情况。特异性结合并不意味着排他性结合。然而,特异性结合确实意味着结合剂对其靶标中的一种或几种靶标具有一定程度增加的亲和力或偏好。结合的排他性是指结合剂仅结合所关注靶标的情况。如本文所用,术语"亲和力"通常是指以下程度,在该程度下,一种分子(例如配体、化学物质、蛋白质或肽、抗体或抗体片段)结合另一种分子(例如(靶)蛋白质或肽),从而使单分子单体的平衡朝向由两个分子的(特定)(非共价)结合形成的复合物移动。两个或更多个结合配偶体之间的非共价相互作用或结合可能涉及相互作用诸如范德华相互作用、氢键和盐桥。"解离常数"或"结合常数"(K_D)通常用于描述两个分子之间的亲和力,并且通常通过复合物形成速率常数(称为"k_{on}"值)与所述复合物解离速率常数("k_{off}"或"k_{dis}"值)之比来计算。对一个分子与另一个分子(诸如抗体或抗体片段与抗原,或配体与受体)的结合亲和力的测量是本领域技术人员已知的,并且包括例如实时、无标记生物层干涉测定法(例如Octet®RED96系统(ForteBio)),或表面等离子体共振(SPR)(例如BIACORE™),或溶液亲和力ELISA。

[0084] 术语"冠状病毒科(Coronaviridae)"和更常见的名称"冠状病毒"是指一个病毒家

族,其名称源于病毒表面存在的大型刺突蛋白分子,这些分子使病毒体呈现冠状形状。冠状病毒科包括四个属:α冠状病毒(Alphacoronavirus)、β冠状病毒(Betacoronavirus)、γ冠状病毒(Gammacoronavirus)和δ冠状病毒(Deltacoronavirus)。冠状病毒代表一个多样化的大型包膜正链RNA病毒家族,它们感染多种动物、多种脊椎动物物种和人类。冠状病毒的刺突(S)蛋白对于宿主受体结合以及随后病毒与宿主细胞膜的融合至关重要,从而有效导致病毒核衣壳在宿主细胞质中的释放(Letko等人(2020)Nat Microbiol 5:562-569)。

[0085] 有四种据推测源自人畜共患疾病的冠状病毒在人类中流行:HCoV-NL63和HCoV-229E(α冠状病毒)以及HCoV-OC43和HCoV-HKU1(β冠状病毒)。此外,自2000年以来,已经发生了3起由β冠状病毒引起的严重呼吸道疾病:由SARS-CoV-1引起的严重急性呼吸综合征病毒(SARS)源于人畜共患疾病(蝙蝠通过果子狸作为中间物种),并于2004年消失(Drosten等人,2003,N Engl J Med 348:1967-1976)。报告的SARS病例超过8000例,死亡率为约10%。2012年,中东呼吸综合征(MERS)在阿拉伯半岛出现。MERS是由MERS-CoV引起的,已确诊超过2500例,并且病死率为34%(deGroot等人,2013,NEngl J Virol 87:7790-7792)。近年来,第三种人畜共患的人类冠状病毒出现,报告了由一种新型β冠状病毒引起的严重获得性肺炎病例,该病毒现称为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2),因为它与SARS-CoV-1有遗传关系(Chen等人(2020)Lancet 395:507-513)。与严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)感染类似,患者表现出病毒性肺炎的症状,包括发烧、呼吸困难,最严重病例为双侧肺浸润(Gralinski等人(2020)Viruses 12:135)。

[0086] 如本文所用,术语“沙贝病毒”是指β冠状病毒属中的一个亚属,并且包括严重急性呼吸综合征相关冠状病毒种(SARSr-CoV或SARS-CoV,还称为SARS冠状病毒、SARS相关冠状病毒和严重急性呼吸综合征冠状病毒,本文中作为同义词使用)。属于SARS-CoV种的毒株的非限制性示例包括SARS-CoV-1和SARS-CoV-2。

[0087] 首次获得的基因组序列将新型人类病原体SARS-CoV-2归入冠状病毒科的沙贝病毒亚属中,与SARS病毒属于同一亚属。尽管SARS-CoV-2与SARS-CoV(谱系B)和MERS-CoV(谱系C)属于同一β冠状病毒属,但是基因组分析显示SARS-CoV-2与SARS-CoV之间存在更大的相似性,支持将其归类为谱系B的成员(来自国际病毒分类委员会)。

[0088] 在其他β冠状病毒中,该病毒的特点是具有多碱基切割位点的独特组合,这一显著特征已知可以增加致病性和传染性。据报道,从中菊头蝠(Rhinolophus affinis)身上采集的蝙蝠沙贝病毒(Bat CoV RaTG13)在几乎所有基因组区域都与SARS-CoV-2聚类在一起,基因组序列同一性为约96%(并且刺突蛋白受体结合域(RBD)的相似性超过93%);另一种哺乳动物物种可能充当了中间宿主。其中一种可疑的中间宿主(马来亚穿山甲)携带的冠状病毒在受体结合域与SARS-CoV-2高度相似,该受体结合域包含以下突变,据信该突变可促进与血管紧张素转化酶2(ACE2)受体的结合,并且显示出97%的氨基酸序列相似性。

[0089] SARS-CoV-1和SARS-CoV-2都使用血管紧张素转化酶2(ACE2)作为人体细胞上的受体。SARS-CoV-2以比SARS-CoV-1更高的亲和力结合ACE2(Wrapp等人(2020)Science367:1260-1263)。SARS-CoV-2与SARS-CoV-1和几种SARS相关冠状病毒(SARSr-CoV)有所区别,例如Abdelrahman等人(2020.Front Immunol 11:552909)所概述的那样。

[0090] SARS-CoV-2是指新出现的沙贝病毒,它被确定为导致严重获得性肺炎的严重全球

性爆发的原因。SARS-CoV-2长期在全球进行传播,加上对免疫逃逸的选择压力,导致病毒适应宿主并产生新的SARS-CoV-2变体。特别地,刺突糖蛋白中已经进化并正在进化出多种突变,其中包括位于刺突S1亚基的突变。例如,SARS-CoV-2变体可包括选自N439、K417、S477、L452、T478、E484、P384、N501和D614(相对于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突氨基酸序列)中一个或多个位置的突变。SARS-CoV-2变体的进一步非限制性示例包括在位置N501处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如N501Y变体(例如SARS-CoV-2 Alpha变体);在位置N501和E484处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如N501Y和E484K变体(例如SARS-CoV-2Alpha+E484K变体);在位置K417、E484和N501处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如K417N、E484K和N501Y变体(例如SARS-CoV-2beta变体);在位置P384、K417、E484和N501处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如P384L、K417N、E484K和N501Y变体(例如SARS-CoV-2beta+P384L变体);在位置L452和E484处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如L452R和E484Q变体(例如SARS-CoV-2kappa变体);在位置L452和T478处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如L452R和T478K变体(例如SARS-CoV-2delta变体);在位置L452处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如L452R变体(例如SARS-CoV-2epsilon变体);在位置K417处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如K417T变体(例如SARS-CoV-2gamma变体);在位置D614处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如D614G变体(例如SARS-CoV-2D614G变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体或SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体);在位置K147、W152R、F157、I210、G257、D339、G446和N460处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如K147E、W152R、F157L、I210V、G257S、D339H、G446S和N460K变体(例如SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2变体);在位置R346、F486和D1199处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如R346T、F486S和D1199N变体(例如SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2变体);在位置H69、V70、L452和F486处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如H69-、V70-、L452R和F486V变体(例如SARS-CoV-2 Omicron BA.4/BA.5变体);在位置R346和N658处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如R346T和N658S变体(例如SARS-CoV-2 Omicron BA.4.6变体);在位置R346处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如R346T变体(例如SARS-CoV-2 Omicron B F.7变体);在位置R346、K444和N460处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如R346T、K444T和N460K变体(例如SARS-CoV-2 Omicron BQ.1.1变体);在位置V83、Y144、H146、Q183、V213、R346、L368、V445、G446、N460、F486和F490处包含突变的SARS-CoV-2变体,诸如V83A、Y144-、H146Q、Q183E、V213E、R346T、L368I、V445P、G446S、N460K、F486S和F490S变体(例如SARS-CoV-2 Omicron XBB变体)或V83A、Y144-、H146Q、Q183E、V213E、R346T、L368I、V445P、G446S、N460K、F486P和F490S变体(例如SARS-CoV-2 Omicron XBB.1.5变体)。SARS-CoV-2的Alpha变体(也称为B.1.1.1.7谱系)于2020年底在英国首次发现,并且是首批报告的令人关注的SARS-CoV-2变体之一。SARS-CoV-2 Alpha变体的刺突蛋白中含有几种突变,包括N501Y突变和D614G突变。SARS-CoV-2的Omicron变体最早在南非和博茨瓦纳发现,并且于2021年11月24日向世界卫生组织(WHO)报告为一种新变体(Fan等人,2022.Signal Transduct Target Ther.7:141)。Omicron变体并不是单一毒株,而是进化为至少三个谱系,包括BA.1、BA.2和BA.3。在BA.1谱系中已发现至多达60个突变,其中多至38个突变发生在刺突(S)蛋白中,一个突变发生在包膜(E)蛋白中,两个突变发生在膜(M)蛋白中,六个突变发生在核衣壳(N)蛋白中。BA.2谱系有57个突变,其中31个突变发生在S蛋白中,BA.2的N末端与BA.1的N末端有显著不同。如本文所用,术语“SARS-CoV-2”涵盖原始毒株及其变体。

[0091] 该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(3)特异性结合或结合至沙贝病毒的刺突蛋白(诸如SARS-CoV-2刺突蛋白或SARS-CoV-1刺突蛋白);特别地,该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(4)特异性结合或结合至沙贝病毒刺突蛋白的S2亚基或S2亚基的一部分;更特别地,该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(22)特异性结合或结合至该S2亚基的区域或结合于该区域内,该区域在SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中,位于氨基酸E1188至氨基酸Y1206的区域,优选位于氨基酸N1192至氨基酸Y1206的区域或位于氨基酸E1188至氨基酸L1203的区域,更优选位于氨基酸N1192至氨基酸L1203的区域,甚至更优选位于氨基酸N1194至氨基酸L1203的区域,最优选位于氨基酸N1194至氨基酸Q1201的区域。在某些实施方案中,该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(23)特异性结合或结合至沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒刺突蛋白S2亚基的区域或结合于该区域内,该区域对应于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸E1188至氨基酸Y1206、优选氨基酸N1192至氨基酸Y1206或氨基酸E1188至氨基酸L1203、更优选氨基酸N1192至氨基酸L1203、甚至更优选氨基酸N1194至氨基酸L1203、最优选氨基酸N1194至氨基酸Q1201的区域。更特别地,该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(5)特异性结合或结合至沙贝病毒刺突蛋白(S2亚基)的七肽重复2(HR2)结构域,或HR2结构域的一部分。在某些实施方案中,该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(6)特异性结合或结合至HR2结构域靠近病毒膜的区域或结合于该区域内,该区域在SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中,优选位于氨基酸A1174至氨基酸E1202的区域,更优选位于氨基酸I1179至氨基酸E1202的区域,甚至更优选位于氨基酸D1184至氨基酸E1202的区域,再优选位于氨基酸E1188至氨基酸E1202的区域,或者位于氨基酸V1189至氨基酸E1202的区域,还更优选位于氨基酸N1194至氨基酸E1202的区域,最优选位于氨基酸N1194至氨基酸Q1201的区域;或(7)特异性结合或结合至与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸E1188至氨基酸Y1206对应的HR2结构域(或S2亚基)区域,优选地与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸E1188至氨基酸Y1203对应的HR2结构域(或S2亚基)区域,更优选地与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸A1190至氨基酸L1203对应的HR2结构域(或S2亚基)区域(诸如与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸K1191至氨基酸E1202对应的HR2结构域(或S2亚基)区域),或与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸N1192至氨基酸Q1201(诸如SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸N1192至氨基酸Q1201的区域)对应的HR2结构域(或S2亚基)区域,甚至更优选地与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸N1194至氨基酸L1203对应的HR2结构域(或S2亚基)区域,最优选地与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸N1194至氨基酸Q1201对应的HR2结构域(或S2亚基)区域,诸如与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸S1196至氨基酸Q1201对应的HR2结构域(或S2亚基)区域。在具体实施方案中,该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(8)特异性结合或结合至SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1192、N1194、S1196、L1197、D1199、L1200、Q1201和E1202中的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或全部氨基酸残基;优选地,结合至SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199、Q1201和E1202中的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或全部氨基酸残基;更优选地,结合至SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201中的至少一个、至少两个、至少

三个或全部氨基酸残基;最优选地,结合至SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196和Q1201中的至少一个或两个氨基酸残基。在实施方案中,该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(24)特异性结合或结合至与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1192、N1194、S1196、L1197、D1199、L1200、Q1201和E1202对应的沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒刺突蛋白S2亚基或HR2结构域氨基酸残基中的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或全部氨基酸残基;优选地,结合至与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199、Q1201和E1202对应的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或全部氨基酸残基;更优选地,结合至与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201对应的至少一个、至少两个、至少三个或全部氨基酸残基;最优选地,结合至与SEQ ID NO:86定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196和Q1201对应的至少一个或两个氨基酸残基。在具体实施方案中,该结合剂(特别是抗体和抗体片段)(25)特异性结合或结合至SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196和Q1201,或与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的所述氨基酸残基S1196和Q1201对应的刺突蛋白氨基酸残基;可选地,结合至SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201,或与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的所述氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201对应的刺突蛋白氨基酸残基。

[0092] 在具体实施方案中,以下氨基酸残基对于结合剂(特别是抗体和抗体片段)与刺突蛋白的结合是必不可少的,该氨基酸残基为:(26)SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1192、N1194、S1196、L1197、D1199、L1200、Q1201和E1202中的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或全部氨基酸残基;优选地,SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199、Q1201和E1202中的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或全部氨基酸残基;更优选地,SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201中的至少一个、至少两个、至少三个或全部氨基酸残基;最优选地,SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196和Q1201中的至少一个或两个氨基酸残基。在实施方案中,以下氨基酸残基对于结合剂(特别是抗体和抗体片段)与刺突蛋白的结合是必不可少的,该氨基酸残基为:(27)与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1192、N1194、S1196、L1197、D1199、L1200、Q1201和E1202对应的沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒刺突蛋白S2亚基或HR2结构域氨基酸残基中的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个或全部氨基酸残基;优选地,与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199、Q1201和E1202对应的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个或全部氨基酸残基;更优选地,与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201对应的至少一个、至少两个、至少三个或全部氨基酸残基;最优选地,与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196和Q1201对应的至少一个或两个氨基酸残基。在具体实施方案中,以下氨基酸残基对于结合剂(特别是抗体和抗体片段)与刺突蛋白的结合是必不可少的,该氨基酸残基为:(28)SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基S1196和Q1201,或与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的所述氨基酸残基S1196和

Q1201对应的刺突蛋白氨基酸残基;可选地,SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201,或与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白中的所述氨基酸残基N1194、S1196、D1199和Q1201对应的刺突蛋白氨基酸残基。

[0093] 结合位点的评估可以通过以下几种方式进行:通过确定结合剂(特别是抗体或抗体片段)与刺突蛋白或S2亚基或包含HR2结构域的肽的复合物的晶体结构,例如通过应用如实施例中所示的晶体结构确定方法来评估;以及/或者通过选择和分析病毒逃逸变体/突变体,例如通过应用如实施例中所示的病毒逃逸选择方法来评估;以及/或者通过在存在和不存在结合剂的情况下分析重组刺突蛋白(或S2亚基或含HR2的肽)上的氢-氘交换,例如通过应用如实施例中所示的通过质谱监测的氢-氘交换方法(HDX-MS方法)来评估。

[0094] 有利地,这些氨基酸残基在沙贝病毒的不同进化枝之间是保守的,特别是在进化枝1、进化枝2和进化枝3沙贝病毒之间。在优选实施方案中,结合剂(特别是抗体或抗体片段)(9)不结合沙贝病毒刺突蛋白的RBD。

[0095] 结合剂(特别是抗体和抗体片段)(29)特异性结合或结合至刺突蛋白的四级表位。特别地,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(30)特异性结合或结合至三聚体HR2结构域(或三聚S2亚基或三聚刺突蛋白)。特别地,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(31)特异性结合或结合至三聚体HR2结构域(或三聚体S2亚基或三聚体刺突蛋白)内的四级表位。更特别地,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(32)特异性结合或结合至位于两个相邻HR2结构域或螺旋内的四级表位。在具体实施方案中,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(33)特异性结合或结合至以下四级表位,该四级表位包含一个HR2结构域或螺旋中本文所述的一个或多个相互作用氨基酸残基以及相邻HR2结构域或螺旋中本文所述的一个或多个相互作用氨基酸残基或由其组成。在具体实施方案中,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(34)特异性结合或结合至三聚体刺突蛋白内的四级表位,其中来自三聚体刺突蛋白的至少两个(诸如两个)单体的氨基酸残基(特别是本文所述的一个或多个相互作用的氨基酸残基)对所述四级表位有贡献。

[0096] 如本文所用,术语“四级表位”是指以下构象表位,该构象表位的结构依赖于多个原聚体或单体在多聚体复合物中的排列,或通过排列而得到增强。四级表位可能位于多聚体复合物中的单个蛋白质(或单体)中;或者可能跨越多个原聚体,通过多个原聚体之间的相互作用重新形成。

[0097] 与四级表位或多聚体蛋白质的特异性结合或结合可以通过利用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定来评估与单体和/或(稳定的)多聚体蛋白质的结合,例如通过应用如实施例中所示的ELISA测定。可以通过将刺突蛋白与来自噬菌体T4的三聚体蛋白fibritin的折叠子结构域融合来实现三聚体刺突蛋白的稳定。仅在单体蛋白质密度升高时(诸如密度为1.0ng/mm^2或更高、优选1.2ng/mm^2或更高、或1.5ng/mm^2或更高时),与单体蛋白质的结合和单体蛋白质密度之间的相关性可能表明与蛋白质多聚体构象的特异性结合或结合。对于给定密度的单体和多聚体蛋白质,与单体蛋白质相比,与多聚体蛋白质的结合增强可能表明与多聚体蛋白质的特异性结合或结合。

[0098] 不受任何理论的束缚,在与三聚体刺突蛋白结合后(特别是与三聚体刺突蛋白内的四级表位结合后),本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)可以稳定刺突蛋白的融合前构象。更特别地,结合剂可以稳定或锁定HR2卷曲线圈结构。因此,结合剂可防止HR2卷曲线圈结构的解开,将其视为刺突控制膜融合过程中的关键早期步骤;或者结合剂可干扰

或阻止HR2α螺旋向延伸的HR1α螺旋迁移,将其视为刺突蛋白从发夹前中间体重新折叠为融合后构象的关键步骤;并且/或者结合剂可防止6螺旋束形成的完成,将其视为对于融合过程至关重要。在实施方案中,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(35)能够稳定沙贝病毒刺突蛋白的融合前构象。在实施方案中,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(36)能够稳定HR2卷曲线圈结构。

[0099] SARS-CoV-2含有刺突(S)蛋白、包膜(E)蛋白、膜(M)蛋白和核衣壳(N)蛋白作为结构蛋白。此外,已经辨别出十六种非结构蛋白(nsp1-16),它们参与复制并改变宿主防御。Nsp12蛋白对应于RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)。

[0100] 本发明特别感兴趣的是刺突蛋白或S蛋白,其是跨膜糖蛋白,形成从病毒表面突出的同源三聚体并赋予病毒冠状外观。刺突蛋白具有两个亚基:S1和S2。

[0101] S1亚基包含N末端结构域(NTD)、受体结合域(RBD),以及亚结构域1和2(SD1、SD2)。S1亚基参与宿主受体结合。刺突蛋白通过S1亚基中存在的受体结合域(RBD)结合人类宿主细胞受体血管紧张素转化酶2(ACE2)。

[0102] S2亚基参与融合病毒和宿主细胞以及病毒进入的膜,并且包含多个结构域:S2'蛋白酶切割位点(融合所需的宿主蛋白酶的切割)、融合肽(FP)、七肽重复1(HR1)结构域、中心螺旋(CH)结构域、连接子结构域(CD)、七肽重复2(HR2)结构域、跨膜(TM)结构域和细胞质尾(CT)结构域(Wang等人,(2020).FrontCellInfectMicrobiol 10:587269)。

[0103] S蛋白通常以融合前构象存在。在所述融合前构象中,在生物合成期间在S1-S2弗林蛋白酶切割位点处切割的S1和S2保持彼此非共价结合-这不同于其中S1和S2保持未切割的SARS-CoV。在S蛋白的闭合状态(PDB:6VXX)下,三聚体中的3个RBD结构域不从三聚体中突出,而在开放状态(PDB:6VYB)或"上"构象下,RBD之一从三聚体中突出。具有三角形横截面的S-三聚体胞外域具有大约160埃的长度,其中S1结构域采用V型形式。每个原聚体的22个N连接的糖基化位点中有16个出现糖基化(Walls等人,(2020)Cell 180:281-292)。

[0104] S蛋白的S1亚基通过其RBD区与ACE2结合,促进内体的形成,从而引发病毒融合活性。S1-ACE2结合后,S由细胞蛋白酶切割(诸如跨膜蛋白酶丝氨酸亚型2(TMPRSS2)或内体组织蛋白酶),从而暴露位于S2亚基中的融合肽(FP)。FP插入宿主细胞膜,从而缩短病毒膜与宿主细胞膜之间的距离,S蛋白的HR1结构域靠近宿主细胞膜,而HR2结构域更靠近病毒膜侧。然后,HR2折回HR1,从而两个HR结构域以融合核心的反向平行形式形成六螺旋结构。因此将病毒膜拉向宿主细胞膜并与之紧密结合,并且两层膜融合,导致病毒基因组释放到宿主细胞中(Huang等人,(2020)ActaPharmalogicaSinica41:1141-1149)。

[0105] 本文作为同义词使用的术语"刺突蛋白"、"S"或"S蛋白"是指沙贝病毒的刺突蛋白,并且可以指特定的S蛋白,诸如SARS-CoV-2 S蛋白和SARS-CoV-1 S蛋白。术语"刺突蛋白"和"SARS-CoV-2刺突蛋白"包括从不同沙贝病毒或SARS-CoV-2分离株中分离的沙贝病毒或SARS-CoV-2刺突蛋白的蛋白质变体,以及重组沙贝病毒或SARS-CoV-2刺突蛋白,或它们的片段。这些术语还涵盖与例如组氨酸标签、小鼠或人Fc或信号序列偶联的沙贝病毒刺突蛋白或SARS-CoV-2刺突蛋白。

[0106] SARS-CoV-2刺突蛋白序列可在以下Genbank登录号下找到/对应于以下Genbank登录号:QHQ82464,版本QHQ82464.1;并且在本文中还定义为SEQ ID NO:86:

[0107]
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLP
FFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQS
LLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQP
FLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINI
TRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCAL
DPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
NRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAP
GQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDIST
EIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPK
KSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDI
TPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTR
AGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVA
YSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRA
LTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVT
LADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGW
TFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASAL
GKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSL
QTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVV
FLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNT
FVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNI
QKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMT
SCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

[0108]

[0109] 在本文,SARS-CoV-2刺突蛋白HR2结构域对应于SEQ ID NO:86的氨基酸1169-1202,并且如下文所示(SEQ ID NO:87):ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE(SEQID NO:87)。

[0110] 在本文,SARS-CoV-2刺突蛋白TM结构域对应于SEQ ID NO:86的氨基酸1214-1237。

[0111] 如本文所用,HR2结构域“靠近病毒膜”的区域是指HR2结构域内距离病毒膜40个氨基酸以内的区域。

[0112] SARS-CoV-1刺突蛋白序列可在以下Genbank登录号下找到/对应于以下Genbank登录号:NP_828851.1;并且在本文中还定义为SEQ ID NO:111。在本文,SARS-CoV-1刺突蛋白HR2结构域对应于SEQ ID NO:111的氨基酸1151-1184,并且如SEQ ID NO:87中所示。本文中提到的氨基酸和氨基酸编号是相对于/对应于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白;通过比对多个氨基酸序列可以轻松确定其他沙贝病毒的刺突蛋白或刺突蛋白片段、结构域或区域中的相应氨基酸。

[0113] 本文互换使用的“血管紧张素转化酶2”、“ACE2”或“ACE-2”是指属于二肽基羧基二肽酶家族的哺乳动物蛋白质,并且有时归类为EC:3.4.17.23。人ACE2基因的基因组位置位于chrX:15,561,033-15,602,158(GRCh38/hg38;负链),或者另选地,位于chrX:15,579,

156-15,620,271(GRCh37/hg19;负链)。ACE2用作至少人冠状病毒SARS-CoV和SARS-CoV-2以及NL63/HCoV-NL63(还称为纽黑文冠状病毒)的受体。人ACE2蛋白的UniProtKB标识符:Q9BYF1。已将同种型1(标识符:Q9BYF1-1)选作规范序列。GenBank:NC_000023.11中的人ACE2基因的参考D NA序列。GenBank NM_001371415.1和NM_021804.3中的人ACE2的参考mRNA序列。

[0114] 本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)的另一个功能特征是,它们(10)能够中和沙贝病毒,特别是(11)能够中和SARS-CoV-2和SARS-CoV-1中的任一种或两种,优选两种。

[0115] 如本文所用,“中和结合剂”或“中和抗体”(或“能够中和沙贝病毒(特别是SARS-CoV-2和/或SARS-CoV-1)的结合剂或抗体”)是指结合沙贝病毒(特别是SARS-CoV-2和/或SARS-CoV-1)的结合剂或抗体,以抑制或压制沙贝病毒或SARS-CoV-2或SARS-CoV-1在宿主中引发和/或持续感染的能力。中和结合剂或抗体可以例如干扰沙贝病毒(诸如SARS-CoV-2或SARS-CoV-1)与宿主受体(特别是ACE2)的结合;以及/或者干扰病毒进入,例如通过诱导S1脱落以及/或者干扰病毒融合。目前尚不完全清楚根据本发明的结合剂和抗体如何中和、抑制、阻断或压制沙贝病毒感染。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)(44)不会调节或干扰S1脱落。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)(12)不会诱导S1脱落。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)(45)不会阻止S1脱落。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)(13)能够抑制刺突介导的合胞体形成。因此,结合剂(特别是抗体和抗体片段)可能(14)能够抑制病毒融合,并且不受任何理论的束缚,可能因此阻止沙贝病毒完成对宿主细胞的感染过程。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)(46)不会阻止HR1解折叠。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)(47)不会阻止HR1折叠到HR2上(例如在形成S2 6螺旋束期间)。无论其作用机制如何,根据本发明的结合剂(特别是抗体和抗体片段)能够有效中和沙贝病毒感染。

[0116] 中和活性可以使用本领域技术人员已知的标准中和测定来测量,包括但不限于假病毒中和测定和噬菌斑减少试验。本文的实施例中描述了进行此类中和测定的示例性方法。还可以通过测量沙贝病毒或SARS-CoV-2或SARS-CoV-1感染的一个或多个指标来评估中和活性,诸如表达沙贝病毒刺突蛋白的细胞与表达沙贝病毒受体ACE2的细胞之间的合胞体形成。

[0117] 在具体实施方案中,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(15)能够中和沙贝病毒(特别是SARS-CoV-2和/或SARS-CoV-1),其中半数最大抑制浓度或50%抑制浓度(IC_{50})为100ng/ml或更低,优选50ng/ml或更低或20ng/ml或更低,更优选10ng/ml或更低,甚至更优选1ng/ml或更低,优选地如在沙贝病毒刺突蛋白假病毒中和测定(诸如水泡性口炎病毒(VSV)-沙贝病毒刺突蛋白假病毒中和测定)中测定,更优选地如在SARS-CoV-2刺突蛋白和/或SARS-CoV-1刺突蛋白假病毒中和测定(诸如VSV-SARS-CoV-2刺突蛋白假病毒中和测定或VSV-SARS-CoV-1刺突蛋白假病毒中和测定)中测定的。特别地,假病毒中和测定可基于含有沙贝病毒刺突蛋白(诸如SARS-CoV-2刺突蛋白、SARS-CoV-2变体刺突蛋白或SARS-CoV-1刺突蛋白)的假型VSV-delG病毒。如本文所用,与结合剂或抗体中和活性相关的“半数最大抑制浓度”或“IC_{50}”是指一个量,诸如中和50%沙贝病毒所需结合剂或抗体的浓度。

[0118] 在具体实施方案中,结合剂(特别是抗体和抗体片段)(16)能够中和至少一种SARS-CoV-2变体,诸如在位置D614处包含突变的SARS-CoV-2变体(相对于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突氨基酸序列),诸如D614G变体,特别是SARS-CoV-2Alpha变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.5变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.4.6变体、SARS-CoV-2 Omicron BF.7变体、SARS-CoV-2 Omicron BQ.1.1变体、SARS-CoV-2 Omicron XBB变体和SARS-CoV-2 Omicron XBB.1.5变体中的至少任一者或多者,优选全部。在具体实施方案中,结合剂(特别是本文所述的抗体和抗体片段)的特征在于,它们(17)能够中和SARS-CoV-2Alpha变体,(18)能够中和SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体,(19)能够中和SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体,(37)能够中和SARS-CoV-2 Omicron BA.5变体,(38)能够中和SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2变体,(39)能够中和SARS-CoV-2 Omicron BA.4.6变体,(40)能够中和SARS-CoV-2 Omicron BF.7变体,(41)能够中和SARS-CoV-2 Omicron BQ.1.1变体,(42)能够中和SARS-CoV-2 Omicron XBB变体,并且/或者(43)能够中和SARS-CoV-2 Omicron XBB.1.5变体,其中IC_{50}为100ng/ml或更低,优选50ng/ml或更低或20ng/ml或更低,更优选10ng/ml或更低,甚至更优选1ng/ml或更低,优选地如在SARS-CoV-2变体刺突假病毒中和测定(诸如VSV-SARS-CoV-2变体刺突假病毒中和测定)中测定的。

[0119] 本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)的进一步特征在于它们(14)能够抑制病毒融合。在具体实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体和抗体片段)(13)能够抑制刺突介导的合胞体形成,更特别地,它们(20)能够抑制表达沙贝病毒刺突蛋白(诸如SARS-CoV-2和/或SARS-CoV-1刺突蛋白)的细胞与表达沙贝病毒宿主受体(特别是ACE2受体)的细胞之间的合胞体形成。

[0120] 如本文所用,“病毒融合”是指病毒膜与宿主细胞膜的融合。病毒融合测定对于本领域技术人员来说是熟知的,并且在本文的实施例中描述了执行此类方法的示例性方法。本领域技术人员将清楚,不需要完全抑制,并且本领域技术人员能够鉴定出显著抑制病毒融合或刺突介导的合胞体形成的结合剂、抗体和抗体片段。优选地,如本文所述(21)的结合剂(特别是抗体和抗体片段)可以诱导至少50%的抑制,优选至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的抑制。

[0121] 在具体实施方案中,将上文所述的沙贝病毒结合剂(特别是沙贝病毒抗体或抗体片段)的一些功能特征组合起来,以表征此类结合剂、抗体或抗体片段,例如结合或特异性结合至沙贝病毒刺突蛋白HR2结构域,并且能够中和沙贝病毒,特别是SARS-CoV-2(诸如SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1毒株、SARS-CoV-2D6 1 4G变体、SARS-CoV-2Alpha变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.5变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.4.6变体、SARS-CoV-2 Omicron BF.7变体、SARS-CoV-2 Omicron BQ.1.1变体、SARS-CoV-2 Omicron XBB变体和SARS-CoV-2 Omicron XBB.1.5变体中的任一者或多者)和SARS-CoV-1中的至少一者或两者,优选能够中和沙贝病毒,其中50%抑制浓度(IC_{50})为100ng/ml或更低,优选10ng/ml或更低,更优选1ng/ml或更低,如在水泡性口炎病毒(VSV)-沙贝病毒刺突蛋白假病毒中和测定中测定的。此类结合剂、抗体或抗体片段还可以具有如下特征:能够抑制表达沙贝病毒刺突蛋白的细胞与表达血管紧张素转化酶2(ACE2)受体的细胞之间刺突介导的合胞体形成,以

及/或者能够抑制病毒融合;以及/或者不结合中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。

[0122] 本文所述的结合剂还可以在结构上被定义为多肽结合剂(即,包含肽、多肽或蛋白质部分的结合剂,或包含肽、多肽、蛋白质或蛋白质结构域的结合剂)或多肽结合剂(即,结合剂是肽、多肽或蛋白质)。

[0123] 术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物及其变体和合成类似物;氨基酸的序列线性排列在一起,产生/形成“氨基酸序列”或“蛋白质序列”。“肽”还可以指例如在酶促(例如,胰蛋白酶)消化后源自其原始蛋白质的部分氨基酸序列。这些术语既适用于天然存在的氨基酸聚合物,也适用于其中一个或多个氨基酸残基为合成的非天然存在氨基酸(诸如相应天然存在氨基酸的化学类似物)的氨基酸聚合物。这些术语还包括包含一种或多种翻译后修饰的蛋白质,诸如官能团或蛋白质的共价添加(诸如糖基化、磷酸化、乙酰化、泛素化、甲基化、脂质化和亚硝基化),或诸如蛋白水解加工。基于氨基酸序列和修饰,多肽的原子或分子质量或重量以(千)道尔顿(kDa)表示。蛋白质的进一步修饰包括添加标签,诸如His-标签或分选标签(sortag)。例如,通过分选标记(sortagging)(sortase-mediated transpeptidation;Popp等人,2007,NatChemBiol3:707-708)构建了中和SARS-CoV2的多臂PEG纳米抗体(Moliner-Morro等人,2020,Biomolecules 10:1661)。

[0124] “蛋白质结构域”是蛋白质中独特的功能和/或结构单元,或者是蛋白质的一部分。通常,蛋白质结构域负责特定的功能或相互作用,从而有助于蛋白质的整体(生物学)作用。结构域可存在于多种生物学环境中,其中相似的结构域可在具有相似或不同功能的不同蛋白质中找到。如果受到多个分子内半胱氨酸(例如半胱氨酸结蛋白)的限制,蛋白质结构域可以具有刚性的3D结构,或者可以根据例如存在或不存在结合配体或例如存在或不存在翻译后修饰而呈现不同的3D构象,或者可以具有不太明确、更流动的3D结构。

[0125] 本文中的氨基酸以3个或1个字母代码命名法表示,如IUPAC-IUB生化命名联合委员会(Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides.Eur.J.Biochem.138:9-37(1984))所定义和提供的那样;如下:丙氨酸(A或Ala)、半胱氨酸(C或Cys)、天冬氨酸(D或Asp)、谷氨酸(E或Glu)、苯丙氨酸(F或Phe)、甘氨酸(G或Gly)、组氨酸(H或His)、异亮氨酸(I或Ile)、赖氨酸(K或Lys)、亮氨酸(L或Leu)、蛋氨酸(M或Met)、天冬酰胺(N或Asn)、脯氨酸(P或Pro)、谷氨酰胺(Q或Gln)、精氨酸(R或Arg)、丝氨酸(S或Ser)、苏氨酸(T或Thr)、缬氨酸(V或Val)、色氨酸(W或Trp)和酪氨酸(Y或Tyr)。

[0126] 更特别地,本文所述的结合剂可以在结构上定义为包含互补决定区(CDR)的多肽或多肽结合剂,该互补决定区如包含在本文定义的任何免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)中。在优选实施方案中,多肽或多肽结合剂是(分离的)抗体或抗体片段。

[0127] 在某些实施方案中,根据本发明的结合剂(特别是抗体和抗体片段)可以在结构上定义为包含至少CDR3的多肽或多肽结合剂(特别是抗体和抗体片段),该CDR3如包含在本文定义的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)中。在其他实施方案中,根据本发明的结合剂(特别是抗体和抗体片段)可以在结构上定义为包含CDR1、CDR2和CDR3中的至少两者(例如CDR1和CDR3、CDR2和CDR3、CDR1和CDR2),或CDR1、CDR2和CDR3中的全部三者的多肽或多肽结合剂(特别是抗体和抗体片段),该CDR1、CDR2和CDR3如包含在本文定义的免疫球蛋白单可变结构域(ISVD)中。此类CDR可包含在VHH R3 C4(由SEQ ID NO:1定义/列出)、VHH R4_DC16(由

SEQ ID NO:2定义/列出)、VHH R3_DC20(由SEQ ID NO:3定义/列出)、VHHR3_DC2(由SEQ ID NO:4定义/列出)、VHH R4_DC20(由SEQ ID NO:5定义/列出)、VHHR4_DC9(由SEQ ID NO:6定义/列出)、VHH R4_DC6(由SEQ ID NO:7定义/列出)、VHH R3_DC23(本文中还称为VHH R3DC23或R3DC23;由SEQ ID NO:8定义/列出)、VHHR3_DC9(由SEQ ID NO:9定义/列出)或VHH R4_DC13(由SEQ ID NO:10定义/列出)中,如下所示:

[0128] VHH R3_C4:

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWS

[0129] GGTIYYADSVKGRFTISRDNDKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWY

RASGLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 1）

[0130] VHH R4_DC16:

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWS

[0131] GGTIYYADSVKGRFTISRDNAQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSSWY

RNSGLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 2）

[0132] VHH R3_DC20:

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWS

[0133] GGTIYYADSVKGRFTISRDNAQNTVNLQMNSLEPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWY

RNSGLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 3）

[0134] VHH R3_DC2:

QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASMRWS

[0135] GGTKYYSDSVKGRFSISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLW

YRNSGLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 4）

[0136] VHH R4_DC20:

QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASMRWS

[0137] GGTMNYADSVKGRFTISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLW

YRNSGLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 5）

[0138] VHH R4_DC9:

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRIFSTYTMGWFRQAPGMEREFVAAIRWS

[0139] GSTVYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAARVSKANYGTLW

YRASGLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 6）

[0140] VHH R4_DC6:

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRILSTFTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWN

[0141] GGTKNYADSVKGRFTISRDNANSVVYLQMNSTKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLW

YRTPSLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 7）

[0142] VHH R3_DC23:

QVQLQESGGGLVQAGDSLTLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWG

[0143] AGTIYYADSMKGRFTISRDSAKNTVDLQMNSTKPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWY QDSRRYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 8）

[0144] VHH R3_DC9：

QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASMRWS

[0145] GGTMYYSDSVKGRFTISRDNDKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLW YRNSGLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 9）

[0146] VHH R4_DC13：

QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASMRWS

[0147] GGTVYYSDSVKGRFTISRDNDKNTVNLQMNNLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSFW YRNSDLYDYWGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 10）

[0148] 对于任何IVD或ISVD氨基酸残基的编号,可应用不同的编号方案。例如,可根据Honegger和Plückthun给出的所有重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)的AHo编号方案(2001.J Mol Biol 309:657-70)进行编号,如应用于骆驼科动物的VHH结构域。用于对VH结构域的氨基酸残基进行编号的替代方法是本领域已知的,这些方法也可以类似方式应用于VHH结构域。例如,FR序列和CDR序列的划分可通过使用Kabat编号系统来进行,如应用于骆驼科动物的VHH结构域(Riechmann和Muyldermans(1999.J ImmunolMethods 231:25-38))。应当注意-如本领域针对VH结构域和VHH结构域熟知的-每个CDR中氨基酸残基的总数可变化,并且可能不对应于Kabat编号指示的氨基酸残基的总数(即,根据Kabat编号的一个或多个位置在实际序列中可能不被占据,或者实际序列可能含有比Kabat编号所允许的数目更多的氨基酸残基)。这意味着,通常,根据Kabat的编号可对应于或可不对应于实际序列中的氨基酸残基的实际编号。在VH结构域和VHH结构域中的氨基酸残基的总数通常在110至120的范围内,经常为112至115。然而,应当注意,更小和更长的序列也可适用于本文所述的目的。

[0149] 抗体/免疫球蛋白序列中CDR区的确定通常取决于所应用的算法/方法。例如,CDR区的确定可根据基于接触分析和结合位点拓扑学的命名,如在MacCallum等人(J.Mol.Biol.(1996)262,732-745)、AbM(AbM是Oxford Molecular Ltd的抗体建模包,如http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html上所述)、Chothia(Chothia和Lesk,1987;Mol Biol.196:901-17)、Martin(Abhinandan和Martin.Molecular Immunology 45(2008)3832-3839;如http://bioinf.org.uk/abs/info.html中所示)、Kabat(Kabat等人,1991;第5版,NIH publication 91-3242)或IMGT(LeFranc,2014;Frontiers in Immunology.5(22):1-22)中所述。所述注释还包括对含免疫球蛋白结构域的蛋白质中的CDR和框架区(FR)的划分,并且是本领域技术人员已知的方法和系统,因此他们可将这些注释应用于任何抗体/免疫球蛋白序列而没有过度的负担。作为示例,图20示出了应用于VHH R3_DC23(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列的不同注释方案或方法。

[0150] 对相同的抗体/免疫球蛋白序列应用不同的方法可能会产生不同的CDR氨基酸序列,其中差异可能在于抗体/免疫球蛋白/IVD序列内的CDR序列长度和/或划分(如图20中的VHHR3_DC23所示)。因此,本文所述的ISVD结合剂(特别是抗体和抗体片段)的CDR可描述为

本文表征的ISVD中存在的CDR序列。另选地,可以将这些CDR描述为ISVD中存在的CDR序列(如本文所述),如根据熟知的方法所确定或划分的,诸如根据Kabat-、Martin-、Chothia-、aHo、MacCallum等人1996、AbM-、或IMGT编号方案或方法中的任一者,诸如优选Martin编号方案或方法。

[0151] VHH或Nb通常根据氨基酸序列分为不同的家族或甚至超家族,以便在B细胞成熟期间对源自相同祖细胞的克隆相关序列进行聚类(Deschaght等人,2017,Front Immunol8:420)。这种分类通常基于VHH或Nb的CDR序列,并且其中例如每个VHH或Nb家族定义为以下簇,该簇具有CDR3区序列同一性阈值的(克隆)相关序列。在本文定义的单一VHH家族内,CDR3序列因此在氨基酸组成上是相同的或非常相似的,优选在CDR3序列中具有至少80%同一性、或至少85%同一性、或至少90%同一性,从而使得相同家族的VHH或Nb与相同结合位点结合,并且具有相同的效果诸如功能效果。

[0152] 如上所述,存在许多系统或方法(Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Chothia、Martin)用于编号免疫球蛋白序列中的氨基酸,包括用于划分这些蛋白质序列中的CDR和框架区(FR)。这些系统或方法是本领域技术人员已知的,因此他们可将这些系统或方法应用于任何免疫球蛋白序列而没有过度的负担(如图20中的VHH R3_DC23所示)。

[0153] 在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:77中任一者定义/列出的CDR1。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:78中任一者定义/列出的CDR2。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:79中任一者定义/列出的CDR3。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:77中任一者定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:78中任一者定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:79中任一者定义/列出的CDR3。

[0154] 在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可包含:

[0155] -由SEQ ID NO:63定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:64定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:67定义/列出的CDR3;或

[0156] -由SEQ ID NO:69定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:70定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:67定义/列出的CDR3;或

[0157] 由SEQ ID NO:63定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:64定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:48定义/列出的CDR3;或

[0158] 由SEQ ID NO:46定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:47定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:48定义/列出的CDR3;或

[0159] 由SEQ ID NO:63定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:73定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:74定义/列出的CDR3;或

[0160] -由SEQ ID NO:77定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:78定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:79定义/列出的CDR3。

[0161] 表1:根据某些实施方案VHH中的CDR序列:

[0162]

注释方法	CDR1	CDR2	CDR3
AbM	GRXXSTXTMG 其中位置3的X为P、I、A、L或V；位置4的X为F、L、I或M；位置7的X为Y、F或W（SEQ ID NO: 63）	XXRWXXXTXX 其中位置1处的X为A、G、S或T；位置2处的X为M、I、L或V；位置5处的X为S、N、T、Q或G；位置6处的X为G、A或P；位置7处的X为G或S；位置9处的X为I、L、M、K、V或R；位置10处的X为Y、W、N、S、F、Q或T（SEQ ID NO: 64）	AXVSKANYGXXWYXXXXXYD 其中位置2处的X为Y、W、R或K；位置10处的X为S、N或T；位置11处的X为L、I、S、N、F、M、V或T；位置14处的X为R、Q、K或N；位置15处的X为A、G、N、S、T、D或E；位置16处的X为S、P、A、G或T；位置17处的X为G、A、D、S、R、T、K、E；位置18处的X为L、I、R、V、M或K（SEQ ID NO: 67）
Chothia	GRXXSTXTM 其中位置3的X为P、I、A、L或V；位置4的X为F、L、I或M；位置7的X为Y、F或W（SEQ ID NO: 69）	WXXX 其中位置2处的X为S、N、T、Q或G；位置3处的X为G、A或P；位置4处的X为G或S（SEQ ID NO: 70）	AXVSKANYGXXWYXXXXXYD 其中位置2处的X为Y、W、R或K；位置10处的X为S、N或T；位置11处的X为L、I、S、N、F、M、V或T；位置14处的X为R、Q、K或N；位置15处的X为A、G、N、S、T、D或E；位置16处的X为S、P、A、G或T；位置17处的X为G、A、D、S、R、T、K、E；位置18处的X为L、I、R、V、M或K（SEQ ID NO: 67）
Martin	GRXXSTXTMG 其中位置3的X为P、I、A、L或V；位置4的X为F、L、I或M；位置7的X为Y、F或W（SEQ ID NO: 63）	XXRWXXXTXX 其中位置1处的X为A、G、S或T；位置2处的X为M、I、L或V；位置5处的X为S、N、T、Q或G；位置6处的X为G、A或P；位置7处的X为G或S；位置9处的X为I、L、M、K、V或R；位置10处的X为Y、W、N、S、F、Q或T（SEQ ID NO: 64）	AXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 其中位置2处的X为Y、W、R或K；位置10处的X为S、N或T；位置11处的X为L、I、S、N、F、M、V或T；位置14处的X为R、Q、K或N；位置15处的X为A、G、N、S、T、D或E；位置16处的X为S、P、A、G或T；位置17处的X为G、A、D、S、R、T、K、E；位置18处的X为L、I、R、V、M或K（SEQ ID NO: 48）
Kabat	TXTMG 其中位置2处的X为Y或F或W（SEQ ID NO: 46）	XXRWXXXTXXYXDSXKG 其中位置1处的X为A、G、S或T；位置2处的X为M、I、L或V；位置5处的X为S、N、T、Q或G；位置6处的X为G、A或P；位置7处的X为G或S；位置9处的X为I、L、M、K、V或R；位置10处的X为Y、W、N、S、F、Q或T；位置12处的X为A、G、S、N、T或V；位置15处的X为V或M（SEQ ID NO: 47）	AXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 其中位置2处的X为Y、W、R或K；位置10处的X为S、N或T；位置11处的X为L、I、S、N、F、M、V或T；位置14处的X为R、Q、K或N；位置15处的X为A、G、N、S、T、D或E；位置16处的X为S、P、A、G或T；位置17处的X为G、A、D、S、R、T、K、E；位置18处的X为L、I、R、V、M或K（SEQ ID NO: 48）
IMGT	GRXXSTXTMG 其中位置3的X为P、I、A、L或V；位置4的X为F、L、I或M；位置7的X为Y、F或W（SEQ ID NO: 63）	XRWXXXTX 其中位置1处的X为M、I、L或V；位置4处的X为S、N、T、Q或G；位置5处的X为G、A或P；位置6处的X为G或S；位置8处的X为I、L、M、K、V或R（SEQ ID NO: 73）	XAAXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 其中位置1处的X为A、G、S、T、V或N；位置4处的X为Y、W、R或K；位置12处的X为S、N或T；位置13处的X为L、I、S、N、F、M、V或T；位置16处的X为R、Q、K或N；位置17处的X为A、G、N、S、T、D或E；位置18处的X为S、P、A、G或T；位置19处的X为G、A、D、S、R、T、K、E；位置20处的X为L、I、R、V、M或K（SEQ ID NO: 74）
MacCallum	STXTMG 其中位置3处的X为Y或F或W（SEQ ID NO:	FVAXXRWXXXTXX 其中位置4处的X为A、G、S或T；位置5处的X为M、I、L或V；位置8处的X为S、N、T、Q或G；	XAAXVSKANYGXXWYXXXXXY 其中位置1处的X为A、G、S、T、V或N；位置4处的X为Y、W、R或K；位置12处的X为S、N或T；位置13处的X为L、I、

[0163]

注释方法	CDR1	CDR2	CDR3
	77）	位置9处的X为G、A或P；位置10处的X为G或S；位置12处的X为I、L、M、K、V或R；位置13处的X为Y、W、N、S、F、Q或T（SEQ ID NO: 78）	S、N、F、M、V或T；位置16处的X为R、Q、K或N；位置17处的X为A、G、N、S、T、D或E；位置18处的X为S、P、A、G或T；位置19处的X为G、A、D、S、R、T、K、E；位置20处的X为L、I、R、V、M或K（SEQ ID NO: 79）

[0164] 在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:80中任一者定义/列出的CDR1。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:81中任一者定义/列出的CDR2。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:76或SEQ ID NO:82中任一者定义/列出的CDR3。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:80中任一者定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:81中任一者定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:76或SEQ ID NO:82中任一者定义/列出的CDR3。

[0165] 在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可包含:

[0166] -由SEQ ID NO:65定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:66定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:68定义/列出的CDR3;或

[0167] -由SEQ ID NO:71定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:72定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:68定义/列出的CDR3;或

[0168] -由SEQ ID NO:65定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:66定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:51定义/列出的CDR3;或

[0169] -由SEQ ID NO:49定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:50定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:51定义/列出的CDR3;或

[0170] -由SEQ ID NO:65定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:75定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:76定义/列出的CDR3;或

[0171] -由SEQ ID NO:80定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:81定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:82定义/列出的CDR3。

[0172] 表2:通过采用所示的不同注释方法,对本文所述的某些实施方案的VHH中CDR的示例定义/序列。

[0173]

注释方法	CDR1	CDR2	CDR3
AbM	GRXXSTXTMG 其中位置3处的X为P或I；位置4处的X为F或L；位置7处的X为Y或F（SEQ ID NO: 65）	XXRWXXXTXX 其中位置1处的X为A、G、S或T；位置2处的X为M、I、L或V；位置5处的X为S、N、T、Q或G；位置6处的X为G、A或P；位置7处的X为G或S；位置9处的X为I、L、M、K、V或R；位置10处的X为Y、W、N、S、F、Q或T（SEQ ID NO: 66）	AXVSKANYGXXWYXXXXXYD 其中位置2处的X为Y或R；位置10处的X为S或T；位置11处的X为L、S或F；位置14处的X为R或Q；位置15处的X为A、N、T或D；位置16处的X为S或P；位置17处的X为G、D、S或R；位置18处的X为L或R（SEQ ID NO: 68）
Chothia	GRXXSTXTM 其中位置3处的X为P或I；位置4处的X为F或L；位置7处的X为Y或F（SEQ ID NO: 71）	WXXX 其中位置2处的X为S、N、T、Q或G；位置3处的X为G、A或P；位置4处的X为G或S（SEQ ID NO: 72）	AXVSKANYGXXWYXXXXXYD 其中位置2处的X为Y或R；位置10处的X为S或T；位置11处的X为L、S或F；位置14处的X为R或Q；位置15处的X为A、N、T或D；位置16处的X为S或P；位置17处的X为G、D、S或R；位置18处的X为L或R（SEQ ID NO: 68）
Martin	GRXXSTXTMG 其中位置3处的X为P或I；位置4处的X为F或L；位置7处的X为Y或F（SEQ ID NO: 65）	XXRWXXGTXX 其中位置1处的X为A或S；位置2处的X为M、I或V；位置5处的X为S或N；位置6处的X为G或A；位置9处的X为I、M、K或V；位置10处的X为Y或N（SEQ ID NO: 66）	AXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 其中位置2处的X为Y或R；位置10处的X为S或T；位置11处的X为L、S或F；位置14处的X为R或Q；位置15处的X为A、N、T或D；位置16处的X为S或P；位置17处的X为G、D、S或R；位置18处的X为L或R（SEQ ID NO: 51）
Kabat	TXTMG 其中位置2处的X为Y或F（SEQ ID NO: 49）	XXRWXXGTXXYXDSXKG 其中位置1处的X为A或S；位置2处的X为M、I或V；位置5处的X为S或N；位置6处的X为G或A；位置9处的X为I、M、K或V；位置10处的X为Y或N；位置12处的X为A或S；位置15处的X为V或M（SEQ ID NO: 50）	AXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 其中位置2处的X为Y或R；位置10处的X为S或T；位置11处的X为L、S或F；位置14处的X为R或Q；位置15处的X为A、N、T或D；位置16处的X为S或P；位置17处的X为G、D、S或R；位置18处的X为L或R（SEQ ID NO: 51）
IMGT	GRXXSTXTMG 其中位置3处的X为P或I；位置4处的X为F或L；位置7处的X为Y或F（SEQ ID NO: 65）	XRWXXGTX 其中位置1处的X为M、I或V；位置4处的X为S或N；位置5处的X为G或A；位置8处的X为I、M、K或V（SEQ ID NO: 75）	XAAXVSKANYGXXWYXXXXXYDY 其中位置1处的X为A或G；位置4处的X为Y或R；位置12处的X为S或T；位置13处的X为L、S或F；位置16处的X为R或Q；位置17处的X为A、N、T或D；位置18处的X为S或P；位置19处的X为G、D、S或R；位置20处的X为L或R（SEQ ID NO: 76）
MacCallum	STXTMG 其中位置3处的X为Y或F（SEQ ID NO: 80）	FVAXXRWXXXTXX 其中位置4处的X为A、G、S或T；位置5处的X为M、I、L或V；位置8处的X为S、N、T、Q或G；位置9处的X为G、A或P；位置10处的X为G或	XAAXVSKANYGXXWYXXXXXY 其中位置1处的X为A或G；位置4处的X为Y或R；位置12处的X为S或T；位置13处的X为L、S或F；位置16处的X为R或Q；位置17处的X为A、N、T或D；位置18处的X为S或P；位置19处的X为G、D、

[0174]

注释方法	CDR1	CDR2	CDR3
		S；位置12处的X为I、L、M、K、V或R；位置13处的X为Y、W、N、S、F、Q或T（SEQ ID NO: 81）	S或R；位置20处的X为L或R（SEQ ID NO: 82）

[0175] 在某些优选实施方案中,如本文所述的结合剂或沙贝病毒结合剂(特别是抗体或抗体片段或沙贝病毒抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中的任一者中存在的CDR1,其中CDR1根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。在某些优选实施方案中,如本文所述的结合剂或沙贝病毒结合剂(特别是抗体或抗体片段或沙贝病毒抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中的任一者中存在的CDR2,其中CDR2根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。在某些优选实施方案中,如本文所述的结合剂或沙贝病毒结合剂(特别是抗体或抗体片段或沙贝病毒抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中的任一者中存在的CDR3,其中CDR3根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。在某些优选实施方案中,如本文所述的结合剂或沙贝病毒结合剂(特别是抗体或抗体片段或沙贝病毒抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含CDR1、CDR2和CDR3,每一者均独立地存在于SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中的任一者中,其中该CDR1、CDR2和CDR3根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。

[0176] 在某些优选实施方案中,如本文所述的结合剂或沙贝病毒结合剂(特别是抗体或抗体片段或沙贝病毒抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含CDR1、CDR2和CDR3的组合,其中该CDR1、CDR2和CDR3存在于由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10列出的序列中的特定序列,其中该CDR1、CDR2和CDR3根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。

[0177] 在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中任一者定义/列出的CDR1。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:55-62或SEQ ID NO:13-20中任一者定义/列出的CDR2。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:21-27中任一者定义/列出的CDR3。在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含由SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中的任一者定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:55-62或SEQ ID NO:13-20中的任一者定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:21-27中的任一者定义/列出的CDR3。

[0178] 在某些实施方案中,本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可包含:

[0179] -由SEQ ID NO:52-54中任一者定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:55-62中任一者定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:21-27中任一者定义/列出的CDR3;或

[0180] -由SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12中任一者定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:13-20中任一者定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:21-27中任一者定义/列出的CDR3。

[0181] 表3:通过采用所示的不同注释方法,对本文所述的某些实施方案的VHH中CDR的示例定义/序列,特别是根据Kabat或Martin系统或方法确定的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和VHH R4_DC13中任一者包含的CDR。

[0182]

注释方法	CDR1	CDR2	CDR3
Martin	GRPFSTYTMG（SEQ ID NO: 52）、GRIFSTYTMG（SEQ ID NO: 53）或GRILSTFTMGW（SEQ ID NO: 54）	AMRWSGGTIY（SEQ ID NO: 55）、SMRWSGGTMY（SEQ ID NO: 56）、SMRWSGGTKY（SEQ ID NO: 57）、SMRWSGGTMN（SEQ ID NO: 58）、SMRWSGGTVY（SEQ ID NO: 59）、AIRWSGSTVY（SEQ ID NO: 60）、AMRWNGGTKN（SEQ ID NO: 61）或AVRWGAGTIY（SEQ ID NO: 62）	AYVSKANYGSLWYRASGLYDY（SEQ ID NO: 21）、AYVSKANYGSSWYRNSGLYDY（SEQ ID NO: 22）、AYVSKANYGSLWYRNSGLYDY（SEQ ID NO: 23）、AYVSKANYGSFWYRNSDLYDY（SEQ ID NO: 24）、ARVSKANYGTLWYRASGLYDY（SEQ ID NO: 25）、AYVSKANYGSLWYRTPSLYDY（SEQ ID NO: 26）或AYVSKANYGSLWYQDSRRYDY（SEQ ID NO: 27）
Kabat	TYTMG（SEQ ID NO: 11）或TFTMG（SEQ ID NO: 12）	AMRWSGGTIYYADSVKG（SEQ ID NO: 13）、SMRWSGGTMYYSDSVKG（SEQ ID NO: 14）、SMRWSGGTKYYSDSVKG（SEQ ID NO: 15）、SMRWSGGTMNYADSVKG（SEQ ID NO: 16）、SMRWSGGTVYYSDSVKG（SEQ ID NO: 17）、AIRWSGSTVYYADSVKG（SEQ ID NO: 18）、AMRWNGGTKNYADSVKG	AYVSKANYGSLWYRASGLYDY（SEQ ID NO: 21）、AYVSKANYGSSWYRNSGLYDY（SEQ ID NO: 22）、AYVSKANYGSLWYRNSGLYDY（SEQ ID NO: 23）、AYVSKANYGSFWYRNSDLYDY（SEQ ID NO: 24）、ARVSKANYGTLWYRASGLYDY（SEQ ID NO: 25）、AYVSKANYGSLWYRTPSLYDY（SEQ ID NO: 26）或AYVSKANYGSLWYQDSRRYDY

[0183]

注释方法	CDR1	CDR2	CDR3
		（SEQ ID NO: 19）或AVRWGAGTIYYADSMKG（SEQ ID NO: 20）	（SEQ ID NO: 27）

[0184] 例如,本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可定义为包含SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的互补决定区(CDR),其中CDR根据Kabat定义。在某些实施方案中,结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)包含以下三个互补决定区(CDR)组中的一者:

[0185] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:13定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:21定义/列出的CDR3;或

[0186] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:13定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:22定义/列出的CDR3;或

[0187] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:13定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:23定义/列出的CDR3;或

[0188] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:14定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:23定义/列出的CDR3;或

[0189] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:12定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:23定义/列出的CDR3;或

[0190] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:16定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:23定义/列出的CDR3;

[0191] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:17定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:24定义/列出的CDR3;

[0192] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:18定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:25定义/列出的CDR3;

[0193] -由SEQ ID NO:12定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:19定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:26定义/列出的CDR3;

[0194] -由SEQ ID NO:11定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:20定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:27定义/列出的CDR3。

[0195] 在具体实施方案中,本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可定义为包含SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的互补决定区(CDR),其中CDR根据Martin定义。在某些实施方案中,结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)包含以下三个互补决定区(CDR)组中的一者:

[0196] -由SEQ ID NO:52定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:55定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:21定义/列出的CDR3;或

[0197] -由SEQ ID NO:52定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:55定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:22定义/列出的CDR3;或

[0198] -由SEQ ID NO:52定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:55定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:23定义/列出的CDR3;或

[0199] -由SEQ ID NO:52定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:57定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:23定义/列出的CDR3;或

[0200] -由SEQ ID NO:52定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:58定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:23定义/列出的CDR3;或

[0201] -由SEQ ID NO:53定义/列出的CDR1、由SEQ ID NO:60定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:25定义/列出的CDR3;或

[0202] -由SEQ ID NO:54定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:61定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:26定义/列出的CDR3;

[0203] -由SEQ ID NO:53定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:62定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:27定义/列出的CDR3;

[0204] -由SEQ ID NO:52定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:56定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:23定义/列出的CDR3;

[0205] -由SEQ ID NO:52定义/列出的CDR1;由SEQ ID NO:59定义/列出的CDR2;以及由SEQ ID NO:24定义/列出的CDR3。

[0206] 在进一步的实施方案中,根据本发明的多肽或多肽结合剂(特别是抗体和抗体片

段,更特别是ISVD)可以包含如SEQ ID NO:1-10中任一者中包含的一个或多个框架区(FR),或包含此类FR的变体。更特别地,此类结合剂、抗体或抗体片段或ISVD可包含FR1、FR2、FR3和FR4区中的至少一者(诸如一者、两者、三者或全部),每一者均独立地包含在SEQ ID NO:1-10中的任一者中,或包含此类FR的变体。例如,此类结合剂、抗体或抗体片段或ISVD可包含如SEQ ID NO:1-10中任一者包含的FR1和FR2区;FR1和FR3区;FR1和FR4区;FR2和FR3区;FR2和FR4区;FR3和FR4区;FR1、FR2和FR3区;FR1、FR2和FR4区;FR2、FR3和FR4区;或FR1、FR3和FR4区,或包含此类FR的变体。在某些优选实施方案中,此类结合剂、抗体或抗体片段或ISVD包含如SEQ ID NO:1-10中任一者包含的FR1区或FR4区或FR2和FR3区,或包含此类FR的变体。为了划分这些蛋白质序列中的FR,可应用本文其他地方描述的、图20中针对VHH R3_DC23所示且为本领域技术人员所知的以下系统或方法中的任何一种,该系统或方法用于对免疫球蛋白序列中的氨基酸进行编号。举例来说,本文采用Martin或Kabat方法学描述的某些特定VHH中的FR序列如表4所示。

[0207] 表4:本文采用Kabat或Martin方法学描述的某些实施方案的VHH中FR的示例序列。

[0208]

注释方法	FR1	FR2	FR3	FR4
Kabat	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFS（SEQ ID NO: 28）、QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVSGRPFS（SEQ ID NO: 29）、QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRIFS（SEQ ID NO: 30）、QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRILS（SEQ ID NO: 31）、QVQLQESGGGLVQAGDSLTLSCAVSGRIFS（SEQ ID NO: 32）	WFRQAPGKEREFVA（SEQ ID NO: 33）、WFRQAPGMEREFVA（SEQ ID NO: 34）	RFTISRDNDKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 35）、RFTISRDNAQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 36）、RFTISRDNAQNTVNLQMNSLEPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 37）、RFTISRDNDKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 38）、RFSISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 39）、RFTISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 40）、RFTISRDNDKNTVNLQMNNLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 41）、RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 42）、RFTISRDNANSVVYLQMNSTKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 43）、RFTISRDSAKNTVDLQMNSTKPEDTAVYYCGA（SEQ ID NO: 44）	WGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 45）
Martin	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVS（SEQ ID NO: 97）、QVQLQESGGGLVQTGDSLRLSCAVS（SEQ ID NO: 98）、QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS（SEQ ID NO: 99）、QVQLQESGGGLVQAGDSLTLSCAVS（SEQ ID NO: 100）	WFRQAPGKEREFVA（SEQ ID NO: 33）、WFRQAPGMEREFVA（SEQ ID NO: 34）	YADSVKGRFTISRDNDKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 101）、YADSVKGRFTISRDNAQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 102）、YADSVKGRFTISRDNAQNTVNLQMNSLEPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 103）、YSDSVKGRFTISRDNDKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 104）、YSDSVKGRFSISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 105）、YADSVKGRFTISRDNDQNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 106）、YSDSVKGRFTISRDNDKNTVNLQMNNLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 107）、YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 108）、YADSVKGRFTISRDNANSVVYLQMNSTKPEDTAVYYCAA（SEQ ID NO: 109）、YADSMKGRFTISRDSAKNTVDLQMNSTKPEDTAVYYCGA（SEQ ID NO: 110）	WGQGTQVTVSS（SEQ ID NO: 45）

[0209] 本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是,它包含SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的框架区1(FR1),其中FR1根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义,或者它包含变体FR1,该变体FR1与SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的FR1相比,至少90%或95%相同,或者具有最多3个

(诸如1个、2个或3个)氨基酸取代、缺失或添加,诸如优选地保守和/或人源化取代,其中FR1根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义。

[0210] 本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是,它包含如SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的框架区2(FR2),其中FR2根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义,或者它包含变体FR2,该变体FR2与SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的FR2相比,至少85%或90%相同,或者具有最多2个(诸如1个或2个)氨基酸取代、缺失或添加,诸如优选地保守和/或人源化取代,其中FR2根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义。

[0211] 本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是,它包含如SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的框架区3(FR3),其中FR3根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义,或者它包含变体FR3,该变体FR3与SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的FR3相比,至少80%、85%、90%或95%相同,或者具有最多9个(诸如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或9个)氨基酸取代、缺失或添加,诸如优选地保守和/或人源化取代,其中FR3根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义。

[0212] 本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是,它包含如SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的框架区4(FR4),其中FR4根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义,或者它包含变体FR4,该变体FR4与SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的FR4相比,至少90%相同,或者具有最多1个氨基酸取代、缺失或添加,诸如优选地保守和/或人源化取代,其中FR4根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义。

[0213] 在进一步的实施方案中,本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是其各自独立地包含如上文定义的SEQ ID No:1-10中任一者中存在的FR1或变体FR1;如上文定义的SEQ ID No:1-10中任一者中存在的FR2或变体FR2;如上文定义的SEQ ID No:1-10中任一者中存在的FR3或变体FR3;以及如上文定义的SEQ ID No:1-10中任一者中存在的FR4或变体FR4,其中FR1、FR2、FR3和FR4根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义。

[0214] 在具体实施方案中,如本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中任一者中存在的框架区(FR)中的至少一个框架区,或两个、三个或全部框架区的特定组合,或包含如上文定义的FR或所述FR的任何变体,其中FR根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。

[0215] 在具体实施方案中,本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),其特征可以是它包含SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中任一者中存在的至少一个框架区,或两个、三个或全部框架区(FR)的特定组合,其中FR根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。

[0216] 在进一步的特定实施方案中,本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD),可定义为各自独立地包含SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的FR1;SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的FR2;SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的FR3;以及SEQ

ID NO:1-10中任一者中存在的FR4,其中FR1、FR2、FR3和FR4根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义。

[0217] 在进一步的特定实施方案中,如本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可定义为包含以下FR1、FR2、FR3和FR4,该FR1、FR2、FR3和FR4存在于SEQ ID NO:1-10所示任何序列的相同序列中,其中FR1、FR2、FR3和FR4根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义。

[0218] 在更进一步的特定实施方案中,如本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可定义为包含SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的全部四个框架区(FR),其中FR根据AbM、Chothia、Martin、Kabat、IMGT或MacCallum中的任一者定义。

[0219] 例如,本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可定义为包含SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的框架区(FR),其中FR根据Martin定义。在某些实施方案中,结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)包含以下框架区(FR)组中的一者:

[0220] -由SEQ ID NO:97定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:101定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0221] -由SEQ ID NO:97定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:102定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0222] -由SEQ ID NO:97定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:103定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0223] -由SEQ ID NO:98定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:104定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0224] -由SEQ ID NO:98定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:105定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0225] -由SEQ ID NO:98定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:106定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0226] -由SEQ ID NO:98定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:107定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0227] -由SEQ ID NO:99定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:34定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:108定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0228] -由SEQ ID NO:99定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:109定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0229] -由SEQ ID NO:100定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ IDNO:110定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:29定义/列出的FR4。

[0230] 例如,本文所述的多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)可定义为包含SEQ ID NO:1-10中任一者中存在的框架区(FR),其中FR根据Kabat定义。在某些实施方案中,结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)包含以下框架区(FR)组中的一者:

[0231] -由SEQ ID NO:28定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:35定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0232] -由SEQ ID NO:28定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:36定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0233] -由SEQ ID NO:28定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:37定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0234] -由SEQ ID NO:29定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:38定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0235] -由SEQ ID NO:29定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:39定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0236] -由SEQ ID NO:29定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:40定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0237] -由SEQ ID NO:29定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:41定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0238] -由SEQ ID NO:30定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:34定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:42定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0239] -由SEQ ID NO:31定义/列出的FRi,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:43定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:45定义/列出的FR4;或

[0240] -由SEQ ID NO:32定义/列出的FR1,由SEQ ID NO:33定义/列出的FR2,由SEQ ID NO:44定义/列出的FR3,和由SEQ ID NO:29定义/列出的FR4。

[0241] 在具体实施方案中,多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段)包含一种或多种由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中任一者单独定义或列出的ISVD;或包含一种或多种包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由其组成的ISVD。

[0242] 在进一步的实施方案中,所述多肽或多肽结合剂(特别是抗体或抗体片段,更特别是ISVD)包含或由以下氨基酸序列组成,该氨基酸序列与选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%同一性;或与选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%同一性。这种非同一性或变异性优选地限于FR氨基酸残基的非同一性或变异性。特别地,可引入这种非同一性或变异性以获得由SEQ ID NO:1-10中的任一者定义或列出的ISVD的人源化变体。特别地,这种人源化变体可以是原始ISVD的功能直系同源物,其中功能特征是上文广泛概述的功能特征(1)至(47)中的一者或多者。

[0243] 术语“野生型”或“天然型”是指从天然存在的来源分离的基因或基因产物。野生型基因是在群体中最常观察到的基因,因此将其任意设计为基因或基因产物的“正常”或“野生型”形式。相反,术语“修饰的”、“突变体”、“工程化的”或“变体”是指与野生型基因或基因产物相比,显示在序列修饰(诸如取代、突变或变异、缺失或添加)、翻译后修饰和/或生物学或功能特性修饰(即改变的特征)的基因或基因产物。值得注意的是,可以将天然存在的突变体或变体分离出来;与野生型基因或基因产物相比,这些突变体或变体的特征发生了改变,因此可以将其识别出来。改变的特征可以仅仅存在于序列水平,或者与野生型基因或基因产物相比,可以另外赋予突变体或变体改变的生物学和/或功能特性。应当理解,可以在蛋白质或多肽中引入保守的氨基酸取代,而这种取代对蛋白质的活性没有本质或实质的影响。优选的保守取代是那些满足可接受点突变标准的取代,该标准如Dayhofr等人,Atlas ofProtein Sequence and Structure,第5卷,第345-352页(1978&Supp.)中定义的,该文献

通过引用并入本文。保守取代的示例是包括但不限于下列组的取代：(a)缬氨酸、甘氨酸；(b)甘氨酸、丙氨酸；(c)缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；(d)天冬氨酸、谷氨酸；(e)天冬酰胺、谷氨酰胺；(f)丝氨酸、苏氨酸；(g)赖氨酸、精氨酸、蛋氨酸；和(h)苯丙氨酸、酪氨酸。所关注蛋白质的“一个同源物”或“多个同源物”涵盖相对于未修饰的(例如天然的、野生型)所关注蛋白质具有氨基酸取代、缺失和/或插入的蛋白质，并且与其所衍生自的未修饰蛋白质具有基本上或实质上相似的生物学和功能活性。

[0244] 通过在比较窗口内比较两个最佳比对的(氨基酸或核酸)序列，确定在两个序列中出现相同氨基酸残基或核苷酸残基的位置数以得出匹配位置数，将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数(即窗口大小)，并将结果乘以100以得到(氨基酸或核酸)序列同一性的百分比，从而计算“序列同一性的百分比”。

[0245] 免疫球蛋白单可变结构域诸如结构域抗体和Nanobody®(包括VHH结构域)可进行人源化，即增加与最接近的人种系序列的序列同一性程度。特别地，人源化免疫球蛋白单可变结构域，诸如Nanobody®(包括VHH结构域)可以是其中存在至少一个氨基酸残基(以及特别地，至少一个框架残基)的免疫球蛋白单可变结构域，该氨基酸残基是和/或对应于人源化取代(如本文进一步定义的)。通过将天然存在的VHH序列的框架区序列与一个或多个密切相关的人VH序列的对应框架序列进行比较，可确定潜在有用的人源化取代，之后可将如此确定的一个或多个潜在有用的人源化取代(或其组合)引入所述VHH序列中(以本身已知的任何方式，如本文进一步描述的)，并且可测试所得人源化VHH序列对靶标的亲和力、稳定性、表达的容易性和水平和/或其他期望的性质。以这种方式，通过有限程度的反复试验，本领域技术人员可确定其他合适的人源化取代(或其合适的组合)。此外，基于之前描述的内容，免疫球蛋白单可变结构域(诸如Nanobody®(包括VHH结构域))的(框架区)可以是部分人源化的或完全人源化的。

[0246] 人源化免疫球蛋白单可变结构域，具体地Nanobody®可具有若干优点，诸如与对应的天然存在的VHH结构域相比降低的免疫原性。人源化是指突变的，使得在人患者中施用后的免疫原性较小或不存在。应选择人源化取代，使得所得人源化的氨基酸序列和/或ISVD或VHH仍然保留亲代(非人源化)VHH的有利性质，诸如抗原结合能力。基于本文提供的描述，技术人员将能够选择人源化取代或人源化取代的合适组合，从而优化或实现一方面由人源化取代提供的有利性质和另一方面天然存在的VHH结构域的有利性质之间的期望或合适的平衡。这些方法是本领域技术人员已知的。人共有序列可用作人源化的靶序列，但其他方式也是本领域已知的。一个备选方案包括这样的方法，其中技术人员比对多个人种系等位基因，例如但不限于IGHV3等位基因的比对，以使用所述比对来鉴定靶序列中适于人源化的残基。此外，与靶序列最同源的人种系等位基因的子集可作为起始点进行比对以鉴定合适的人源化残基。另选地，分析VHH以鉴定其在人等位基因中最接近的同源物，并用于人源化构建体设计。应用于骆驼科动物VHH的人源化技术还可通过包括单独或组合地置换特定氨基酸的方法来进行。所述置换可基于从文献中已知的、来自已知的人源化努力的、以及来自与天然VHH序列相比的人共有序列或与所关注VHH序列最相似的人等位基因的内容来选择。从WO 08/020079的表A-5-A-8中给出的关于VHH熵和VHH变异性的数据可以看出，框架区中的一些氨基酸残基在人和骆驼科动物之间比其他氨基酸残基更保守。通常，尽管本发明在其最广泛的意义上不限于此，但是任何取代、缺失或插入(或添加)优选在不太保守的位置进

行。而且,通常氨基酸取代比氨基酸缺失或插入更优选。例如,类人类别的骆驼科动物单结构域抗体含有通常在人来源的或来自其他物种的常规抗体中发现的疏水性FR2残基,但是通过在位置103的其他取代(其取代来自双链抗体的VH中存在的保守色氨酸残基)来补偿这种亲水性的损失。因此,属于这两个类别的肽显示与人VH框架区的高度氨基酸序列同源性,并且所述肽可直接施用于人而不期望由此产生不需要的免疫应答,并且没有进一步人源化的负担。实际上,一些骆驼科动物VHH序列显示与人VH框架区的高序列同源性,因此所述VHH可直接施用于患者而不期望由此产生的免疫应答,并且没有额外的人源化负担或需要。

[0247] 合适的突变,具体地取代,可在人源化期间引入以产生与预先存在的抗体结合减少的多肽(参见例如WO2012/175741和WO2015/173325),例如在以下位置中的至少一个位置:11、13、14、15、40、41、42、82、82a、82b、83、84、85、87、88、89、103或108。本发明的氨基酸序列和/或VHH可在任何框架残基处被适当地人源化,例如在一个或多个标志残基(如下文所定义)处或在一个或多个其他框架残基(即非标志残基)处或它们的任何合适的组合处。根据用于表达本文所述氨基酸序列、ISVD或VHH或多肽的宿主生物体,还可以去除一个或多个翻译后修饰位点(诸如一个或多个糖基化位点)的方式设计此类缺失和/或取代,这将在本领域技术人员的能力范围内。另选地,可设计取代或插入以引入一个或多个用于连接官能团的位点(如本文所述),例如以允许位点特异性聚乙二醇化。

[0248] 在一些情况下,置换在位置37、44、45和/或47处具有亲水特性的典型骆驼科动物标志残基中的至少一者(参见WO2008/020079的表A-03)。人源化的另一个示例包括在以下位置中残基的取代:在FR1中,诸如位置1、5、11、14、16和/或28;在FR3中,诸如位置73、74、75、76、78、79、82b、83、84、93和/或94;以及在FR4中,诸如位置10 103、104、108和/或111(参见WO2008/020079的表A-05至表A08;所有编号均根据Kabat方法)。在具体实施方案中,人源化抗体(特别是人源化ISVD)包含根据Kabat编号在位置1、5、14、16、19、63、73、79、82c、83和/或优选108处残基的取代。在其他具体实施方案中,人源化抗体(特别是人源化ISVD)包含根据Kabat编号在位置1、5、14、16、19、63、73、79、83和/或优选108处残基的取代。人源化通常仅涉及FR中的取代、缺失或添加,而不涉及CDR中的取代、缺失或添加,因为这可能/将影响对靶标的结合亲和力和/或效力。

[0249] 本文所述的人源化ISVD的具体非限制性示例包括:

[0250] 人源化R3_DC23:

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWG

[0251] AGTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWY QDSRRYDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 127）

[0252] 人源化R3_C4:

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSG

[0253] GTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYR ASGLYDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 128）

[0254] 人源化R4_DC20:

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASIRWSG

[0255] GTTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYR NSGLYDYWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 129）

[0256] 在某些实施方案中,该抗体包含一种或多种如本文所述的ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式),其中一种或多种ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式)与Fc结构域结合或融合。

[0257] 如本文所用,“Fc结构域”是指常规抗体的片段可结晶区(Fc区),其是以下尾部区域,该尾部区域已知与称为Fc受体的细胞表面受体和补体系统的一些蛋白质相互作用。所述Fc结构域由两个相同的蛋白质片段组成,这些蛋白质片段源自抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域。所有常规抗体均包含Fc结构域,因此,Fc结构域可以是源自IgG、IgA和IgD抗体Fc区(甚至更具体地源自IgG1、IgG2或IgG4抗体Fc区)的Fc结构域或作为该抗体Fc区的变体。例如,IgG2的铰链区可由人IgG1的铰链置换,以产生ISVD融合构建体,并且反之亦然。此外,可使用具有已知半衰期延长的Fc变体,诸如M257Y/S259T/T261E

[0258] (也称为YTE)或LS变体(M428L与N434S组合)。这些突变增加了常规抗体的Fc结构域与新生儿受体(FcRn)的结合。优选地,可以使用人Fc结构域或人源化Fc结构域。人源化形式包括但不限于本领域已知的IgG人源化变体,诸如赖氨酸的C末端缺失、铰链区中的改变或截短、LALA(L234A和L235A)或LALAPG(L234A、L235A和P329G)突变以及IgG序列中的其他取代。

[0259] 如本文所用,术语“融合到”与“联结到”、“缀合到”、“连结到”可互换使用,在一个方面是指“基因融合”(例如通过重组DNA技术),以及“化学和/或酶促缀合”,使得两个核酸分子之间形成稳定的共价连接。这同样适用于术语“插入”,其中一个核酸的片段可通过遗传地、酶促地或化学地融合或连接两个序列而插入到第二个核酸分子中。肽或多肽同样可以融合或彼此联结,诸如通过肽键或通过将一个肽连接到第二个肽中的氨基酸侧链。

[0260] 接头可用于将ISVD(诸如本文中鉴定的ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式))融合至Fc结构域(诸如人IgG1 Fc结构域或其LS变体、或其YTE变体或IgG2 Fc结构域)。接头的非限制性示例包括Gly-Ser接头,诸如$(G_4S)_n$,其中n=1-6(SEQ ID NO:120),优选2-3(SEQ ID NO:121-122)。

[0261] 在某些实施方案中,包含一种或多种本文所述的ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式)的抗体处于“多价”和/或“多特异性”形式,通过例如化学或重组DNA技术将两种或更多种相同或变体单价ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式)结合在一起而形成。

[0262] 多价构建体的非限制性示例包括“二价”构建体、“三价”构建体、“四价”构建体等,分别包含两个、三个或四个ISVD。多价构建体中包含的ISVD可以相同或不同。如本文所用,术语“多特异性抗体”具体指其中两个或更多个ISVD中的至少一个ISVD具有不同特异性的多价抗体。多特异性构建体的非限制性示例包括“双特异性”构建体、“三特异性”构建体、“四特异性”构建体等。为了进一步说明这一点,本发明的任何多价和多特异性(如本文所定义)抗体可以针对两种或更多种不同的抗原,例如针对沙贝病毒和作为针对血清白蛋白或葡萄球菌蛋白A(SpA)半衰期延长的抗原和/或针对特定抗原的两个或更多个不同部分,例如针对沙贝病毒刺突蛋白的两个或更多个不同部分、区域、亚基或结构域。

[0263] 在具体实施方案中,抗体(特别是多价和/或多特异性抗体)可以包含一种或多种

结合剂,诸如本文所述的ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式),以及一种或多种能够结合至沙贝病毒刺突蛋白受体结合域(RBD)的结合剂,诸如ISVD。PCT/EP202I/052885、PCT/EP2022/052919和PCT/EP2022/062980中描述了能够结合至沙贝病毒刺突蛋白受体结合域(RBD)的ISVD的非限制性示例。有利地,在多价和/或多特异性抗体中,至少两种能够通过在刺突蛋白的两个不同区域(特别是S2亚基,更特别是HR2结构域和RBD)相互作用而结合沙贝病毒刺突蛋白的ISVD的组合可引起交叉反应以及有效抑制沙贝病毒的感染,并且可进一步降低逃逸突变病毒出现的风险。

[0264] 在某些进一步的实施方案中,能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的一种或多种ISVD能够结合或竞争VHH72表位(或VHH72特异性结合的表位)。VHH72表位已描述于Wrapp等人(2020,Cell 184:1004-1015;PCT/EP202I/052885和PCT/EP2022/062980)。本文定义的VHH72表位是指RBD中的构象表位,其包含如SEQ ID NO:86列出的氨基酸残基S371、S375、T376或C379中的至少一者或多者,或甚至更特别地,包含如SEQ ID NO:86列出的L368、Y369、S371、S375、T376、F377、K378、C379和Y508中的至少一者或多者,该SEQ ID NO:86是SARS-Cov-2刺突蛋白的序列。特别地,能够结合VHH72表位的ISVD能够特异性结合SARS-CoV-2刺突蛋白(SEQ ID NO:86),结合SEQ ID NO:86中所示SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸L368、Y369、S371、S375、T376、F377、K378、C379和Y508中的至少3者、至少4者、至少5者、至少6者、至少7者、至少8者、至少9者、至少10者、至少11者或全部。能够竞争VHH72表位的ISVD是指以下ISVD,该ISVD与VHH72竞争结合SEQ ID NO:86所示的刺突蛋白或RBD。“竞争”是指在能够竞争VHH72表位的ISVD存在下,VHH72与SEQ ID NO:86所示刺突蛋白或RBD的结合强度降低至少30%、或至少50%、或优选地至少80%。特别地,能够竞争VHH72表位或与VHH72竞争结合RBD表位的ISVD能够特异性结合至刺突蛋白上的表位,该表位包含如SEQ ID NO:86所示SARS-Cov-2刺突蛋白的残基L368、Y369、S371、S375、T376、F377、K378、C379和Y508中的至少三者、至少四者、至少五者、至少六者或更多,从而提供重叠表位。在实施方案中,能够结合或竞争VHH72表位的ISVD,其特征可以是:(i)它在与RBD相互作用时,竞争人受体(在SARS-CoV-1和SARS-CoV-2的情况下为ACE-2)结合,并且/或者(ii)不与能够结合或竞争本文定义的VHH3.117表位的ISVD竞争。能够结合或竞争VHH72表位的ISVD的非限制性示例包括VHH72家族成员(包括VHH72(SEQ ID NO:124)、VHH2.50、VHH3.17、VHH3.77、VHH3.115、VHH3.144和VHHBE4)及它们的变体,包括VHH72(S56A)及其人源化形式;VHH3.83家族成员(包括VHH3.83(本文中还称为VHH83)(SEQ ID NO:125))及其变体和人源化形式;VHH3.38家族成员及其变体和人源化形式;VHH3.55家族成员及其变体和人源化形式;VHH3.36家族成员及其变体和人源化形式;VHH3.149家族成员及其变体和人源化形式;以及VHH3.29家族成员及其变体和人源化形式,如PCT/EP202I/052885和PCT/EP2022/062980中所述。

[0265] 在具体实施方案中,抗体(特别是多价和/或多特异性抗体)可包含一种或多种如本文所述的ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式),以及包含SEQ ID NO:125或SEQ ID NO:124中存在的CDR的ISVD(诸如包含SEQ ID NO:125列出的序列或由其组成的ISVD(例如VHH83)或包含SEQ ID NO:124列出的序列或由其组成的ISVD(例如VHH72))或其变体或人源化形式,其中CDR根据Kabat、Martin、MacCallum、IMGT、AbM或Chothia进行注释。

[0266] 在某些进一步实施方案中,能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的一个或多个ISVD能够结合或竞争VHH3.117表位(或VHH3.117特异性结合的表位)。VHH3.117表位已描述于PCT/

EP2022/052919。特别地,能够结合至VHH3.117表位的ISVD能够结合或特异性结合至SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸Asn394(或在一些沙贝病毒中为Ser394)、Tyr396、Phe464、Ser514、Glu516和Arg355中的至少一者,或以递增的优选顺序结合其中的至少两者、至少三者或至少四者,并且可选地能够进一步结合或特异性结合至氨基酸Arg357(或在一些沙贝病毒中为Lys357)和/或Lys462(或在一些沙贝病毒中为Arg462)和/或Glu465(或在一些沙贝病毒中为Gly465)和/或Arg466和/或Leu518,诸如能够进一步结合或特异性结合至氨基酸Arg357(或在一些沙贝病毒中为Lys357)和/或Lys462(或在一些沙贝病毒中为Arg462)和/或Glu465(或在一些沙贝病毒中为Gly465)和/或Arg466和/或Leu518中的至少两者,或以递增的优选顺序结合其中的至少三者或全部四者。能够竞争VHH3.117表位的ISVD是指以下ISVD,该ISVD与VHH3.117竞争结合SEQ ID NO:86所示的刺突蛋白或RBD。"竞争"是指在能够竞争VHH3.117表位的ISVD存在下,VHH3.117与SEQ ID NO:86所示刺突蛋白的结合强度降低至少30%、或至少50%或优选地至少80%。在实施方案中,能够结合或竞争VHH3.117表位的ISVD,其特征可以是:(i)它不抑制RBD与人受体(在SARS-CoV-1和SARS-CoV-2的情况下为ACE-2)的结合,这意味着当ISVD本身与沙贝病毒RBD结合时,它允许受体与沙贝病毒RBD结合,或者,ISVD本身可以与受体所结合的沙贝病毒RBD结合,并且/或者(ii)不与能够结合或竞争本文定义的VHH72表位的ISVD竞争。能够结合或竞争VHH3.117表位的ISVD的非限制性示例包括VHH3.117家族成员(包括VHH3.117、3.42、3.92、3.94、3.180)及其变体和人源化形式(如PCT/EP2022/052919中所述);VHH3.89家族成员及其变体和人源化形式(如PCT/EP2021/052885中所述);VHH3_183家族成员及其变体和人源化形式;以及VHH3C_80家族成员及其变体和人源化形式(如PCT/EP2022/062980中所述)。

[0267] 在具体实施方案中,抗体(特别是多价和/或多特异性抗体)可包含一种或多种如本文所述的ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式),以及包含SEQ ID NO:127中存在的CDR的ISVD(诸如包含SEQ ID NO:127列出的序列或由其组成的ISVD(例如VHH3.117)),或其变体或人源化形式,其中CDR根据Kabat、Martin、MacCallum、IMGT、AbM或Chothia进行注释。

[0268] 在其他更进一步的实施方案中,抗体(特别是多价和/或多特异性抗体)包含多于一个能够结合沙贝病毒刺突蛋白受体结合域(RBD)的ISVD,其中至少一个ISVD能够结合或竞争如本文定义的VHH72表位,并且其中至少一个ISVD能够结合或竞争如本文定义的VHH3.117表位。有利地,抗体中至少两个非竞争性靶向RBD的ISVD(能够通过在RBD的两个非竞争性不同区域相互作用结合刺突蛋白的RBD)和至少一个靶向S2的ISVD的组合可引起交叉反应以及有效抑制沙贝病毒感染,这有利地允许进一步降低突变逃逸的风险。

[0269] 在具体实施方案中,抗体(特别是多价和/或多特异性抗体)可包含一种或多种如本文所述的ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式);以及包含SEQ ID NO:125或SEQ ID NO:124中存在的CDR的ISVD,诸如包含SEQ ID NO:125列出的序列或由其组成的ISVD(例如VHH83)或包含SEQ ID NO:124列出的序列或由其组成的ISVD(例如VHH72),或其变体或人源化形式;以及包含SEQ ID NO:126中存在的CDR的ISVD,诸如包含SEQ ID NO:126列出的序列或由其组成的ISVD(例如VHH3.117)),或其变体或人源化形式,其中CDR根据Kabat、Martin、MacCallum、IMGT、AbM或Chothia进行注释。

[0270] 本文所述的多价抗体可例如通过诸如化学方式或重组DNA技术直接连接或通过接头连接两个或更多个ISVD,以及/或者通过将两个或更多个ISVD(每一者)与Fc结构域融合来形成。

[0271] 例如,本文所述的单个ISVD(或其变体或人源化形式)可在其C末端与Fc结构域(诸如IgG Fc结构域)融合(诸如包含SEQ ID NO:96或SEQ ID NO:118中定义的氨基酸序列的构建体),从而产生二价形式的沙贝病毒抗体,其中两个所述ISVD通过Fc部分(诸如IgG Fc部分)的铰链区中的二硫桥形成仅有重链的抗体类型分子。

[0272] 在具体实施方案中,本文所述的一种或多种ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式)直接或通过接头连接、融合或联结至能够结合本文定义的沙贝病毒刺突蛋白的一种或多种ISVD。用于连接ISVD的合适接头的非限制性示例包括肽接头,诸如$(G_4S)_n$,其中n=1、2、3、4、5或6。此类多特异性结合剂在本文中还可称为“头尾融合体”。

[0273] 在进一步的实施方案中,如本文所述头尾融合体的C末端可例如通过接头与Fc结构域融合,该构建体在宿主中表达后,通过Fc部分铰链区中的二硫桥形成多价和/或多特异性抗体。因此,在具体实施方案中,本文所述的一种或多种ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式)直接或通过接头连接、融合或联结至能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的一种或多种ISVD,以形成多特异性结合剂或构建体,并且所述多特异性结合剂或构建体与Fc结构域融合。在优选实施方案中,抗体包含与Fc结构域融合的双特异性结合剂或构建体,其中所述双特异性结合剂或构建体包含一种如本文所述的ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式),该ISVD直接或通过接头连接、融合或联结至一种能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的ISVD,诸如能够结合或竞争本文所述VHH3.117表位的ISVD。图33A至图33C中示出了此类多特异性抗体(特别是双特异性抗体(本文中还称为“VHH-VHH-Fc融合体”))的示意图。本文提供了此类多特异性抗体(特别是双特异性抗体)(其能够结合本文所述的HR2结合位点和VHH3.117表位)的更具体示例,例如但不限于SEQ ID NO:112-114,或它们的任何功能变体,或它们的具有至少90%同一性的变体,或它们的人源化形式。SEQ ID NO:112-114定义的序列也如下所示。

[0274] SEQ ID NO:112

[0275] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWG

AGTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWY

QDSRRYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGK

AVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLEMNSL

RPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPC

[0276] PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE

PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF

FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

[0277] SEQ ID NO:113

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWG
AGTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWY
QDSRRYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGS
LRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKN

[0278] TVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

[0279] SEQ ID NO:114

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWG
AGTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWY
QDSRRYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVES
GGGLVQPGGSLRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKG
RFTISRDNTKNTVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVS

[0280] SGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLS
LSPG

[0281] 在具体实施方案中,该抗体包含与Fc结构域融合的三特异性结合剂或构建体,其中所述三特异性结合剂或构建体包含本文所述的一种ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式)、本文所述的一种能够结合或竞争本文所述VHH3.117表位的ISVD、以及本文所述的一种能够结合或竞争VHH72表位的ISVD,其中所述ISVD以任何顺序彼此直接或通过接头连接、融合或联结。图33F中描绘了此类多特异性抗体(特别是三特异性抗体(在本文中还称为“VHH-VHH-VHH-Fc融合体”))的示意图。本文提供了此类多特异性抗体(特别是三特异性抗体)(其能够结合本文所述的HR2结合位点以及VHH3.117和VHH72表位)的更具体示例,例如但不限于SEQ ID NO:117,或其任何功能变体,或其具有至少90%同一性的变体,或其人源化形式。SEQ ID NO:117定义的序列还如下所示。

[0282] SEQ ID NO:117

[0283] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWG
AGTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWY
QDSRRYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGS
LRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKN
TVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCVLSGGVFTSYAMGWFRQAPGKERE
FLAAITFNSDATYYADSVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLRPEDTAVYSCAAGGNHYN
PQYYHDYDKYDHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG

[0284] 在其他具体实施方案中,本文所述的一种或多种ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式)与Fc结构域的N末端融合,并且能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的一种或多种ISVD与Fc结构域的C末端融合,或者本文所述的一种或多种ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式)与Fc结构域的C末端融合,并且能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的一种或多种ISVD与Fc结构域的N末端融合。在优选实施方案中,该抗体包含一种与Fc结构域N末端融合的如本文所述的ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式),以及一种能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的ISVD,特别是一种能够结合或竞争如本文所述的VHH3.117表位的ISVD,该ISVD与Fc结构域的C末端融合;或者该抗体包含一种与Fc结构域C末端融合的如本文所述的ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式),以及一种能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的ISVD,特别是一种能够结合或竞争如本文所述的VHH3.117表位的ISVD,该ISVD与Fc结构域的N末端融合。图33D中描绘了此类多特异性抗体(本文还称为“VHH-Fc-VHH融合体”或“moonlander”)的示意图。本文提供了此类多特异性抗体(特别是双特异性抗体)(其能够结合本文所述的HR2结合位点以及VHH3.117表位)的更具体示例,例如但不限于SEQ ID NO:115,或其任何功能变体,或其具有至少90%同一性的变体,或其人源化变体。SEQ ID NO:115定义的序列还如下所示。

[0285] SEQ ID NO:115

[0286] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWG
AGTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWY
QDSRRYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTV
YLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVSS

[0287] 本文所述的多价或多特异性抗体可具有(或经工程改造和/或选择用于)对所需沙贝病毒相互作用和/或对任何其他所需性质或所需性质的组合而言增加的亲合力和/或改善的选择性,这些性质可通过使用此类多价或多特异性抗体而获得。

[0288] 在具体实施方案中,结合剂(特别是本文所述的多价和/或多特异性抗体,更特别是包含本文所述Fc结构域的多价和/或多特异性抗体)具有细胞介导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。更特别地,结合剂(特别是本文所述的多价和/或多特异性抗体,更特别是包含本文所述Fc结构域的多价和/或多特异性抗体)能够诱导靶细胞表达沙贝病毒刺突蛋白的ADCC。"细胞介导的抗体依赖性细胞毒性"或"ADCC"是指抗体结合某些细胞毒性细胞(诸如NK细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)的一种细胞毒性形式。Fc γ 受体上Ig的分泌使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞,然后使用例如细胞毒素杀死靶细胞。为了评估所关注抗体的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,例如本申请实施例中描述的方法。

[0289] 本文还公开了其他沙贝病毒结合剂,其与由选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10的氨基酸序列定义的ISVD竞争结合沙贝病毒刺突蛋白或其部分(如上所述)。

[0290] 如本文所用,术语"竞争"或"交叉竞争"是指以下化合物或结合剂,其具有结合抗原特定区域,以及抑制或阻断另一种结合剂的结合的能力。在本领域技术人员已知的竞争性结合测定中,本公开"竞争性"或"交叉竞争性"的化合物或结合剂具有干扰本文所述抗体或抗原结合片段结合,特别是干扰由选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10的氨基酸序列定义的ISVD结合的能力。该术语还包括两种抗体或抗原结合片段之间在两个方向上的竞争,即第一抗体结合并阻断第二抗体的结合,反之亦然。在某些实施方案中,第一抗原结合剂(例如,抗体或抗原结合片段)和第二抗原结合剂(例如,抗体或抗原结合片段)可结合至相同表位。另选地,第一和第二抗原结合剂(例如,抗体或抗原结合片段)可结合不同的但例如重叠的表位,其中一个表位的结合会抑制或阻断第二抗体或抗原结合片段的结合,例如通过空间位阻。抗原结合剂(例如抗体或抗原结合片段)之间的竞争可通过本领域已知的方法来测量,例如通过ELISA(酶联免疫吸附测定)或通过表面等离子体共振(SPR)来测量。在竞争结合剂存在下,如果以下结合的强度降低至少30%,或至少50%,或优选至少80%,则可能存在竞争或交叉竞争,该结合为:由选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10的氨基酸序列定义的ISVD与沙贝病毒刺突蛋白(诸如由SEQ ID NO:86列出的氨基酸序列组成的SARS-CoV-2刺突蛋白或由SEQ ID NO:111列出的氨基酸序列组成的SARS-CoV-1刺突蛋白或它们的部分)的结合,特别是与SARS-CoV-2 S2亚基或SARS-CoV-1 S2亚基或它们的部分的结合,更特别是与SEQ ID NO:87中所示SARS-CoV-1/SARS-CoV-2HR2结构域的结合。特别地,此类其他结合剂理想地保留了上文广泛概述的功能特征(1)至(47)中的一个或多个功能特征。

[0291] 因此,本公开还涉及以下方法:筛选结合沙贝病毒刺突蛋白(特别是沙贝病毒刺突蛋白S2亚基,更特别是沙贝病毒刺突蛋白中沙贝病毒HR2结构域)的化合物,以及与本文所述ISVD或其功能部分(或其变体或人源化形式)竞争结合沙贝病毒刺突蛋白(特别是沙贝病毒S2亚基,更特别是沙贝病毒HR2结构域)的化合物。此类方法通常包括以下步骤中的一个或多个步骤:

[0292] -提供一种化合物或化合物池;

[0293] -在不存在本文所述的ISVD或其功能部分(或其变体或人源化形式)的情况下,使

该化合物或化合物池与沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域接触；

[0294] -在存在本文所述的ISVD或其功能部分(或其变体或人源化形式)的情况下,使该化合物或化合物池与沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域接触；

[0295] -测量、评估、测定、分析该化合物或化合物池是否能够减少结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的ISVD或其功能部分的量;或者测量、评估、测定、分析该ISVD或其功能部分是否能够减少结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的化合物或化合物池的量；

[0296] -在化合物存在下,当ISVD或其功能部分结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的量减少时,将该化合物鉴定为ISVD或其功能部分结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的竞争者;或者在一种或多种化合物存在下,当ISVD或其功能部分结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的量减少时,将该包含一种或多种化合物的化合物池鉴定为ISVD或其功能部分结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的竞争者;或者在ISVD或其功能部分存在下,当化合物结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的量减少时,将该化合物鉴定为ISVD或其功能部分结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的竞争者;或者在ISVD或其功能部分存在下,当化合物池结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的量减少时,将该包含一种或多种化合物的化合物池鉴定为ISVD或其功能部分结合沙贝病毒刺突蛋白或沙贝病毒S2亚基或沙贝病毒HR2结构域的竞争者。

[0297] 如本文所用,术语“化合物”或“测试化合物”或“候选化合物”或“药物候选化合物”描述任何天然存在的或合成的分子,该分子被设计、鉴定、筛选或生成,并且可在测定(诸如筛选测定或药物发现测定)中进行测试,或特别是在用于鉴定以下化合物的方法中进行测试,该化合物与本文所述ISVD(或本文所述的其变体或人源化形式)竞争结合沙贝病毒刺突蛋白或其部分(如上所述)。因此,这些化合物包括有机化合物和无机化合物。为了实现高通量目的,可使用测试化合物库,诸如提供足够多样性范围的组合库或随机库。示例包括但不限于天然化合物库、变构化合物库、肽库、抗体片段库、合成化合物库、基于片段的库、噬菌体展示库等。此类化合物还可称为结合剂;如本文指出,它们可以是“小分子”,其是指低分子量(例如,<900Da或<500Da)的有机化合物。化合物或结合剂还包括具有低分子量特征的化学物质、多核苷酸、脂质或激素类似物。其他生物聚合物有机测试化合物包括包含约2个至约40个氨基酸的小肽或肽样分子(肽模拟物),以及包含约40个至约500个氨基酸的较大多肽,诸如抗体、抗体模拟物、抗体片段或抗体缀合物。

[0298] 如本文所用,术语“测定”、“测量”、“评估”、“鉴定”、“筛选”和“分析”可互换使用,并且包括定量和定性测定。

[0299] 在又一个方面,本发明提供了核酸分子诸如分离的核酸、(分离的)嵌合基因构建体、表达盒,其包含多核苷酸序列诸如编码序列,该编码序列编码多肽或多肽沙贝病毒结合剂的多肽部分,特别是本文所鉴定的抗体或抗体片段,更特别是如本文所述的ISVD(或其变体或人源化形式),或其功能部分。

[0300] 如本文所用,“核酸”或“核酸分子”是指任何长度的核苷酸的聚合形式,为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸;核苷酸的顺序线性排列在一起产生/形成“核苷酸序列”、“DNA序

列”或“RNA序列”。该术语仅指分子的一级结构。因此,该术语包括双链和单链DNA,以及RNA。它还包括已知类型的修饰,例如甲基化、“帽”以及用类似物对一种或多种天然存在的核苷酸进行取代。可在一个或多个水平上引入对核酸的修饰:磷酸键修饰(例如,引入一个或多个磷酸二酯键、氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键)、糖修饰(例如,引入一个或多个LNA(锁核酸)、2′-O-甲基、2′-O-甲氧基乙基、2′-氟、S-约束的乙基或三环-DNA)和/或非核糖修饰(例如,引入一个或多个磷酸二酰胺吗啉或肽核酸)。

[0301] “核酸构建体”是指已被构建为包含在自然界中未同时发现的一个或多个功能单元,因此具有在自然界中未发现的核苷酸序列(非天然核苷酸序列)的核酸分子。示例包括环状、线性、双链、染色体外DNA分子(质粒)、粘粒(含有来自λ噬菌体的COS序列的质粒)、包含非天然核酸序列的病毒基因组等。

[0302] “编码序列”是核苷酸序列,当置于适当的(基因)调节序列的控制下时,其可被转录成mRNA和/或翻译成多肽。编码序列的边界由5′末端的翻译起始密码子和3′末端的翻译终止密码子确定。编码序列可包括但不限于mRNA、cDNA、重组核苷酸序列或基因组DNA,而在某些情况下也可存在内含子。

[0303] “嵌合基因”或“嵌合构建体”或“嵌合基因构建体”可互换地表示重组核酸序列,其中(基因)启动子或调节核酸序列与编码RNA(例如,编码序列、shRNA等)的所关注核酸序列可操作地或有效连接或相关联,使得调节核酸序列能够调节所关注核酸的转录或表达。在自然界中未发现

[0304] 嵌合基因中调节核酸序列和所关注核酸序列之间的可操作或有效连接。

[0305] “表达盒”包含能够指导所关注基因/编码序列表达的任何核酸构建体,其与(基因)启动子可操作地连接。表达盒通常是DNA构建体,优选包括(转录方向为5′至3′):(基因)启动子区、具有转录起始区的所关注多核苷酸序列,以及包括RNA聚合酶终止信号和聚腺苷酸化信号的终止序列;所有这些元件都是可操作地或有效连接的,这意味着当转化为诸如原核生物(例如细菌)或真核生物(例如哺乳动物、酵母、昆虫、真菌、植物、藻类)的细胞时,所有这些区域都应该能够在该细胞中操作(表达)。包含转录起始区(优选包括RNA聚合酶结合位点)和聚腺苷酸化信号的启动子区可对于待转化的细胞是天然的,可以源自替代来源,或者可以是合成的,只要它在该细胞中有功能即可。此类表达盒可在例如“载体”或“表达载体”(线性或环状核酸、质粒、粘粒、病毒载体、噬菌粒等)中构建。

[0306] 本发明还提供了包含插入其中的上述核酸分子的载体。

[0307] 如本文所用,术语“载体”、“载体构建体”、“表达载体”、“重组载体”或“基因转移载体”旨在指代能够携带与其连接的另一核酸分子的核酸分子。

[0308] 所述载体可包括克隆或表达载体,以及递送载体诸如病毒、慢病毒或腺病毒载体。表达载体可包括质粒以及病毒载体,并且通常包含在特定宿主生物体(例如,细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物)中或在体外表达系统中表达可操作连接的编码序列所必需的所需编码序列和适当的DNA序列。特别地,如本文所述的表达载体可包含如本文所述的核酸分子,该核酸分子包含编码如本文所述的抗体或抗原结合片段的核酸序列,该核酸序列可操作地连接到至少一个调节序列。调节序列被选择用于指导所关注蛋白质(特别是抗体或抗原结合片段)在合适宿主细胞中的表达,并且包括启动子、增强子和本领域技术人员已知的其他表达控制元件。因此,在实施方案中,载体包括用于驱动所关注核酸的表达的启动子,可选

地编码分泌抗体或抗原结合片段的信号肽的核酸序列,以及可选地编码终止子的核酸序列。当在生产菌株或细胞系中操作表达载体时,该载体在引入宿主细胞时可能会或可能不会整合到宿主细胞的基因组中。克隆载体通常用于工程化和扩增某个所需的DNA片段。因此,克隆载体可能包含与克隆载体指定的细胞类型相匹配的复制起点,并且可能缺乏表达所需DNA片段所需的功能序列。优选地,该载体包含一个或多个选择性标记。选择性标记的选择可取决于所选择的宿主细胞,尽管这对于本发明来说并不重要,这是本领域技术人员所熟知的。用于转染细胞的表达载体的构建也是本领域所熟知的,因此可通过标准技术来实现(参见,例如,Sambrook、Fritsch和Maniatis,载于:Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989;Gene Transfer and Expression Protocols,第109-128页,E.J.Murray编辑,The Humana Press Inc.,Clifton,N.J.)和Ambion 1998目录(Ambion,Austin,Tex.)。

[0309] 更特别地,所述载体可包括本领域技术人员已知的任何载体,包括任何合适的类型,但不限于,例如质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体(诸如λ噬菌体)、病毒载体(甚至更具体地是慢病毒、腺病毒、AAV或杆状病毒载体)或人工染色体载体(诸如细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)或P1人工染色体(PAC)。载体的选择可尤其取决于所选宿主细胞的性质。

[0310] 本发明的另一个方面提供了包含抗体或其抗原结合片段的宿主细胞,诸如如本文所述的抗体或抗原结合片段的ISVD(或其变体或人源化形式)或其部分。因此,宿主细胞可包含编码所述抗体或抗原结合片段的核酸分子。宿主细胞可以是原核或真核的。宿主细胞也可以是重组宿主细胞,该重组宿主细胞包含已经遗传修饰以含有编码本发明的抗体或抗原结合片段的分离的核酸分子的细胞。可用于产生所述抗体或抗原结合片段诸如ISVD的代表性宿主细胞包括但不限于细菌细胞、酵母细胞、植物细胞和动物细胞。适合产生本发明的抗体或抗原结合片段的细菌宿主细胞包括埃希氏杆菌属(Escherichia spp.)细胞、芽孢杆菌属(Bacillus spp.)细胞、链霉菌属(Streptomyces spp.)细胞、欧文氏菌属(Erwinia spp.)细胞、克雷伯氏菌属(Klebsiella spp.)细胞、沙雷氏菌属(Serratia spp.)细胞、假单胞菌属(Pseudomonasspp.)细胞和沙门氏菌属(Salmonella spp.)细胞。适合用于本发明的酵母宿主细胞包括酵母属(Saccharomyces)、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)、毕赤酵母属(Pichia)(例如巴斯德毕赤酵母(Pichiapastoris))、汉逊酵母属(Hansenula)(例如多形汉逊酵母(Hansenulapolymorpha))、亚罗酵母属(Yarowia)、许旺酵母属(Schwaniomyces)、裂殖酵母属、接合酵母属(Zygosaccharomyces)等内的物种。酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、卡尔斯伯酵母(S.carlsbergensis)和乳酸克鲁维酵母(K.lactis)是最常用的酵母宿主,并且是方便的真菌宿主。适合用于本发明的动物宿主细胞包括昆虫细胞和哺乳动物细胞(例如,源自中国仓鼠(例如CHO)和人细胞系(诸如HeLa))。示例性昆虫细胞系包括但不限于Sf9细胞、杆状病毒-昆虫细胞系统(例如综述Jarvis,Virology,第310卷第1期,2003年5月25日,第1-7页)。另选地,宿主细胞也可以是转基因动物或植物。

[0311] 将载体引入宿主细胞可通过例如磷酸钙转染、病毒感染、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体转染或电穿孔来实现,并且本领域的任何技术人员可选择并使用适合于所用表达载体和宿主细胞的引入方法。

[0312] 本发明的另一方面涉及包含结合剂的组合物,诸如抗体或其抗原结合片段,包含如本文所述的一种或多种ISVD(或其变体或人源化形式)或其部分。如本文所用,“组合物”是指存在于配制物中的一种或多种分子的组合,该配制物保留了结合剂活性,特别是在这种情况下的HR2(或S2)结合和沙贝病毒中和活性,因此是功能性组合物。因此,该组合物包含一种或多种分子,该一种或多种分子构成如本文所述的一种或多种结合剂,该一种或多种结合剂通过与其HR2结构域(靶向S2的结合剂或靶向HR2结构域的结合剂)相互作用而特异性结合沙贝病毒刺突蛋白。在具体实施方案中,该组合物可包含二价抗体,该二价抗体包含与Fc结构域融合的如本文所述的ISVD(或其变体或人源化形式),诸如结合剂,特别是包含SEQ ID NO:118所定义的氨基酸序列的抗体。所述组合物可以是可溶性组合物或固体组合物。

[0313] 除了所述靶向S2、特别是靶向HR2结构域的结合剂分子之外,该组合物可进一步包含,例如但不限于缓冲组分、佐剂或附加分子,其可以是功能性分子。

[0314] 在具体实施方案中,该组合物可进一步包含一种或多种能够与如本文其他地方所述的沙贝病毒刺突蛋白受体结合域(RBD)结合的结合剂。在具体实施方案中,该组合物可进一步包含一种或多种结合剂诸如抗体或其抗原结合片段,该一种或多种结合剂包含一种或多种(诸如两种、三种、四种或更多种)能够与如本文其他地方所述的沙贝病毒刺突蛋白受体结合域(RBD)结合的ISVD(或其变体或人源化形式)。因此,所述组合物可包含至少两种结合剂,其特征在于,一种结合剂特异性结合HR2结构域,第二种结合剂特异性结合RBD区域,从而产生具有至少两种结合剂的组合物,该至少两种结合剂以非竞争性方式结合刺突蛋白,可能同时结合。

[0315] 在优选实施方案中,能够结合沙贝病毒刺突蛋白RBD的结合剂能够结合RBD的两个非竞争性结合位点,优选通过所述结合剂中存在的两种不同的ISVD,其中所述结合剂可以是双特异性结合剂或多特异性结合剂。更特别地,该结合剂可包含一种或多种能够与如本文所定义的VHH72表位结合或竞争的ISVD,以及一种或多种能够与如本文所定义的VHH3.117表位结合或竞争的ISVD。PCT/EP2022/062980中描述了包含一种或多种能够与VHH72表位结合或竞争的ISVD,以及一种或多种能够与VHH3.117表位结合或竞争的ISVD的结合剂的非限制性示例。

[0316] 在具体实施方案中,该组合物可包含(i)结合剂(特别是抗体或其抗原结合片段),包含一种或多种包含SEQ ID NO:8中存在的CDR的ISVD,诸如一种或多种包含SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列或由其组成的ISVD(例如,VHHR3_DC23)或其变体或人源化形式;和(ii)结合剂(特别是抗体或其抗原结合片段),包含一种或多种包含SEQ ID NO:125或SEQ ID NO:124中存在的CDR的ISVD,诸如包含SEQ ID NO:125列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH83)或SEQ ID NO:124列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH72)或其变体或人源化形式,以及包含SEQ ID NO:126中存在的CDR的ISVD,诸如包含SEQ ID NO:126列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH3.117)或其变体或人源化形式,其中CDR根据Kabat、Martin、MacCallum、IMGT、AbM或Chothia进行注释。在进一步的具体实施方案中,该组合物可包含(i)结合剂,特别是(二价)抗体,包含:包含SEQ ID NO:8中存在的CDR的ISVD,诸如与Fc结构域融合的包含SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列或由其组成的ISVD(例如,VHHR3_DC23)或其变体或人源化形式,诸如包含SEQ ID NO:118列出的氨基酸序列的抗体;和(ii)结合剂,特

别是双特异性抗体,包含:包含SEQ ID NO:126中存在的CDR的ISVD,诸如与本文所定义的Fc结构域的N末端融合的包含SEQ ID NO:126列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH3.117)或其变体或人源化形式,以及包含SEQ ID NO:125或SEQ ID NO:124中存在的CDR的ISVD,诸如与Fc结构域的N末端融合的包含SEQ ID NO:125列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH83)或包含SEQ ID NO:124列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH72)或其变体或人源化形式;或者包含SEQ ID NO:126中存在的CDR的ISVD,诸如可与Fc结构域的N末端融合的包含SEQ ID NO:126列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH3.117)或其变体或人源化形式,以及包含SEQ ID NO:125或SEQ ID NO:124中存在的CDR的ISVD,诸如可与Fc结构域的C末端融合的包含SEQ ID NO:125列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH83)或包含SEQ ID NO:124列出的序列或由其组成的ISVD(例如,VHH72)或其变体或人源化形式,其中CDR根据Kabat、Martin、MacCallum、IMGT、AbM或Chothia进行注释。在更进一步的具体实施方案中,双特异性抗体(ii)包含由SEQ ID NO:119列出的氨基酸序列、或其任何功能变体、或与其具有至少90%同一性的变体、或其人源化变体,或由其组成。

[0317] 在实施方案中,如本文所述的(靶向S2)结合剂(诸如包含一种或多种ISVD(或其变体或人源化形式)或其部分的抗体或其抗原结合片段)与组合物中的能够与沙贝病毒刺突蛋白受体结合域(RBD)的(靶向S1)结合剂(诸如包含一种或多种ISVD(或其变体或人源化形式)结合的抗体或其抗原结合片段)的分子比可在3:1至1:3、优选2:1至1:2的范围内,更优选分子比为约1:1。

[0318] 此外,所述组合物还可包含另外的结合剂或分子,其可选地结合刺突蛋白或其他病毒蛋白的相同或不同表位上的另外的结合区,或甚至可靶向完全不相关的靶蛋白。

[0319] 本发明的另一方面涉及如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸和/或包含该核酸的(重组)载体的药物或药物组合物,和/或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物。特别地,药物组合物是药学上可接受的组合物;此类组合物优选还包含(药学上)合适的或可接受的载剂、稀释剂、佐剂、赋形剂、稳定剂等。

[0320] "药学上可接受的"是指不是生物学上或其他方面不期望的物质,即该物质可与化合物(特别地沙贝病毒结合剂,更特别地沙贝病毒抗体或抗原结合片段)一起施用于个体,而不会引起任何不期望的生物学效应或以有害的方式与含有该物质的药物组合物的任何其他组分相互作用。药学上可接受的载剂优选是在与活性成分的有效活性一致的浓度下对患者相对无毒无害的载剂,以便由载剂引起的任何副作用不会损害活性成分的有益效果。合适的载剂或佐剂通常包含一种或多种包括在以下非穷举列表中的化合物:大的缓慢代谢的大分子,诸如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和无活性的病毒颗粒。如本文所用,术语"赋形剂"旨在包括可能存在于药物组合物中并且不是活性成分但可能有助于例如活性成分的长期稳定性或治疗增强(例如,通过促进药物吸收、降低粘度或增强溶解度)的所有物质。赋形剂可包括例如盐、粘合剂(例如,乳糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、山梨醇、甘露醇)、润滑剂、增稠剂、表面活性剂、防腐剂、乳化剂、缓冲物质、稳定剂、调味剂或着色剂。"稀释剂",诸如特别地"药学上可接受的稀释剂",包括溶媒诸如水、盐水、生理盐溶液、甘油、乙醇等。在此类溶媒中可包括辅助物质诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质、防腐剂。

[0321] 本发明的结合剂(特别地抗体或抗原结合片段)的药学有效量优选为对所治疗的

特定病症产生结果或施加影响的量。

[0322] 本发明的药物组合物可冻干储存,并在使用前在合适的载剂中重构。当制备为冻干物或液体时,需要向本发明的药物组合物中加入生理学上可接受的载剂、赋形剂、稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第22版,Allen编辑,Loyd V,Jr.(2012)。含有本发明的药物组合物的制剂应在注射前灭菌。该程序可在冻干和重构之前或之后使用无菌过滤膜进行。药物组合物可被包装在具有无菌进入口的容器或小瓶中,例如带有橡胶塞的静脉注射溶液瓶-药物组合物可以液体形式存在,或者容器或小瓶填充有液体药物组合物,随后将其冻干或干燥;或者可被包装在预填充注射器中。

[0323] 本发明的另一方面涉及用作药物或药剂的如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的载体,如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物,或如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的(重组)载体和/或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物的药物组合物。另选地,设想了如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的载体,或如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物在制造药物或药剂中的用途,或如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的载体和/或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物的药物组合物在制造药物或药剂中的用途。

[0324] 特别地,如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的载体或包含该结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物,或如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的(重组)载体和/或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物的药物或药物组合物用于被动免疫、用于治疗患有沙贝病毒感染的受试者、用于预防受试者感染沙贝病毒或用于保护受试者免受沙贝病毒感染。

[0325] 当用于被动免疫时,受试者可能感染了沙贝病毒(治疗性被动免疫)或可能没有感染沙贝病毒(预防性被动免疫)。

[0326] 相关方面涉及用于治疗患有/感染/已感染沙贝病毒的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的(重组)载体、或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物,或包括向受试者施用如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的(重组)载体和/或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物的药物或药物组合物。

[0327] 本发明的另一方面涉及保护受试者免受沙贝病毒感染或预防受试者感染沙贝病毒的方法,所述方法包括在感染之前向受试者施用如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的(重组)载体、或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物,或包括在感染之前向受试者施用如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的(重组)载体和/或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物的药物或药物组合物。

[0328] 在上述医学方面,如本文所述的编码结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的核酸

或包含此类核酸的(重组)载体可用于例如基因治疗环境。如本文所用,“基因治疗”是指通过向受试者施用表达的或可表达的核酸进行的治疗。对于此类应用,如本文所述的核酸分子或载体允许在细胞内产生结合剂、抗体或抗体片段。本领域中有大量的基因治疗方法,包括例如(腺相关)病毒介导的基因沉默或病毒介导的基因治疗(例如,US 20040023390;Mendell等人,2017,N Eng J Med377:1713-1722)。本领域技术人员熟知多种递送方法,包括但不限于病毒递送系统、DNA质粒的显微注射、裸核酸的基因枪法、脂质体或人工外泌体的使用、配制在纳米颗粒或脂质或含脂质颗粒中的核酸或载体的施用。对个体患者施用的体内递送通常采用全身施用(例如,静脉内、腹腔内输注或脑注射;例如,Mendell等人,2017,N Eng J Med 377:1713-1722)。

[0329] “治疗活性剂”通常是指在疾病治疗的情况下具有或可具有治疗效果(即治疗或预防效果)的任何分子。优选地,治疗活性剂是疾病调节剂,其可以是细胞毒性剂诸如毒素,或细胞毒性药物,或能够将前药转化为细胞毒性药物的酶,或放射性核素,或细胞毒性细胞,或其可以是非细胞毒性剂。甚至更优选地,治疗活性剂对疾病具有治疗效果。本发明的结合剂(特别是抗体或抗体片段)或药物组合物,在有利于治疗感染沙贝病毒(例如SARS-CoV-2或SARS-CoV-1)的患者或患有COVID-19的患者时,可充当治疗活性剂。结合剂(特别是抗体或抗体片段)可包括如本文所述的与沙贝病毒结合的ISVD的变体,优选地为与HR2结构域的相同结合区域结合的改进变体,并且更优选地为其人源化变体,并且可包含或偶联至额外的官能团,这在施用于受试者时是有利的。这些官能团的示例和引入它们的技术的示例对于本领域技术人员来说是清楚的,并且通常可包括本领域提及的所有官能团和技术以及本身已知的用于修饰药物蛋白、具体地用于修饰抗体或抗体片段的官能团和技术,对于它们,例如可参考Remington’s Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1980)。此类官能团可例如直接(例如共价)连接到ISVD或活性抗体片段上,或可选地经由合适的接头或间隔基连接,这对于本领域技术人员来说也是显而易见的。用于增加药物蛋白的半衰期和/或降低其免疫原性的最广泛使用的技术之一包括连接合适的药理学上可接受的聚合物,诸如聚(乙二醇)(PEG)或其衍生物(诸如甲氧基聚(乙二醇)或mPEG)。例如,为了这个目的,PEG可连接到本文所述的免疫球蛋白单可变结构域(或如本文所述的其变体或人源化形式)中天然存在的半胱氨酸残基,如本文所述的免疫球蛋白单可变结构域(或如本文所述的其变体或人源化形式)可被修饰,以便适当地引入用于连接PEG的一个或多个半胱氨酸残基,或者包含用于连接PEG的一个或多个半胱氨酸残基的氨基酸序列可融合到如本文所述的ISVD或活性抗体片段的N末端和/或C末端(或如本文所述的其变体或人源化形式),所有这些都使用技术人员本身已知的蛋白质工程技术。另一种通常不太优选的修饰包括N-连接或O-连接的糖基化,通常作为共翻译和/或翻译后修饰的一部分,具体取决于用于表达抗体或活性抗体片段的宿主细胞。另一种增加结合域(特别是抗体或抗体片段)半衰期的技术可包括工程化成双功能或双特异性结构域(例如,针对靶标沙贝病毒HR2结构域的一个ISVD或活性抗体片段和针对血清蛋白诸如白蛋白或葡萄球菌蛋白A(SpA)的一个ISVD-其是在肺中大量存在的表面蛋白,帮助延长半衰期)或工程化成抗体片段(特别是免疫球蛋白单可变结构域)与肽(例如,针对血清蛋白诸如白蛋白的肽)的融合体。在又一个示例中,如本文所述的ISVD(或如本文所述的其变体或人源化形式)可与如本文其他地方所述的免疫球蛋白Fc结构域融合。实施例在实验部分中进一步显示,并且也在序列表中描

述。在实施方案中,在上述医学方面,沙贝病毒是SARS-CoV-2诸如SARS-CoV-2变体,或SARS-CoV-1。SARS-CoV-2变体可以是位置N439、K417、S477、L452、T478、E484、P384、N501和/或D614处的变体(相对于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白氨基酸序列),更特别是位置N501处的变体诸如N501Y变体(例如,SARS-CoV-2Alpha变体)、位置N501和E484处的变体诸如N501Y和E484K变体(例如,SARS-CoV-2Alpha+E484K变体)、位置K417、E484和N501处的变体诸如K417N、E484K和N501Y变体(例如,SARS-CoV-2beta变体)、位置P384、K417、E484和N501处的变体诸如P384L、K417N、E484K和N501Y变体(例如,SARS-CoV-2beta+P384L变体)、位置L452和E484处的变体诸如L452R和E484Q变体(例如,SARS-CoV-2kappa变体)、位置L452和T478处的变体诸如L452R和T478K变体(例如,SARS-CoV-2delta变体)、位置L452处的变体诸如L452R变体(例如,SARS-CoV-2epsilon变体)、位置K417处的变体诸如K417T变体(例如,SARS-CoV-2gamma变体)或位置D614处的变体诸如D614G变体(例如,SARS-CoV-2 Omicron变体或SARS-CoV-2BA.1变体)。在特定实施方案中,沙贝病毒是SARS-CoV-2和SARS-CoV-2中的任一者或两者。在进一步的具体实施方案中,SARS-CoV-2是SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1毒株或SARS-CoV-2变体,特别是选自SARS-CoV-2Alpha变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体和SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体的SARS-CoV-2变体。

[0330] 如本文所用,术语“疗法”或“治疗”是指缓解或可测量地减轻病理状况(诸如疾病或病症,特别是沙贝病毒感染)的一个或多个症状或可测量标记。可测量地减轻包括可测量的症状或标记的任何统计学上显著的下降。一般来说,这些术语涵盖治愈性治疗和旨在减轻症状和/或减缓疾病进展的治疗。这些术语涵盖对已经发展的病理状况(特别是沙贝病毒感染)的治疗性治疗,以及预防性或防御性措施,其中目标是预防或减轻病理状况(特别是沙贝病毒感染)的发生几率。有益的或期望的临床结果包括但不限于预防疾病、降低疾病发病率、缓解与疾病相关的症状、减轻疾病程度、稳定疾病、延缓或减缓疾病进展、改善或缓和疾病、或它们的组合。在某些实施方案中,这些术语可涉及治疗性治疗。在某些其他实施方案中,这些术语可涉及预防性治疗。

[0331] 例如,治疗可指对感染沙贝病毒的受试者进行被动免疫(治疗性治疗)。预防感染沙贝病毒在例如流行或大流行病症的情况下可能是有用的,在此期间,已知最易发展为严重疾病症状的受试者可用如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)或编码该结合剂的核酸或包含此类核酸的载体或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物进行预防性治疗(防御性或预防性免疫),以便总体上预防感染,或以便预防严重疾病症状的发展或发生。

[0332] 在实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、核酸、载体或药物组合物。在其他实施方案中,向有需要的受试者施用预防有效量的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、核酸、载体或药物组合物。“治疗有效量”或“治疗有效剂量”表示结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、核酸、载体或药物组合物在施用于受试者时,对于患有沙贝病毒感染的受试者的治疗性治疗产生临床阳性反应、例如治愈沙贝病毒感染的量。类似地,“预防有效量”或“预防有效剂量”是指结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、核酸、载体或药物组合物的预防、抑制或延缓受试者的沙贝病毒感染的发生和/或预防或降低沙贝病毒感染的临床表现的风险和/或降低沙贝病毒感染的严重程度、症状和/或持续时间的量。为了实现治疗效果或防御或预防效果,结合剂(特别是抗体或抗原结

合片段)或编码该结合剂的核酸或包含此类核酸的载体或包含该结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物可能需要多次施用于受试者,例如间隔1周或2周;间隔由结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、核酸或载体的药代动力学行为或特征(例如,在受试者血液循环中的半存留期或半衰期)决定。另选地,设想采用治疗性治疗和预防性治疗,其中向受试者施用单剂量的如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)。单剂量可在0.5mg/kg至25mg/kg的范围内。

[0333] 术语"受试者"、"个体"或"患者"在本文中可互换使用,涉及任何生物体诸如脊椎动物,具体地任何哺乳动物,包括人和其他哺乳动物,对于它们而言需要诊断、治疗或预防,例如动物诸如啮齿动物、兔、牛、绵羊、马、狗、猫、羊驼属、猪或非人灵长类动物(例如,猴)。啮齿动物可以是小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或龙猫。在一个实施方案中,受试者是人、大鼠或非人灵长类动物。优选地,受试者是人。在具体实施方案中,受试者是感染或疑似感染沙贝病毒的受试者,诸如人类受试者,在本文中也称为"患者"或"受试者"。然而,应当理解,上述术语并不意味着存在症状。在具体实施方案中,受试者是易受沙贝病毒感染的哺乳动物,诸如易受SARS-CoV-2诸如SARS-CoV-2变体或SARS-CoV-1感染的人类受试者。

[0334] 本发明的药物组合物可根据标准技术施用于任何患者。可通过任何适当的方式施用,包括口服、肠胃外、局部、鼻内、眼内、鞘内、脑室内、舌下、直肠、阴道等。其他配制技术诸如纳米技术以及气雾剂和吸入剂也在本发明的范围内。施用的剂量和频率将取决于患者的年龄、性别和状况、其他药物的同时施用、禁忌症和临床医生要考虑的其他参数。

[0335] 在本文所述医学方面的具体实施方案中,结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、核酸、载体或药物组合物可通过静脉注射、皮下注射或鼻内注射,或者通过吸入或肺部递送施用于受试者。

[0336] 本发明的另一方面涉及如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段),用于诊断沙贝病毒感染,用作诊断剂。同样可使用编码如本文所述的沙贝病毒结合剂(特别是沙贝病毒抗体或抗原结合片段)的核酸、包含此类核酸的(重组)载体、或如本文所述的包含沙贝病毒结合剂(特别是沙贝病毒抗体或抗原结合片段)的组合物。

[0337] 还设想了如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)在制备(体外)诊断剂或诊断试剂盒中的用途。特别地,如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)可用于检测样品中沙贝病毒或其部分(诸如沙贝病毒刺突蛋白或其部分)的存在(或不存在),诸如从受试者(诸如从疑似感染沙贝病毒的受试者)获得的样品。编码如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的核酸、包含此类核酸的(重组)载体或如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物同样可用于制备诊断剂或诊断试剂盒,诸如体外诊断剂或试剂盒。

[0338] 另一方面涉及检测样品中的沙贝病毒的方法,该样品诸如从受试者获得的样品,诸如从怀疑感染了沙贝病毒感染的受试者获得的样品。此类方法通常包括以下步骤:获得样品;使样品与如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)接触;以及检测、确定、评估、测定、识别或测量结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)与沙贝病毒或其部分(诸如沙贝病毒刺突蛋白或其部分)的结合。

[0339] 在本文所述诊断方面的具体实施方案中,沙贝病毒选自进化枝1a、1b、2和/或进化枝3沙贝病毒,诸如SARS-Cov-2、GD-Pangolin、RaTG13、WIV1、LYRa11、RsSHC014、Rs7327、

SARS-CoV-1、Rs4231、Rs4084、Rp3、HKU3-1或BM48-31病毒,优选为SARS-CoV-2诸如SARS-CoV-2变体或SARS-CoV-1。

[0340] 在本文所述的诊断方面的实施方案中,如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗体片段)包含与其融合、结合、偶联、连接、复合或螯合的可检测部分。“可检测部分”通常是指在适当刺激时发射信号或能够发射信号的部分,或者是指能够通过与另外的分子(例如,标签,诸如亲和标签,其被标记的抗体特异性识别)结合或相互作用而被检测或通过任何方式(如果检测是体内/人体内,则优选地通过非侵入性方式)可检测的部分。此外,可检测部分可允许计算机化合成图像,因此可检测部分可称为成像剂。可检测部分包括但不限于荧光发射体、磷光发射体、正电子发射体、放射性发射体等、酶(能够可测量地转化底物)和分子标签。放射性发射体/放射性标记的示例包括68Ga、110mIn、18F、45Ti、44Sc、47Sc、61Cu、60Cu、62Cu、66Ga、64Cu、55Ca、72As、86Y、90Y、89Zr、125I、74Br、75Br、76Br、77Br、78Br、111In、114mln、114In、99mTc、11C、32Cl、33Cl、34C1、123I、124I、131I、186Re、188Re、177Lu、99Tc、212Bi、213Bi、212Pb、225Ac、153Sm和67Ga。荧光发射体包括但不限于花青染料(例如Cy5、Cy5.5、Cy7、Cy7.5)、FITC、TRITC、香豆素、基于假吲哚的染料、基于苯并二氢吲哚的染料、吩恶嗪、BODIPY染料、若丹明、Si-若丹明、Alexa染料以及它们的任何衍生物。分子标签的非限制性示例包括:亲和标签,诸如几丁质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、聚(His)(例如6x His或His6);生物素或链霉亲和素,诸如Strep-tag®、Strep-tag II®和Twin-Strep-tag®;增溶标签,诸如硫氧还蛋白(TRX)、聚(NANP)和SUMO;层析标签,诸如FLAG-标签;表位标签,诸如V5-标签、myc-标签和HA-标签;荧光标记或标签(即荧光染料/团),诸如荧光蛋白(例如GFP、YFP、RFP等);发光标记或标签,诸如荧光素酶、生物发光或化学发光化合物(诸如鲁米诺、异鲁米诺、theromatic吖啶酯、咪唑、吖啶盐、草酸酯、二氧杂环丁烷或GFP以及它们的类似物);磷光标记;金属螯合剂;和(其他)酶标记(例如过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、脲酶或葡萄糖氧化酶)。

[0341] 如本文所述并且包含可检测部分的结合剂(特别是抗体和抗体片段)可例如用于体外、体内或原位测定(包括本身已知的免疫测定,诸如ELISA、RIA、EIA和其他“夹心测定”等)以及体内成像目的,这取决于特定标记的选择。.

[0342] 另一方面涉及试剂盒,所述试剂盒包含如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的载体,或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物,或如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的载体和/或包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物的药物组合物。

[0343] 此类试剂盒可以是药物试剂盒或药剂试剂盒,其包括容器或小瓶(任何合适的容器或小瓶,诸如药学上可接受的容器或小瓶),该容器或小瓶包含一定量的如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、或编码该结合剂的核酸、或包含此类核酸的载体、或如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物,并且还包括例如试剂盒插页诸如包含关于例如预期适应症(预防性或治疗性治疗沙贝病毒感染)和潜在副作用的信息的医学传单或包装传单。药物试剂盒或药剂试剂盒可进一步包括例如注射器,用于向受试者施用如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)、编码该结合剂的核酸、包含此类核酸的载体、或如本文所述的包含结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)的组合物。

[0344] 此类试剂盒还可以是诊断试剂盒,这些诊断试剂盒包括容器或小瓶(任何合适的容器或小瓶,诸如药学上可接受的容器或小瓶),该容器或小瓶包含一定量的如本文所述的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段),诸如包含可检测部分的结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)。此类诊断试剂盒可进一步包含例如一种或多种试剂以检测可检测部分和/或例如关于如何使用所述结合剂(特别是抗体或抗原结合片段)检测样品中的沙贝病毒的说明书。

[0345] 尽管已经结合其具体实施方案描述了本发明,但显然,根据前述描述,许多替代、修改和变化对于本领域技术人员而言都是显而易见的。因此,旨在涵盖在所附权利要求的精神和广泛范围内的如下所有此类替代、修改和变化。

[0346] 本发明的某些方面和实施方案在以下编号的陈述中阐述:

[0347] (1)一种能够中和沙贝病毒的结合剂,其特征在于,所述结合剂特异性结合至沙贝病毒刺突蛋白的七肽重复2(HR2)结构域靠近病毒膜的区域。

[0348] (2)根据(1)所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合至HR2结构域的区域或结合于该区域内,该区域位于SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸11179至氨基酸E1202、优选氨基酸D1184至氨基酸E1202、更优选氨基酸V1189至氨基酸E1202。

[0349] (3)根据(1)或(2)所述的结合剂,其中所述结合剂特异性结合至HR2结构域的区域,该区域与SEQ ID NO:86所定义的SARS-CoV-2刺突蛋白的氨基酸N1192至氨基酸Q1201的区域对应。

[0350] (4)根据(1)至(3)中任一项所述的结合剂,其中:

[0351] -所述结合剂能够中和沙贝病毒,其中50%抑制浓度(IC_{50})为100ng/ml或更低,优选10ng/ml或更低,更优选1ng/ml或更低,如在沙贝病毒刺突蛋白假病毒中和测定(诸如水泡性口炎病毒(VSV)-沙贝病毒刺突蛋白假病毒中和测定)中测定的;

[0352] -所述结合剂能够中和SARS-CoV-2中的任一者或两者,诸如SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1毒株、SARS-CoV-2Alpha变体、SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体和SARS-CoV-2 Omicron BA.2变体中的一者或多者;以及SARS-CoV-1;

[0353] -所述结合剂能够抑制表达所述沙贝病毒刺突蛋白的细胞与表达血管紧张素转化酶2(ACE2)受体的细胞之间的刺突蛋白介导的合胞体形成;并且/或者

[0354] -所述结合剂不结合中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。

[0355] (5)根据(1)至(4)中任一项所述的结合剂,所述结合剂包含抗体或抗体片段,或由其组成。

[0356] (6)根据(1)至(5)中任一项所述的结合剂,所述结合剂包含免疫球蛋白单可变结构域(ISVD),优选VHH。

[0357] (7)根据(6)所述的结合剂,其中所述ISVD包含由SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:77中任一者所定义的互补决定区1(CDR1)、由SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:78中任一者所定义的互补决定区2(CDR2)以及由SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:79中任一者所定义的互补决定区3(CDR3);优选地由SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:80中任一者所定义的CDR1、由SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:75或SEQ ID NO:81中任一者所定义的CDR2以及由SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:68、SEQ ID

NO:76或SEQ ID NO:82中任一者所定义的CDR3。

[0358] (8)根据(6)或(7)所述的结合剂,其中所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3,各自独立地存在于SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10中的任一者中,其中所述CDR1、CDR2和CDR3根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释;优选地,其中所述ISVD包含CDR1、CDR2和CDR3的组合,其中所述CDR1、CDR2和CDR3存在于由SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10列出的序列的特定序列中,其中所述CDR1、CDR2和CDR3根据Kabat、MacCallum、IMGT、AbM、Martin或Chothia中的任一者进行注释。

[0359] (9)根据(6)至(8)中任一项所述的结合剂,其中所述ISVD包含由SEQ ID NO:63所定义的CDR1、由SEQ ID NO:64所定义的CDR2和由SEQ ID NO:48所定义的CDR3;优选地由SEQ ID NO:65所定义的CDR1、由SEQ ID NO:66所定义的CDR2和由SEQ ID NO:51所定义的CDR3;更优选地由SEQ ID NO:52-54中的任一者所定义的CDR1、由SEQ ID NO:55-62中的任一者所定义的CDR2和由SEQ ID NO:21-27中的任一者所定义的CDR3。

[0360] (10)根据(7)至(9)中任一项所述的结合剂,其中所述ISVD包含与选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0361] (11)根据(1)至(10)中任一项所述的结合剂,所述结合剂包含ISVD,所述ISVD包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0362] (12)根据(1)至(11)中任一项所述的结合剂,所述结合剂为多价形式,优选地其中所述结合剂包含与Fc结构域融合的ISVD。

[0363] (13)一种包含编码根据(1)至(12)中任一项所述的结合剂的多核苷酸序列的核酸分子;包含所述核酸分子的载体;或表达根据(1)至(12)中任一项所述的结合剂或者包含所述核酸分子或所述载体的细胞。

[0364] (14)一种药物组合物,所述药物组合物包含根据(1)至(12)中任一项所述的结合剂、根据(13)所述的核酸分子或根据(13)所述的载体,以及药学上可接受的载剂;或一种试剂盒,诸如诊断试剂盒,包含根据(1)至(12)中任一项所述的结合剂。

[0365] (15)根据(1)至(12)中任一项所述的结合剂、根据(13)所述的核酸分子、根据(13)所述的载体、根据(14)所述的药物组合物或根据(14)所述的试剂盒,用于药物用途;优选用于预防或治疗受试者的沙贝病毒感染,或用于诊断受试者的沙贝病毒感染。

[0366] (16)一种用于检测样品中的沙贝病毒的体外或离体方法,所述方法包括:

[0367] -使所述样品与根据(1)至(12)中任一项所述的结合剂接触,以及

[0368] -确定所述结合剂与沙贝病毒或其部分的结合。

[0369] 本文公开的本发明的方面和实施方案进一步由以下非限制性实施例支持。

[0370] 实施例

[0371] 材料和方法

[0372] 分离SARS-CoV-2 VHH噬菌体

[0373] 为了获得SARS-CoV-1和SARS-CoV-2交叉反应性VHH,先前用重组融合前稳定的SARS-CoV-1和MERS-CoV刺突蛋白免疫的美洲驼另外用其融合前构象稳定的重组SARS-CoV-2刺突蛋白(S-2P)免疫3次(Wrapp,D.等人,(2020)“Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies.”Cell 181:1004-1015.e15;Wrapp等人,(2020)“Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike

in the prefusion conformation."Science 367:1260-1263)。免疫后,从美洲驼分离外周血淋巴细胞,并构建免疫VHH展示噬菌粒文库。通过对100ng带His标签的SARS-CoV-2刺突6P蛋白进行2轮生物淘选,从该噬菌体文库中富集展示SARS-CoV-2特异性VHH的噬菌体(Hsieh等人,(2020)"Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2spikes." Science 369:1 501-1 505),该SARS-CoV-2刺突6P蛋白在存在1 0μg/ml RBD-SD 1-小鼠IgG(Sionobiological)的情况下通过包被的抗His抗体固定在微量滴定板(II型,F96 Maxisorp,Nunc)的孔上。此外,还使用抗His捕获的刺突蛋白(R3_C和R4_C系列)或使用直接包被的刺突蛋白(R3_DC和R4_DC系列)进行了另外两轮生物淘选。此外,在这两个系列的另外轮次中,在10μg/ml RBD-SD1-小鼠IgG(Sionobiological)存在下进行生物淘选。对于每一轮淘选,都使用未包被的孔作为阴性对照。然后将孔在第一轮淘选中用磷酸盐缓冲盐水(PBS)+0.05%Tween 20洗涤5次,并用4%奶粉的PBS SEA BLOCK封闭缓冲液(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))封闭,在第二轮淘选中用Pierce无蛋白封闭缓冲液(赛默飞世尔科技公司)封闭,在第三轮淘选中用SEABLOCK封闭缓冲液(赛默飞世尔科技公司)封闭,并在第四轮淘选中用1%BSA封闭。通过使用PBS+0.05%Tween 20充分洗涤除去非特异性结合的噬菌体。用TEA溶液(14%三甲胺(西格玛(Sigma)),pH 10)洗脱保留的噬菌体,随后用1M Tris-HCl(pH 8)中和。收集的噬菌体在指数生长的大肠杆菌TG1细胞中扩增,用VCS M13辅助噬菌体感染,随后使用PEG 8,000/NaCl沉淀进行纯化,以进行下一轮选择。通过用收集的噬菌体的10倍梯度稀释液感染TG1细胞来确定每轮淘选后的富集情况,然后将细菌铺板在含有100μg/mL氨苄青霉素和1%葡萄糖的LB琼脂平板上。

[0374] 周质提取物(PE)的制备

[0375] 经过3或4轮淘选后,随机选择噬菌体感染的细菌的单个菌落用于进一步分析。将单个菌落接种在24孔深孔板中的2mL含有100μg/mL氨苄青霉素的超级肉汤(TB)培养基中。在37℃下培养单个菌落5小时后,加入异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)(1mM)以在37℃下过夜孵育期间诱导VHH表达。为了制备周质提取物,将细菌细胞沉淀并重悬于250μL TES缓冲液(0.2M Tris-HCl pH 8、0.5mM EDTA、0.5M蔗糖)中,并在4℃下孵育30分钟。随后加入350μL水以诱导渗透性休克。在4℃下孵育1小时后,随后离心,收集周质提取物。

[0376] 周质提取物-酶联免疫吸附测定

[0377] 在4℃下将半孔微量滴定板的孔用50ng重组SARS-CoV-2 S-2P蛋白、SARS-CoV-2 S2亚基(百普赛斯,S2N-C52H5)、SARS-CoV-2RBD(义翘神州)、SARS-CoV S、MERS-CoV S、HKU1 S和BSA包被过夜。用5%奶粉的PBS溶液封闭板。将周质提取物在PBS中稀释1/10,然后加入到封闭的孔中。用小鼠抗HA抗体(BioLegend901501,1/2000)检测,然后用抗小鼠IgG-HRP(GE医疗(GE Healthcare),NA931V,1/2000)检测VHH的结合。洗涤后,将50μl TMB底物(四甲基联苯胺,BD OptEIA)加入到板中,并通过加入50μl 1M H2SO4终止反应。用iMark微孔板吸光度分光光度计(伯乐公司)测量450nm处的吸光度。使用非线性回归(Graphpad 8.0)进行曲线拟合

[0378] 周质提取物-假病毒中和测定

[0379] 将表达SARS-CoV-2刺突蛋白(D614G)的假病毒与Fluorobrite DMEM培养基(英杰公司(Invitrogen))中周质提取物的1/100稀释液一起在37℃下孵育30分钟,并补充5%热灭活的FBS、1%青霉素、1%链霉素、2mML-谷氨酰胺、非必需氨基酸(英杰公司)和1mM丙酮酸

钠。随后将孵育的假病毒加入到Vero E6的亚汇合单层中,并从中除去最初的生长培养基。十六小时后,使用被动裂解缓冲液(Promega)裂解细胞。通过使用Tecan infinite 200 pro酶标仪测量制备的细胞裂解物中的GFP荧光值来定量转导效率。GFP荧光值使用未感染细胞和用PBS处理的感染细胞的GFP荧光值进行标准化。

[0380] 细胞系

[0381] FreeStyle293F细胞(赛默飞世尔科技公司)和HEK293-S细胞(赛默飞世尔科技公司)在FreeStyle 293表达培养基(Life Technologies)中在37℃、8%CO_2下培养,转速为130rpm。HEK293-T细胞(ATCC)和Vero E6细胞(ATCC)在37℃且存在5%CO_2下在补充有10%热灭活胎牛血清(FBS)、1%青霉素、1%链霉素、2mM l-谷氨酰胺、非必需氨基酸(英杰公司)和1mM丙酮酸钠的DMEM中培养。ExpiCHO-S细胞(GIBCO)在ExpiCHO表达培养基(GIBCO)中培养,温度为37℃,CO_2含量为8%,转速为130rpm。稳定表达人TMPRSS2的Vero E6-TMPRSS2细胞(NIBIOHN,JCRB1819)(Matsuyama等人,PNAS,2020)在含有10%FBS、青霉素(100单位/mL)、链霉素(100ug/mL)、遗传霉素(G418)(1mg/ml)的DMEM中培养。当接种Vero E6-TMPRSS2细胞进行测定时,使用不含遗传霉素的培养基。

[0382] Raji细胞和稳定表达SARS-CoV-2刺突蛋白的Raji细胞在补充有10%FCS、0.1μg/ml嘌呤霉素、1%青霉素和1%链霉素的RPMI-1640培养基中在37℃、5%CO_2下培养。

[0383] 索托韦单抗、西加韦单抗、贝贝替洛单抗和帕利珠单抗

[0384] 贝贝替洛单抗生物仿制药(PX-TA1750)、西加韦单抗生物仿制药(PX-TA1033)和索托韦单抗生物仿制药(PX-TA1637)均商购自Proteogenix。临床级帕利珠单抗获自根特大学医院(Ghent University hospital)。

[0385] R3_DC23-Fc(YTE)(本文中也称为huR3DC23-Fc)(SEQ ID NO:96)的生成

[0386] 将人源化(Q1D、Q5V、A14P、D16G、T19R、M63V、S73N、D79Y、T82cL、K83R和Q108L,根据Kabat编号;T82cL修饰尤其用于灭活N82a位置的糖基化,并且可用于人源化和非人源化版本,用于在哺乳动物细胞中表达)版本的R3_DC23通过$(G_4S)_2$接头与在IDT合成订购为gBlock的人IgG1 Fc(EPKSCdel_YTE_K447del)融合。获得后,gBlock以20ng/μL的浓度溶解在超净水中。使用NEBNext加dA尾模块(NEB)对gBlock进行加A尾,使用CleanPCR磁珠(CleanNA)进行纯化,并插入pcDNA3.4-TOPO载体(赛默飞世尔科技公司)中。对阳性克隆的ORF进行完整测序,并使用NucleoBond Xtra中提试剂盒(Machery-Nagel)制备选定克隆的pDNA。

[0387] huR3DC23-Fc_LS(本文也称为R3_DC23hum-Fc(LS)或XVR013)(SEQ ID NO:118)的瞬时产生

[0388] 将编码huR3DC23-Fc_LS的基因在ATUM实验室进行密码子优化、合成并克隆到pXLG6主链载体中。经过基因和密码子优化后,将R3DC23DNA序列插入pXLG6表达载体中,并以4.00E+6个细胞/ml的细胞密度转染到CHOExpress™细胞中。通过离心收获TGE上清液,并在10天后当细胞活力降至10%以下时通过过滤(0.2μm)澄清。通过ProteinA进一步纯化蛋白质。

[0389] 生产VHH73S56A、GBP、CB6和S309

[0390] VHH73_S56A、GBP、CB6和S309的生产按照Schepens等人所述进行(Schepens等人,(2021)Sci.Transl Med.13:eabi7826)。

[0391] HEK S转染和蛋白质纯化方案;在哺乳动物细胞中生产VHH-Fc的YTE变体

[0392] 使用聚乙烯亚胺(PEI)用VHH-Fc(S)编码质粒转染HEK293-S细胞。简而言之,将适应悬浮且无血清的HEK293-S细胞以3×10^6个细胞/mL接种于FreeStyle 293培养基(赛默飞世尔科技公司)中。接下来,将4.5μg pcDNA3.3-VHH-Fc质粒DNA加入细胞中,在37℃、8%CO_2的振荡平台上孵育5分钟。接下来,向培养物中加入9μg PEI,将细胞进一步孵育5小时,之后加入等量培养体积的Ex-Cell-293(西格玛)。将转染物孵育4天,之后沉淀细胞(10′,300g)并过滤上清液后再进一步使用。为了纯化VHH-Fc蛋白,将上清液上样到5mL MAbSelect SuRe柱(GE医疗)上。使用McIlvaine缓冲液(pH7.2)洗掉未结合的蛋白质,并使用McIlvaine缓冲液(pH3)洗脱结合的蛋白质。洗脱后立即用30%(v/v)的饱和Na_3PO_4缓冲液中和含蛋白质的级分。接下来,将这些级分合并,并上样到HiPrep脱盐柱上,用于缓冲液交换为PBS(pH 7.4)。

[0393] 此外,根据制造商的方案,huR3DC23-Fc_YTE在ExpiCHO-S™细胞(赛默飞世尔科技公司)中表达。简而言之,使用ExpiFectamine™ CHO试剂并用40μg pcDNA3.3-VHH72-Fc质粒DNA转染在37℃和8%CO_2下生长的、6×10^6个细胞/mL的50mL培养物。转染一天后,向细胞中添加300μL ExpiCHO™增强剂和8mLExpiCHO™补料,并在32℃和5%CO_2下进一步孵育。转染后第五天第二次喂养细胞。一旦细胞活力降至75%以下,便收集产物。

[0394] 为了纯化VHH-Fc蛋白,将上清液上样到5mL MAbSelect SuRe柱(GE医疗)上。使用McIlvaine缓冲液(pH7.2)洗掉未结合的蛋白质,使用McIlvaine缓冲液(pH 3)洗脱结合的蛋白质。洗脱后立即用30%(v/v)的饱和Na_3PO_4缓冲液中和含蛋白质的级分。接下来,将这些级分合并,并上样到HiPrep脱盐柱上,用于缓冲液交换为PBS(pH 7.4)。

[0395] 以1L规模从稳,定池补料分批生产huR3DC23-Fc_LS

[0396] 将编码huR3DC23-Fc LS的基因在ATUM实验室进行密码子优化、合成并克隆到pXLG6主链载体中。当密度扩增到约4×10^6个细胞/ml时,用表达载体和pXLG5辅助载体共转染亲本CHOExpress™细胞。在50mg/L嘌呤霉素选择压力(每日施加)下生成稳定池并进一步扩大。当细胞活力达到95%时,在第14天储存稳定池研究细胞库。

[0397] 然后将RCB池扩大用于1L规模的蛋白质生产,并培养至第12天(细胞密度3.5×10^7个细胞/mL,细胞活力96%)。通过离心收获上清液并通过过滤(0.2μm)澄清。使用MabSelect SuRe LX树脂通过ProteinA进一步纯化蛋白质。用20mM磷酸钠和110mM NaCl(pH 7.2)、100mM乙酸钠和500mM NaCl(pH5.5)以及20mM磷酸钠(pH7.2)进行连续洗涤。通过添加1MTris(pH 11,10%v/v)将100mM乙酸钠(pH3.5)中的洗脱物中和至pH7.0。过滤灭菌(0.22μm)后,将蛋白质以2mg/ml等分。

[0398] 用于生物物理分析的蛋白质制备

[0399] 在进行生物物理表征之前,MAbSelect SuRe纯化的蛋白质样品在12℃冷却的Superdex 200柱(GE医疗)上通过尺寸排阻色谱法(SEC)进一步纯化,该柱用补充有0.02%叠氮化钠以防止微生物生长的杜氏磷酸盐缓冲盐水(PBS,西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich))平衡,或者用包含50mM L-组氨酸和150mM L-精氨酸(西格玛奥德里奇)、0.02%聚山梨醇酯-20和0.02%叠氮化钠的样品缓冲液平衡,在25℃下将pH设置为7.0。过滤灭菌(0.22μm)后,将1mg/ml等分试样放入聚丙烯管中在液氮中速冻,并储存在80℃下。

[0400] 样品组成

[0401] 纯化的VHH-Fc样品通过分析SEC进行表征,以确定每个样品的分子组成。在25℃的

温水浴中快速解冻后,以16,000xg离心10分钟,并将上清液转移到新试管中,将5μg注入4.6×300mm的AdvanceBio SEC柱(安捷伦(Agilent))中,该柱的多孔粒径为2.7μm,孔径为300Å,用PBS校准。通过在280nm处1 6nm带宽的吸光度监测分离,未进行参考扣除。为了进行额外的质量控制,在还原性15%SDS-PAGE上分离蛋白质,并使用考马斯亮蓝染色。

[0402] 生成刺突蛋白表达载体,用于生产表达含有SARS-CoV-2变体的RBD突变的刺突蛋白的VSVdelG假病毒颗粒

[0403] 含有D614G突变的SARS-CoV-2刺突蛋白的pCG1表达载体是根据制造商(Aligent)的说明,通过使用适当的引物经由QuickChange诱变引入特定RBD突变,从pCG1-SARS-2-Sdel18载体生成。对于Omicron BA.1变体的pCG1-SARS-2-Sdel18表达载体,在Geneart(Thermo Fischer Scientific)订购了含有BA.1突变(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)和侧翼BamHI和SalI限制位点的经密码子优化的刺突蛋白核苷酸序列,并作为BamHI/SalI片段克隆到pCG1载体中。对于pCG1-SARS-2-BA.2 Sdel18表达载体,在Geneart(Thermo Fischer Scientific)订购了含有BA.2突变(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)和侧翼BamHI和SalI限制位点的经密码子优化的刺突蛋白核苷酸序列,并作为BamHI/SalI片段克隆到pCG1载体中。对于pCG1-SARS-2-BA.2.75Sdel18表达载体,在Geneart(Thermo Fischer Scientific)订购了含有BA.2.75突变(K147E、W152R、F157L、I210V、G257S、D339H、G446S、N460K、R493Q)和侧翼BamHI和SalI限制位点的经密码子优化的刺突蛋白核苷酸序列,并作为BamHI/SalI片段克隆到pCG1载体中。Omicron BA.2.75.2变体的pCG1表达载体根据制造商的说明(New England BioLabs),通过使用适当的gBlock(在IDT订购)经由Gibson组装克隆技术从pCG1-SARS-2-BA.2.75Sdel18引入R346T、F486S、D1199N突变而生成。

[0404] Omicron BA.4/BA.5变体的pCG1表达载体根据制造商的说明(安捷伦),通过使用适当的引物(在IDT订购)经由QuickChange诱变从pCG1-SARS-2-BA.2 Sdel18载体引入H69缺失、V70缺失和L452R、F486V、R493Q突变而生成。

[0405] Omicron BA.4.6变体的pCG1表达载体根据制造商的说明(安捷伦),通过使用适当的引物(在IDT订购)经由QuickChange诱变从pCG1-SARS-2-BA.4Sdel18引入R346T和N658S突变而生成。

[0406] Omicron BF.7变体的pCG1表达载体根据制造商的说明(安捷伦),通过使用适当的引物(在IDT订购)经由QuickChange诱变从pCG1-SARS-2-BA.4Sdel18引入R346T突变而生成。

[0407] Omicron BQ.1.1变体的pCG1表达载体根据制造商的说明(安捷伦),通过使用适当的引物(在IDT订购)经由QuickChange诱变从pCG1-SARS-2-BA.5Sdel18引入R346T、K444T和N460K突变而生成。

[0408] Omicron XBB变体的pCG1表达载体根据制造商的说明(NewEnglandBioLabs),通过使用适当的gBlock(在IDT订购)经由Gibson组装克隆技术从pCG1-SARS-2-BA.2 Sdel18引

入V83A、Y144、H146Q、Q183E、V213E、D339H、R346T、L368I、V445P、G446S、N460K、F486S、F490S、R493Q突变而生成。Omicron XBB.1.5变体的pCG1表达载体根据制造商的说明(安捷伦),通过使用适当的引物(在IDT订购)经由QuickChange诱变从pCG1-SARS-2-XBB Sdel18引入F486P突变而生成。

[0409] 测序后,使用Qiagen质粒Qiagen试剂盒制备含有正确刺突蛋白编码序列的克隆。使用前,通过桑格测序确认了制备的pCG1载体的刺突蛋白编码序列。

[0410] 疏水相互作用色谱(HIC)测定

[0411] 使用疏水相互作用色谱(HIC)测定评估表观疏水性,该测定采用100mm×4.6mm的Dionex ProPac HIC-10柱(Thermo Fisher 063655),该柱包含由与二氧化硅结合的混合乙基和酰胺官能团组成的固定相。所有分离均在配备有UV/VIS检测器的Agilent 1100/1260HPLC上进行。整个运行过程中,柱温保持在25℃并且流速为0.8ml/min。HIC所用的流动相为(A)1.6M硫酸铵和50mM磷酸盐(pH 7.0),以及(B)50mM磷酸盐(pH 7.0)。用缓冲液将蛋白质和校准物样品A以1:1的比例稀释,并注入柱中。在50%B下保持5分钟后,使用50分钟内从50%B到100%B的线性梯度洗脱结合蛋白,然后在100%B下保持5分钟。用100%B洗涤柱,然后用50mM乙酸铵(pH 5)洗涤,并在50%B中重新平衡10分钟,然后加入下一个样品。通过在280nm处16nm带宽的吸光度监测分离,未进行参考扣除。

[0412] 蛋白质的质谱分析。

[0413] 首先将完整的VHH蛋白(10μg)用三(2-羧乙基)膦(TCEP;10mM)在37℃下还原30分钟,然后在与LTQ Orbitrap XL质谱仪(Thermo Fischer Scientific)在线连接的Ultimate3000HPLC系统(ThermoFisherScientific,德国不来梅)上分离还原的蛋白质。简而言之,将约8μg蛋白质注入Zorbax 300SB-C18柱(5μm,300Å,1×250mmIDxL;安捷伦)并使用30分钟梯度从5%到80%的溶剂B以100μl/min的流速进行分离(溶剂A:0.1%甲酸和0.05%三氟乙酸的水溶液;溶剂B:0.1%甲酸和0.05%三氟乙酸的乙腈溶液)。柱温维持在60℃。使用以下参数将洗脱的蛋白质直接喷入带有ESI源的质谱仪中:喷雾电压为4.2kV,表面诱导解离为30V,毛细管温度为325℃,毛细管电压为35V,鞘气流速为7(任意单位)。质谱仪使用轨道阱分析仪在MS1模式下操作,分辨率为100,000(m/z 400),质量范围为600-4000m/z,处于轮廓模式。使用BioPharma FinderTM 3.0软件(Thermo Fischer Scientific)并用Xtract去卷积算法(同位素解析光谱)对所得MS光谱进行去卷积。手动注释该去卷积光谱。

[0414] 由大肠杆菌生产VHH

[0415] 为了在大肠杆菌中生产VHH,将含有所关注VHH的pMECS载体转化到WK6细胞(非抑制性大肠杆菌菌株)中,并铺板在含有氨苄青霉素的LB平板上。第二天,挑取克隆,并在37℃下在含有100μg/mL氨苄青霉素和1%葡萄糖的2mL LB中生长过夜,同时以200rpm振荡。用1ml该预培养物接种25ml补充有100μg/ml氨苄青霉素、2mM$MgCl_2$和0.1%葡萄糖的TB(超级肉汤),并在37℃下振荡(200rpm-250rpm)孵育直至达到0.6-0.9的OD600。通过加入IPTG至1mM的终浓度诱导VHH产生。将这些诱导的培养物在28℃下孵育过夜,同时以200rpm振荡。从周质中提取产生的VHH,并如Wrapp等人所述纯化。(2020.Cell 181:1004-1015.e15)。简而言之,使用Ni琼脂糖珠(GE医疗)从溶液中纯化VHH。在使用500mM咪唑洗脱后,使用Vivaspin柱(5kDa截止值,GE医疗)将含有VHH的流通级分与PBS进行缓冲液交换。通过SDS-PAGE和考

马斯染色以及通过完整的质谱分析纯化的VHH。

[0416] 酶联免疫吸附测定

[0417] 在4℃下将微量滴定板(II型,F96 Maxisorp,Nunc)的孔用100ng重组SARS-CoV S-6P蛋白(Hsieh等人,2020)、SARS-CoV-1 S-2P蛋白(具有折叠子)、带His标签的SARS-CoV-2RBD(义翘神州)、SARS-CoV-2刺突蛋白S2亚基(百普赛斯)、重组SARS-Cov-2 S-2P、SARS-CoV-2 S-6P蛋白、重组SARS-CoV-1刺突蛋白、重组MERS-CoV刺突蛋白、重组HKU1刺突蛋白、SARS-CoV-2Omicron BA.1 S蛋白(百普赛斯)、小鼠带Fc标签的SARS-CoV-2RBD(义翘神州)或BSA包被过夜。用5%奶粉的PBS溶液封闭包被的板。将VHH或VHH-Fc或抗体的梯度稀释液加入孔中并孵育90分钟。洗涤后,通过依次用HRP缀合的兔抗骆驼科动物VHH抗体(金斯瑞(Genscript))或小鼠抗HA抗体(BioLegend901501,1/2000)孵育板,然后使用抗小鼠IgG-HRP(GE医疗,NA931V,1/2000)孵育板来检测结合。通过兔抗人IgG(西格玛)检测VHH-Fc或常规人单克隆抗体的结合,然后通过HRP缀合的抗兔IgG(Southern Biotech)检测。洗涤后,将50μL TMB底物(四甲基联苯胺,BD OptETA)加入到板中,并通过加入50μL 1M H_2SO_4终止反应。用iMark微孔板吸光度分光光度计(伯乐公司)测量450nM处的吸光度。使用非线性回归(Graphpad 8.0)进行曲线拟合。

[0418] 与表达SARS-CoV刺突蛋白的HEK293细胞的结合的流式细胞术分析

[0419] 为了通过流式细胞术研究VHH与哺乳动物细胞表面上刺突蛋白的结合,我们使用了含有SARS-CoV-2刺突蛋白编码序列的pCG1表达质粒,该质粒删除了C末端的18个氨基酸,并根据制造商的说明通过QuickChange定点诱变(安捷伦)引入了D614G取代(614G)。用GFP表达质粒与刺突蛋白表达质粒或对照表达质粒的组合转染HEK293-T细胞两天后,收集细胞。所有进一步的程序均在冰上进行。细胞用PBS洗涤一次,并用1%BSA封闭。细胞用抗体或VHH梯度稀释液染色90分钟,随后用含有1%BSA的PBS洗涤3次。使用小鼠抗His标签抗体(伯乐公司)和AF647缀合驴抗小鼠IgG抗体(英杰公司)检测VHH的结合。使用驴抗人IgG抗体(伯乐公司)检测VHH-Fc或抗体的结合,并使用Live/Dead染色剂(伯乐公司)对死细胞进行染色。用含有0.5%BSA的PBS洗涤3次后,使用BD LSRII流式细胞仪(碧迪生物科学(BD Biosciences))通过流式细胞术分析细胞。使用非线性回归(Graphpad 8.0)拟合结合曲线。

[0420] FcRn结合亲和力

[0421] 抗体与纯化的重组人FcRn/FCGRT-B2M蛋白结合的表面等离子体共振(SPR)分析由FairJourney Biologics(葡萄牙波尔图)在Biacore 8K+仪器上进行。带His标签的重组人FcRn/FCGRT-B2M异二聚体蛋白购自百普赛斯。在测定中使用贝贝替洛单抗生物仿制药和人IgG1同种型对照抗体作为对照。简言之,R3_DC23hum-Fc(LS)或对照抗体通过胺偶联以低密度固定在CM5传感器芯片(思拓凡(Cytiva))上,固定水平为130RU至283RU。在pH6.0下,将人FcRn/FCGRT-B2M异二聚体蛋白以1.5μM(锚定点)注入溶液中,对于对照抗体固定化通道,在1000nM-7.8nM范围内进行八步2倍梯度稀释,对于R3 DC23hum-Fc(LS)固定化通道,在250nM-0.97nM范围内进行九步2倍梯度稀释。在pH 7.4下,将人FcRn/FCGRT-B2M异二聚体蛋白以1.5μM(锚定点)注入溶液中,对于所有固定化通道,在1000nM-7.8nM范围内进行八步2倍梯度稀释。分析物注射以30μl/min在运行缓冲液中进行1分钟;包括0nM浓度的测定运行作为空白参考。SPR运行缓冲液包含pH 6.0/pH 7.4下的1xPBS和0.05Tween20。应用多循环动力学方案(90秒的解离速率测量);由于体积效应,省略了从高于250nM的抗体或VHH-Fc浓

度获得的数据。双参考扣除后,使用Biacore Insight评估软件的稳态亲和力预定义评估方法或通过在同一软件中拟合1:1结合模型来分析数据。

[0422] 人质膜蛋白细胞阵列

[0423] 使用Retrogenix细胞微阵列技术(英国的维通利华(Charles River Laboratories))来筛选测试抗体的特异性脱靶结合相互作用。首先,进行预筛选以确定每种测试抗体与固定的未转染HEK293细胞和覆盖有SARS-CoV-2FL刺突6-HIS蛋白的细胞的背景结合水平。这些数据用于评估进一步筛选的适合性和最佳浓度。其次,在文库筛选中,筛选出测试抗体池用于结合固定的HEK293细胞,这些细胞过表达6101个个体全长人质膜蛋白、分泌的和细胞表面束缚的人分泌蛋白以及另外的396个人异二聚体。这确定了文库相互作用。最后,在确认筛选中,所有文库相互作用均被重新表达,并用测试抗体单独或对照处理进行探测,以确定哪些相互作用(如果有的话)是可重复的并且对每种测试抗体具有特异性。这在固定细胞和活细胞上都进行过。

[0424] 为了进行预筛选,用编码ZsGreen1和人CD20或EGFR的表达载体在载玻片上点样,并用于反向转染HEK293细胞。固定载玻片,随后用明胶+/-SARS-CoV-2刺突蛋白(由PeakProteins提供的SARS-CoV-2FL刺突6-HIS蛋白,以0.2mg/mL点样)进行点样。固定后,向上述细胞/载玻片中添加1μg/mL、2.5μg/mL或10μg/mLR3_DC23hum-Fc(LS)和1μg/mL利妥昔单抗生物仿制药或仅添加PBS。使用AlexaFluor 647标记的抗人IgG Fc(AF647抗hIgGFc)检测抗体,然后进行荧光成像,评估与靶标表达细胞和未转染细胞的结合。为了进行文库筛选,将6101个表达载体(编码ZsGreen1和全长人质膜蛋白、分泌的或细胞表面束缚的人分泌蛋白)以及另外396个人异二聚体在细胞微阵列载玻片上一式两份单独排列。随后用明胶+/-SARS-CoV-2刺突蛋白(0.2mg/mL)在另一张载玻片上点样。在每张载玻片上一式四份地点样表达载体(pIRES-hEGFR-IRES-ZsGreen1),以确保在每张载玻片上达到或超过转染效率的最小阈值。使用人HEK293细胞进行反向转染/表达。细胞固定后,将测试抗体池添加到每张载玻片上。使用与预筛选中所用的荧光二抗(AF647抗hIgG Fc)相同的荧光二抗进行结合检测。针对2个重复的载玻片组筛选测试抗体池。使用ImageQuant软件(GE医疗,版本8.2)分析和定量荧光图像(用于转染)。蛋白质相互作用被定义为与背景水平相比显示信号升高的重复点。这是通过目视检查实现的。根据重复点的强度,相互作用被分为"强、中、弱或非常弱"。显著的相互作用被定义为弱强度或更大强度的信号。对于确认筛选,将编码在文库筛选中识别的所有相互作用的载体以及编码CD20(阳性对照)和EGFR(转染和阴性对照)的对照载体排列并在新载玻片上的HEK293细胞中表达。在细胞固定后(n=2)或没有固定时(n=1),对文库筛选进行确认筛选载玻片和分析。也在固定载玻片上用明胶+/-SARS-CoV-2刺突蛋白(0.2mg/mL)点样。用2.5μg/mLR3_DC23hum-Fc(LS)或20μg/mLIgGkappa抗体(阴性对照)、1μg/mL利妥昔单抗生物仿制药(阵列阳性对照)或无测试分子(仅二抗;阴性对照)处理载玻片。再次通过荧光成像评估与靶标表达细胞和未转染细胞的结合。

[0425] SARS-CoV假病毒中和测定

[0426] 为了产生复制缺陷型VSV假型化病毒,用含有eGFP和萤火虫荧光素酶表达盒的复制缺陷型VSV载体接种用SARS-CoV-1 S或SARS-CoV-2 S转染的HEK293-T细胞(Berger和Zimmer 2011,PloS One 6:e25858和Hoffmann等人,(2020)Cell 181:271-280.e8)。在37℃下孵育1小时后,除去接种物,细胞用PBS洗涤,并在补充有抗VSV G mAb的培养基(ATCC)中

孵育16小时。然后收获假型化的颗粒,并通过离心澄清。

[0427] 对于VSV假型中和实验,将假病毒与纯化VHH或VHH-Fc融合体的不同稀释液或与GFP结合蛋白(GBP:对GFP具有特异性的VHH)在37℃下孵育30分钟。随后将经孵育的假病毒添加到Vero E6或Vero E6-TMPRSS2细胞的亚汇合单层中。十六小时后,使用被动裂解缓冲液(Promega)裂解细胞。通过使用Tecan infinite 200pro酶标仪测量制备的细胞裂解物中的GFP荧光值来定量转导效率。GFP荧光用未感染细胞和PBS处理的感染细胞的GFP荧光或每个梯度稀释液的最低和最高GFP荧光值标准化。IC_{50}通过非线性回归曲线拟合(log(抑制剂)vs.反应)(四参数)计算。

[0428] 另选地,将VHH或抗体的梯度稀释液与100PFU的表达GFP的、具有复制能力的VSV病毒颗粒混合,这些病毒颗粒用源自早期分离物的SARS-CoV-2刺突蛋白假型化。值得注意的是,该病毒克隆(S1-10a)在Vero E6细胞上繁殖期间,弗林蛋白酶切割位点突变,因此失活(Koenig等人,(2021)Science 371:eabe6230)。在37℃下孵育30分钟后,将病毒-抗体混合物添加到Vero E6细胞单层中,并让其感染和复制三天。

[0429] 在所有使用假型化VSV病毒颗粒的中和测定中,使用补充有5%热灭活FBS、1%青霉素、1%链霉素、2mMl-谷氨酰胺、非必需氨基酸(英杰公司)和1mM丙酮酸钠的FluoroBrite DMEM培养基(英杰公司)来制备VHH或抗体-病毒混合物。将混合物添加到已去除原始生长培养基的细胞中。

[0430] SARS-CoV-2噬菌斑减少中和试验(PRNT)

[0431] 使用SARS-CoV-2毒株SARS-CoV-2/人/FRA/702/2020(从欧洲病毒档案库(EVAG)获得)和SARS-CoV-2BA.1病毒(Planas等人,(2022)Nature602:671-675)并在VeroE6细胞上生长来进行使用真实病毒的噬菌斑减少测定。在Vero E6-TMPRSS2细胞上进行病毒的进一步繁殖。

[0432] 两种病毒都使用噬菌斑测定进行滴定,其中用在杜氏改良Eagle培养基(DMEM)中制备的梯度稀释液感染Vero E6-TMPRSS2细胞单层,该培养基补充有2%胎牛血清(FBS),每种病毒2瓶,一式两份。感染两小时后,加入Avicel至终浓度为0.3%(w/v)。

[0433] 通过将不同浓度(5倍梯度稀释液)的构建体与40PFU的SARS-CoV-2混合,并将混合物在37℃下孵育1小时,评估不同构建体的剂量依赖性中和。然后将VHH病毒混合物添加到12孔板中的Vero E6-TMPRSS2细胞单层中,并在37℃下孵育1小时。随后,加入Avicel至终浓度为0.3%(w/v)。在37℃下孵育2天后,除去覆盖物,用3.7%多聚甲醛(PFA)固定细胞,并用0.5%结晶紫染色。半最大中和滴度($PRNT_{50}$)被定义为导致两个独立板上噬菌斑减少50%的VHH-Fc浓度。

[0434] 活病毒测定

[0435] 对2020年1月至2022年7月期间从患者/旅行者获取的鼻咽拭子中分离出的属于不同谱系(614G、Delta、Omicron BA.1、Omicron BA.2和Omicron BA.5)的SARS-CoV-2病毒进行了活病毒测定。

[0436]

	名称	分离日期
WT	SARS-CoV-2分离株BavPat1/2020;德国;2020年2月9日	2020年1月1日
Delta	SARS相关冠状病毒2,分离株hCoV-19/USA/MD-HP05647/2021	2021年4月27日
BA.1	SARS-CoV-2hCoV-19/荷兰/NH-RIVM-72291/2021	2021年11月29日

BA.2	临床分离株hCoV-19/荷兰/VCB-20220303-1/2022	2022年3月3日
BA.5	临床分离株hCov19/NL/VCB-20220714-2/2022	2022年7月14日

[0437] 在活病毒中和测定中评估了测试项目的剂量依赖性中和、阳性对照(贝贝替洛单抗生物仿制药、西加韦单抗生物仿制药、索托韦单抗生物仿制药)和阴性对照(同种型对照)。对于测试活D614G、Delta、BA.1和BA.2 SARS-CoV-2的所有测定,均使用由瞬时转染细胞产生的huR3DC23-Fc_LS。对于测试SARS-CoV-2BA.5的所有测定,均使用由稳定细胞池产生的huR3DC23_Fc_LS。对于每个变体,进行了三次独立运行。测定中包括不同的系统对照:仅细胞(仅培养基)、仅病毒和内部阳性对照(人血清)。简而言之,将测试项目和对照的5倍或7倍稀释液与固定量的病毒在室温下孵育1小时。

[0438]

病毒	储备液滴度	稀释

[0439]

	(TCID50/mL)	
D614G	6.77	200x
Delta	6.7	100x
Omicron A.1	6.13	40x
Omicron A.2	4.84	10x
Omicron A.5	5.89	20x

[0440] Vero-E6细胞单层用病毒抗体混合物在37℃下接种1小时。下一步,除去接种物,并将细胞在37℃下与感染培养基(最低必需培养基(MEM),补充有2mM L-谷氨酰胺、1x非必需氨基酸、25mM HEPES(N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸)、1%热灭活胎牛血清(FBS)和1x抗生素抗真菌剂(Gibco))一起孵育(感染后最多18-24小时)。然后,固定SARS-CoV2感染的细胞,并用SARS-CoV核衣壳抗体(义翘神州,目录号:40143-MM05)进行免疫染色,然后用HRP缀合的山羊抗鼠IgG(H+L)二抗(英杰公司,目录号A16072)进行免疫染色。使用ImmunoSpot®S6 Ultimate分析仪(CTL)计数噬菌斑(感染细胞)。对于每种抗体/构建体,显示感染减少50%的浓度(IC_{50})基于Zielinska方法来计算(Zielinska等人,(2005)Virology Journal 2:84)。几何平均值基于三次独立运行来计算。S1脱落测定

[0441] 将抗体或VHH以10μg/ml的终浓度加入到1百万个不表达刺突蛋白或表达SARS-CoV-2刺突蛋白的Raji细胞中。将抗体/VHH细胞混合物在37℃和5%CO_2中孵育30分钟或1小时。孵育后,通过离心使细胞沉淀,将上清液转移至新鲜的管中,并用RIPA裂解缓冲液(50mM Tris-HCl pH 8.0,100mM NaCl,1mM EDTA,1mM EGTA,0.1%SDS,1%NP-40)裂解细胞沉淀。将20μμl上清液和裂解物样品在8%SDS-PAGE凝胶上分离,并电印迹到硝酸纤维素膜上。膜用4%牛奶封闭,用兔抗SARS-S1抗体(1/1000,义翘神州,40591-T62)染色,接着用抗兔IgG-HRP(1/2000,GE医疗,NA934V)染色,并使用Pierce™ ECL Western印迹底物(赛默飞世尔科技公司)进行开发。

[0442] 用使用SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1刺突蛋白(del-18)假型化的、具有复制能力的VSV-GFP报告病毒的融合抑制测定

[0443] Vero E6-TMPRSS2细胞用40PFU的用SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的、表达GFP的、具有复制能力的VSV-GFP病毒感染(Koenig等人,2021)。两小时后,添加指示的单克隆抗体或VHH。未感染的细胞被用作阴性对照。将细胞感染过夜并用荧光显微镜成像。用荧光计测量GFP荧光值。值得注意的是,与中和测定中使用的具有复制能力的假型化VSV颗粒的克隆不

同,融合测定中使用的病毒的弗林蛋白酶切割位点具有完整的弗林蛋白酶切割位点,这已通过桑格测序确认。

[0444] 使用表达刺突蛋白的Vero E6细胞进行融合抑制测定

[0445] 使用Fugene,Vero E6细胞用GFP表达载体与对照表达载体(无刺突蛋白)或SARS-CoV-2刺突蛋白表达载体组合转染。转染两小时后,加入PBS、单克隆抗体或VHH至终浓度为10μg/ml。转染二十二小时后,使用3.7%多聚甲醛固定细胞,并用PBS洗涤后使用荧光显微镜成像。

[0446] 病毒逃逸选择

[0447] 接种在96孔板中的Vero E6-TMPRSS2细胞单层用400PFU的表达GFP的、具有复制能力的VSV病毒颗粒感染,这些病毒颗粒用含有完整弗林蛋白酶切割位点的SARS-CoV-2刺突蛋白假型化(Koenig等人,2021)。感染两小时后,添加10μg/mlVHH.R3_DC23。一个对照孔中未添加VHH。

[0448] 收集在VHH.R3_DC23存在下显示合胞体形成或病毒复制的孔的生长培养基,并将其在2μg/ml VHH.R3_DC23存在下通过有限稀释来分离逃逸病毒的单个噬菌斑。该生长培养基用于在VHH.R3_DC23存在下在6孔板中接种的Vero E6-TMPRSS2细胞单层上繁殖病毒。使用nucleospin RNA病毒试剂盒(Macherey Nagel Bioanalysis)从这些感染的细胞中制备RNA,并使用随机六聚体引物生成cDNA。该cDNA用于通过PCR扩增刺突蛋白S2编码序列。这些PCR片段经过纯化,并采用桑格测序进行测序。对获得的核苷酸序列进行分析,并使用CLC MainWorkbench20.0.4与WT SARS-CoV-2和进化枝1、2和3沙贝病毒的刺突蛋白进行比对(Letko等人,(2020)NatureMicrobiology 5:562-569)。在从Charmm-gui.org(PDB:6VXX_1_1_1模型)或SARS-CoV-2 HR2卷曲线圈结构获得的全长糖基化刺突蛋白模型上观察到突变,如使用pymol通过NMR(PDB:3FXP)确定的。

[0449] 病毒逃逸变体的生长动力学

[0450] 接种在96孔板中的Vero E6细胞用50PFU的表达GFP且具有复制能力的VSV病毒颗粒感染,这些病毒颗粒使用SARS-CoV-2刺突蛋白假型化,在逃逸选择过程中获得。使用Incucyte Zoom设备每小时监测GFP表达,并使用附带软件进行分析。

[0451] HDX-MS表位作图

[0452] 将3.33μM SARS-CoV-2 S-2P三聚体在37℃下孵育过夜。然后在1x PBS(pH 7.4,西格玛奥德里奇P4417)中,在存在或不存在6.25μM R3DC23的情况下将蛋白质稀释至1.66μM三聚体。为了开始交换,将蛋白质稀释十倍到温度平衡的氘代缓冲液中,该缓冲液通过冻干1xPBS并重悬于D2O(西格玛奥德里奇151882)中制成。在每个时间点(15秒、3分钟、30分钟、3小时)将60ul交换反应物与60ul冰冷的2x淬灭缓冲液(3.6M氯化胍、500mM TCEP、200mM甘氨酸pH2.4)混合,对样品进行淬灭。将淬灭的样品在冰上孵育1分钟,然后在液氮中快速冷冻并储存在-80℃下直至进行LC-MS。LC-MS和数据分析按先前描述的方式进行(Costello、Shoemaker等人,2022)。

[0453] HR2表达和纯化

[0454] 出于结构生物学的目的,HR2蛋白在细菌表达系统中表达。因此,将编码HR2蛋白残基H1159-K1211的合成基因克隆到pFloat-SUMO载体中,生成带His标签的SUMO-HR2融合蛋白。该构建体还含有3C蛋白酶切割位点,以除去His-SUMO标签。将pFloat-SUMO-HR2质粒转

化到BL21(DE3)细胞中,并接种在含有卡那霉素(100μg/ml)的LB琼脂平板上。将BL21(DE3)(pFloat-SUMO-HR2)单集落接种到补充有100μg/ml卡那霉素的少量LB培养物中,并在37℃下生长。随后将20ml该预培养物接种到1L LB培养物中,并在37℃下生长直至OD_{600}达到0.8。此时,使用0.5mM异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白质表达。将细胞在20℃下进一步孵育一夜,随后通过离心收获(Beckman转子8.1000,5000rpm,15分钟,4℃)。将沉淀重悬于PBS、500mMNaCl、10mM咪唑、5mMβ-巯基乙醇、0.1mg/mL 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐(AEBSF)、1μg/mL亮抑酶肽、50μg/mL DNaseI和20mM $MgCl_2$中。使用弗氏压碎器(Constant Systems)以20kpsi裂解细胞,并通过离心去除细胞碎片。将细胞裂解物上样至Ni-sepharose FF HiLoad柱(GE医疗)上,在20mM Tris-HClpH 7.5、500mM NaCl、10mM咪唑、5mMβ-巯基乙醇中平衡。使用达到500mM咪唑的线性梯度洗脱结合的蛋白质。将含有His-SUMO-HR2蛋白的级分合并,在4℃下透析至20mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl过夜,随后在室温下与3C蛋白酶孵育2小时。将切割的样品再次上样到Ni-sepharose FF HiLoad柱上,在相同的缓冲液中平衡。将含有HR2蛋白的流穿液浓缩并施加到BioRad Enrich70 10/30尺寸排阻柱(SEC),在20mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl中平衡。将含有HR2的SEC级分合并。

[0455] R3DC23-HR2结晶、X射线数据收集、处理和结构测定

[0456] 为了结晶,将R3DC23以1.2倍摩尔过量加入HR2中,并使用Amicon Ultra 3kDa截止离心过滤装置浓缩至19mg/ml。使用坐滴蒸汽扩散技术,混合0.1ul R3DC23-HR2和0.2μl底部溶液,建立结晶筛选。晶体由Molecular Dimensions Proplex结晶筛选在0.1M六水氯化镁、0.1M柠檬酸钠(pH 5.0)、15%PEG4000中生长而成。为了收集X射线数据,将晶体在液氮中快速冷冻。X射线数据在Diamond Light Source同步加速器设施(英国Didcot)的i24光束线上收集。X射线数据使用autoPROC+Staraniso处理(Vonrhin等人,2011 Acta CrystallogrD Biol Crystallogr 67:293-302;Vonrhein等人,2023 Acta Crystallographica Section A:Foundations and Advances)。使用CCP4云中的自动分子替换工作流程解析R3DC23-HR2复合物的结构(Krissinel等人,2022 Acta Cryst D 78:1079-1089)。初始模型在Coot(Emsley和Cowtan 2004 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60:2126-2132)中进一步手动构建,并使用phenix.refine(Afonine等人,2012 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 68:352-367)细化,phenix.refine来自Phenix晶体学软件套件(Adams等人,2010 Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66:213-221)。数据收集参数以及处理和细化统计如表6所示。

[0457] 表6.R3_DC23-HR2的数据收集统计和细化参数。[a]$R_{cryst}=S||F_{obs}|-|F_{calc}||/S|F_{obs}|$,$F_{obs}$和$F_{calc}$是观测到和计算出的结构因子振幅。[b]$R_{free}$与$R_{cryst}$一样,使用从细化中排除的数据的随机子集。(c)括号中的数据是最高分辨率壳层的数据

[0458]

数据集	R3_DC23-HR2
数据收集	
同步加速器	Diamond Light Source
光束线	i24
波长，Å	0.61990
数据处理	
空间群	I222
晶胞参数，Å（$\alpha=\beta=\gamma=90^{o}$）	90.413 98.8 150.763
分辨率，Å（外壳层）(c)	82.636 - 1.937 (2.052 - 1.937)
全反射	543617 (26260)
独特反射的数量	39377 (1969)
完整性（球形）	78.1 (24.9)
完整性（椭圆形）	95.2 (64.6)
多重性	13.8 (13.3)
$R_{合并}$，%	0.274 (2.04)
R_{pim}，%	0.076 (0.586)
$<I/\sigma(I)>$	8.3 (1.5)
CC(1/2)	0.990 (0.611)
镶嵌度，°	
细化	
分辨率范围，Å	82.64 – 1.94
反射的数量	39359
观察到的百分比	78.02
$R_{cryst,}$(a) %	20.81
$R_{free,}$(b) %	25.09
RMS	
键（Å）	0.024
角度（°）	3.119
拉马钱德兰图	
最优构象区域%	95.56
其他允许区域%	2.22
不允许区域%	2.22

[0459]

PDB代码	XXXX

[0460] K18-hACE2小鼠体内病毒攻击

[0461] K18-hACE2小鼠:B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J(7-9周龄)购自杰克逊实验室

(TheJackson Laboratory),并在无特定病原体(SPF)条件下室内饲养。SARS-CoV-2感染在生物安全3级(BSL3)条件下进行。使用100μl体积通过腹腔内注射进行抗体治疗。通过吸入异氟烷对动物进行麻醉,并通过气管内滴注施用$3*10^2$pFU的SARS-CoV-2 614G变体病毒(SARS-CoV-2/人/FRA/702/2020,来自欧洲病毒档案库)。由不知情观察员每天监测动物,测量体重变化并对人道终点进行评分:驼背(1分)、竖毛(1分)、开笼时动作减少(1分)、触摸时不动(2分)、神经症状(颤抖、平衡、3分)、呼吸沉重(3分)。体重减轻超过其初始体重25%或达到人道终点(评分为5分)的小鼠将被实施安乐死。

[0462] 小鼠肺匀浆中SARS-Co V-2病毒滴度的滴定

[0463] 解剖后,将右肺叶储存在-80℃下。为了定量肺病毒滴度,使用Precellys Evolution组织匀浆器(Bertin-technologies)将肺样品匀浆化。将肺匀浆在4℃下离心(1,000×g)15分钟以使其澄清,然后使用12孔板对VeroE6-TMPRSS2细胞一式两份地进行噬菌斑测定,以测定病毒滴度。将肺匀浆梯度稀释液添加到细胞后,将板在37℃下孵育2小时。随后将细胞洗涤两次,并在含有浓度为0.3%(w/v)的Avicel的培养基中孵育。在37℃下孵育2天后,去除覆盖物,用3.7%多聚甲醛(PFA)固定细胞,并用0.5%结晶紫染料染色以观察病毒噬菌斑。

[0464] 为了定量SARS-CoV-2病毒RNA水平,从肺匀浆中制备RNA并通过qRT-PCR进行分析。使用iScript™cDNA合成试剂盒和随机六聚体引物制备cDNA。根据制造商的说明,使用SARS-CoV-2研究专用(RUO)qPCR引物和探针试剂盒(IDT)进行qPCR。

[0465] 叙利亚金黄仓鼠攻击模型

[0466] 从Janvier(法国)购得体重为89.8g至132.3g的9至10周龄雄性叙利亚金黄仓鼠(Mesocricetus auratus)。每组六只仓鼠用10^2.050%组织培养物感染剂量(TCID50)/剂量SARS-CoV-2(Wuhan-Hu-1毒株)进行鼻内感染,总剂量为100μl,均等分配至两个鼻孔。在SARS-CoV2攻击后4小时(治疗环境)或感染前约24小时(预防环境),通过腹腔内注射施用指定剂量的XVR012(XVR014和XVR013的混合物)、XVR013或XVR014、帕利珠单抗(10mg/kg)或贝贝替洛单抗(10mg/kg)。以无关抗体帕利珠单抗(Synagis,抗RSV抗体)作为阴性对照,以贝贝替洛单抗作为阳性对照。仓鼠研究中使用的huR3DC23-Fc LS是由稳定细胞池产生的。每天监测仓鼠的行为、外观和体重。感染后第四天,对动物实施安乐死。尸检时,进行大体病理学检查并记录异常情况。收集来自右肺叶的样品并冷冻以进行病毒学分析。为了确定病毒滴度,在Vero E6细胞的汇合层中使用一式四份10倍梯度稀释液。为此,将样品(肺组织匀浆)的梯度稀释液在37℃下在Vero E6单层上孵育1小时。然后洗涤Vero E6单层并在37℃下孵育5或6天,之后对平板进行染色,并通过使用活力标记WST8(比色读数)基于细胞病变效应(CPE)进行评分。病毒滴度(Log10TCID50/g)使用Spearman-Karber方法计算(Kärber.1931 Archiv F.Experiment.Pathol.u.Pharmakol.162:480-483)。对于病毒滴度,检测下限(LLOD)范围在1.1至1.3log10TCID/g之间。为了检测病毒RNA,使用肺组织匀浆。分离RNA并进行TaqmanPCR。根据每次运行中包含的标准计算不同样品中的拷贝数(Log10 CP/g)。对于肺组织中的病毒RNA,LLOD为3.5Log10 CP/g。在研究开始前-2天(在异氟烷麻醉下采集约200μl血液用于血清)和感染后第4天(p.i.)尸检时采集血液样品,以进行药代动力学分析。立即将血清的血液样本转移到含有凝血激活剂的适当试管中。收集血清并冷冻保存。为了灭活任何潜在传染性物质并允许在BSL-2环境中测试血清样本,将感染后第4天的血清在56

℃下热处理30分钟。

[0467] ADCC测定/Fcγ RIIIa报告基因测定

[0468] 以表达SARS CoV-2刺突蛋白的CHO-K1靶细胞系为靶细胞,以JurkatFcγRIIIa(CD16)V176-NFAT-RE Luc为报告细胞,通过AntibodyAnalytics进行ADCC评估。

[0469] 生物层干涉法(BLI)

[0470] 生物层干涉法在Octet RED96系统(FortéBio)上进行。在使用前,将链霉亲和素(SA)生物传感器(Sartorius)浸泡在1x动力学缓冲液(10mM HEPES pH 7.4,150mM NaCl,0.1mg/ml牛血清白蛋白,0.02％Tween-20和0.02％叠氮化钠)中20分钟。将三聚体S-2P-foldon-His-Strep从-20℃解冻,并在37℃孵育24小时,然后在30℃孵育30分钟,然后以36.5μg/ml(80nM)固定在SA生物传感器上450秒,得到1.5nm至1.7nm的信号。在30℃下测量了从20nM单体R3DC23 VHH开始的两倍梯度稀释液在1x动力学缓冲液中的结合(120秒)和解离(480秒)。在分析之间,生物传感器通过三次5秒暴露于再生缓冲液(10mM甘氨酸pH 3)进行再生。根据原始数据曲线确定化学计量分析的纳米级反应。在Octet数据分析软件v9.0(FortéBio)中对动力学分析的数据进行双参考扣除并相互比对。全梯度稀释液的结合和解离均采用全局1:1模型进行拟合。

[0471] 实施例1:分离与SARS-CoV-2和SARS-CoV-1刺突蛋白在其S2亚基处结合的VHH。

[0472] 一只先前已接种MERS-CoV和SARS-CoV-1刺突蛋白的美洲驼(Wrapp,D.等人,(2020)“Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies.”Cell 181:1004-1015.e15)通过3次连续免疫接种SARS-CoV-2刺突蛋白S-2P,特别是重组融合前稳定的SARS-CoV-2-2P刺突蛋白,进行了加强免疫。

[0473] 接种疫苗后,构建了含有VHH编码序列的噬菌粒文库并用于噬菌体展示生物淘选。为了获得靶向RBD以外位点的刺突蛋白的VHH,在每一轮生物淘选中,噬菌体都与10μg/ml RBD-SD1预孵育。通过抗His抗体在ELISA板上捕获的SARS-CoV-2刺突蛋白S-2P进行两轮生物淘选后,再使用抗His捕获的SARS-CoV-2刺突蛋白S-2P(R3C和R4C)或直接包被的SARS-CoV-2-2P刺突蛋白S-2P(R3DC和R4DC)进行一或两轮生物淘选。对于获得的每个文库,挑选21或24个克隆并用于周质VHH蛋白表达。

[0474] 在大肠杆菌中生产蛋白质后,制备澄清的周质提取物并测试其与重组的融合前稳定的SARS-CoV-2刺突蛋白S-6P的结合,该蛋白质在胞外结构域(SC2 S)处包括6个脯氨酸取代(Hsieh等人,(2020)“Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2spikes.”Science 369:1501-1505)、SARS-CoV-2RBD(SC2 RBD)和S-6P的S2亚基(SC2S2)。此外,还测试了与重组稳定的SARS-CoV-1刺突蛋白(SC1 S)、MERS-CoV刺突蛋白和HKU1刺突蛋白的结合。在测试的93种VHH中,有30种能够结合SARS-CoV-2和SARS-CoV-1两者的刺突蛋白(图1)。对于所有这些VHH,结合都是针对刺突蛋白的S2亚基而不是RBD(图1)。这些VHH无法与SARS-CoV-2RBD、MERS-CoV或HKU1刺突蛋白结合,但保留了与SARS-CoV-1刺突蛋白的结合(图22A)。有趣的是,大多数结合S2的VHH可有效中和使用SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的水泡性口炎病毒(VSV)的病毒颗粒(图22B)。

[0475] 对识别SARS-CoV-2和SARS-CoV-1刺突蛋白的周质提取物的VHH编码序列进行序列分析,发现15个独特的VHH序列属于2个家族,分别包含13个(家族1)和2个(家族2)VHH(图

2)。中和VHH的序列分析表明,它们属于由13个独特VHH组成的VHH家族(家族1)。基于CDR3序列,家族1可分为7个亚家族,而最小的家族包含1个亚家族(图2B)。

[0476] 实施例2:靶向S2亚基的VHH与表达刺突蛋白的细胞表面结合。

[0477] 在家族1的每个亚家族中,在大肠杆菌WK6细胞中产生至少一个VHH,通过Ni-NTA亲和层析从周质提取物中纯化并缓冲液交换为PBS。通过完整质谱确认所生成的VHH的分子量。当校正半胱氨酸结合的形成时,每个VHH的测量质量与相应的理论质量对应(表5)。

[0478] 表5.所选VHH的理论质量(Da)和由VHH的完整质谱测量的质量。预测所有测试的VHH都含有单个半胱氨酸结合,这解释了测量VHH质量和理论VHH质量之间的-2Da差异。

[0479]

VHH	理论质量（Da）	测量质量（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

[0480]

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

[0481] 通过ELISA测试了家族1的VHH与SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1的S-6P(图3A)、RBD(图3E)和S2(图3D)以及Omicron BA.1 SARS-CoV-2的刺突蛋白(图3B)和SARS-CoV-1的刺突蛋白(图3C)的结合情况。使用RBD特异性、交叉反应单克隆抗体S309作为对照。所有测试的VHH和S309均能够与SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1、Omicron BA.1 SARS-CoV-2和SARS-CoV-1的刺突蛋白结合(图3)。虽然没有一个VHH能够结合SARS-CoV-2RBD,但它们都能识别S2亚基。相反,S309识别RBD但无法结合S2亚基。

[0482] 为了测试S2特异性VHH是否也能与细胞膜环境中的刺突蛋白结合,通过流式细胞术测试了R3 DC23和R4 DC6与用GFP表达载体单独转染或与SARS-CoV-2刺突蛋白表达载体(614G)组合转染的HEK293T细胞表面的结合。图4A示出了R3 DC23和R4 DC6均能与表面表达SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞有效结合。在未表达刺突蛋白的细胞表面未观察到这些VHH的结合(图4B),说明了它们的特异性。

[0483] 这些靶向S2的VHH还能有效识别转染哺乳动物细胞表面表达的具有完整弗林蛋白酶切割位点的SARS-CoV-2D64G、BA.1、BA.2、BA.5和BQ1.1的刺突蛋白,而无法识别MERS-CoV刺突蛋白(图23)。

[0484] 实施例3:靶向S2亚基的VHH有效中和SARS-CoV-1和SARS-CoV-2 S假型化病毒。

[0485] 用使用SARS-CoV-2(614G)刺突蛋白假型化的VSV颗粒,在中和测定中测试了结合S2的VHH中和效力。交叉中和纳米抗体VHH72-S56A用作参考(Schepens等人,(2021)Sci.Transl Med.13:eabi7826)。所测试的VHH对Vero E6细胞的中和活性(IC_{50})范围从约100ng/ml(R4_DC9)至小于1ng/ml(R3_DC23)(图5)。大多数VHH中和SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的VSV,效力约为10ng/ml(EC_{50})。

[0486] 病毒附着后,刺突蛋白在融合肽前的S2'位点被切割。这使得融合肽能够插入靶细胞的膜中以启动膜融合。在表面表达TM蛋白酶丝氨酸2(TMPRSS2)的细胞中,融合可在质膜上发生。在缺乏TMPRSS2的细胞诸如Vero E6细胞中,S2'被组织蛋白酶L切割后,融合发生在内体中。为了测试当病毒融合发生在宿主细胞质膜时,结合S2的VHH是否也能进行中和,还在表达人TMPRSS2的VeroE6细胞(VeroE6-TMPRSS2)上研究了它们的中和活性。图6表明,对于所有VHH,与缺乏TMPRSS2的Vero E6细胞相比,Vero E6-TMPRSS2细胞上的中和活性非常相似或更高(图5)。

[0487] 还用使用SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的、具有复制能力的VSV确认了VHH的中和活性(图7)(Koenig等人,(2021)Science 371:eabe6230)。

[0488] 为了探究家族1 VHH的中和活性的广度,进行了使用Omicron BA.1变体或SARS-CoV-1的刺突蛋白假型化的VSV的中和测定。图8和图9表明,与Omicron BA.1变体和SARS-CoV-1的刺突蛋白有效结合(图3)一致,家族1 VHH也能有效中和使用相应病毒刺突蛋白假型化的VSV颗粒。为了测试靶向S2的VHH是否也能中和较新的BA.2 Omicron变体,还测试了R3_DC23和R4_DC6预防使用SARS-CoV-2 Omicron BA.2和Omicron BA.1变体刺突蛋白以及614G刺突蛋白假型化的VSV颗粒的感染的能力。图10表明,R3 DC23和R4_DC6均可预防使用Omicron BA.2刺突蛋白假型化的VSV颗粒的感染,与使用Omicron BA.1刺突蛋白或使用SARS-CoV-2的614G刺突蛋白假型化的病毒颗粒的感染一样有效。

[0489] 为了评估分离的S2亚基靶向VHH的中和效力和广度,使用展示SARS-CoV-2D614G、-BA.2、-BA.5、-XBB或-BQ1.1刺突蛋白的VSV假型进行中和测定。所有VHH均能有效中和这些SARS-CoV-2刺突蛋白假型,对于Vero-E6和VeroE6/TMPRSS2细胞中的SARS-CoV-2,IC_{50}范围为1.2ng/ml(R3DC23)至68.9ng/ml(R4DC9)(80.0pM-4680pM),从而允许病毒进入细胞表面(图24、图6)。VHH-R3DC23是最有效的中和S2结合剂之一,对于SARS-CoV-2D614G,IC_{50}接近1ng/ml,对于测试的omicron变体,IC_{50}为2.9ng/ml-5.7ng/ml(图24,图6=TMPRSS2细胞)。结合S2的VHH也中和了复制型VSVSARS-CoV-2刺突蛋白假型,其效力与复制缺陷型假型相似(图25)。根据其结合特性,分离的VHH还能中和携带SARS-CoV-1刺突蛋白的假型(图24)。

[0490] 实施例4:靶向S2亚基的VHH在体外有效中和真实的SARS-CoV-2 614G和OmicronBA.1变体。

[0491] 为了测试所选的靶向S2的VHH是否也能有效中和真实的SARS-CoV-2病毒,使用SARS-CoV-2 614G和SARS-CoV-2 Omicron BA.1变体病毒进行噬菌斑减少测定。将属于两个不同亚家族的R3_DC23或R4_DC6的梯度稀释液与约40PFU的两种病毒变体在37℃下预孵育1小时,随后用于感染Vero E6-TMPRSS2细胞。抗体S309是已知能够有效中和Alpha和Omicron BA.1变体的少数抗体之一,用作阳性对照。图11表明,R3_DC23和R4_DC6都能比S309更有效地中和614G和Omicron BA.1病毒,其IC_{50}值(对于SARS-CoV-2D614G为4.325±3.490ng/ml,对于SARS-CoV-2BA.1为4.711±1.980ng/ml,n=3)与对于假型化VSV颗粒获得的值非常相似(图5至图10)。

[0492] 实施例5:靶向S2亚基的VHH不会引起S1刺突蛋白亚基的脱落。

[0493] 用使用刺突蛋白假型化的非复制型VSV颗粒进行的中和测定表明,分离的S2特异性VHH可阻断病毒进入。靶向RBD的抗体可通过与ACE2直接竞争RBD结合或过早引发S1脱落来阻断病毒附着,从而阻止病毒进入。按照S1亚基负责受体结合的观点,靶向S2的

VHHR3DC23不会阻止纯化的ACE2-Fc与重组SARS-CoV-2刺突-2P蛋白的结合(图26A)。为了测试结合S2的VHH是否可诱导S 1脱落,用结合S2的VHH处理在表面表达SARS-CoV-2刺突蛋白的Raji细胞。已知分别诱导和不诱导S1脱落的CB6和S309单克隆抗体用作阳性对照和阴性对照。此外,GFP结合VHH(GBP)用作阴性对照。对抗体孵育后收集的细胞培养基和细胞沉淀的蛋白质印迹分析显示,与S309类似,没有任何VHH能够诱导S1脱落(图12)。

[0494] 单克隆抗体CB6和VHH72_S56A诱导S1脱落,而R3C4和R3DC23则无法诱导(图26B)。与此一致,R3DC23不能阻止ACE2-Fc与表达SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞结合,而VHH72_S56A则阻止了这种相互作用(图26C)。这些结果强烈表明S2特异性VHH阻止病毒附着后进入。

[0495] 实施例6:靶向S2亚基的VHH阻断融合。

[0496] 除了病毒附着之外,抗体还可通过干扰刺突蛋白介导的融合来阻断病毒进入。为了测试所选的VHH(R3_DC23)是否会干扰融合过程,用低感染复数(MOI)的、表达GFP的、具有复制能力的VSV刺突蛋白(使用SARS-CoV-2Wuhan-Hu-1刺突蛋白假型化的VSV-delG病毒)感染Vero E6-TMPRSS2细胞,并在4小时后用10μg/ml R3_DC23处理。已知会干扰病毒融合的人单克隆抗体S309(索托韦单抗)用作阳性对照(Lempp等人,(2021)Nature 598:342-347)。靶向GFP的VHH(GBP)和RSV中和抗体帕利珠单抗用作阴性对照。此外,与ACE2竞争RBD结合的有效中和抗体CB6(埃特司韦单抗)也被纳入作为参考(Shi等人,(2020)Nature 584:120-124)。感染过夜后,固定细胞并通过酶标仪和显微镜分析来分析GFP表达。图13A示出了用GBP对照VHH和对照抗体帕利珠单抗处理的细胞形成大的GFP表达合胞体。在用中和CB6抗体处理的细胞中也观察到大的GFP表达合胞体。对于用S309抗体处理的样品,观察到较小的合胞体。与此形成鲜明对比的是,对于用靶向S2的VHHR3_DC23处理的样品,仅可观察到单个GFP表达细胞(图13A)。R3_DC23导致合胞体形成的减少也反映在这些样品中GFP表达水平的明显降低(图13B)。这说明了靶向S2的R3_DC23通过强烈抑制病毒融合来阻止合胞体形成并抑制感染的能力。

[0497] 为了确定分离的靶向S2的VHH的效力,在不同浓度的R3_DC23、R3_DC20和R3_C4下测试了其在感染后阻止合胞体形成的能力。在用10μg/ml靶向S2的VHH处理的孔中没有合胞体,只能观察到单个感染细胞(图14A)。相反,在该浓度下,S309处理不能阻止而是在一定程度上抑制合胞体的形成(图14A)。在0.4μg/ml时,R3_DC23仍然能够阻止合胞体形成,而用R3_DC20或R3_C4处理的样品中存在的合胞体比用GBP或S309处理的样品中的合胞体更小(图14A)。观察到的靶向S2的VHH对合胞体形成的强烈抑制也清楚地反映在GFP表达的强浓度依赖性抑制中(图14B)。对于每个VHH或单克隆抗体梯度稀释液,使用线性回归曲线拟合(log(抑制剂)vs.标准化反应,具有可变斜率)计算IC_{50}。平均IC_{50}计算值(N=2):对于CB6为8.026μg/ml;对于S309为:0.4064μg/ml;对于R3_C4为:0.02092μg/ml;对于R3_DC20为:0.01104μg/ml;对于R3_DC23为:0.007840μg/ml。根据中和数据,R3_DC23是此融合抑制测定中最有效的VHH。

[0498] 为了更直接地测试融合抑制,研究了靶向S2的VHH是否可阻断由SARS-CoV-2刺突蛋白表达诱导的VeroE6细胞融合。为此,用SARS-CoV-2刺突蛋白表达载体与GFP表达载体组合转染Vero E6细胞,2小时后用VHH或抗体处理。用GFP表达载体与对照表达载体组合转染的细胞用作对照。图15表明,正如预期的那样,SARS-CoV-2刺突蛋白在VeroE6中的表达导致表达GFP的合胞体的形成。与使用RSV特异性对照抗体帕利珠单抗或PBS的治疗相比,使用

S309抗体的治疗在一定程度上减少了合胞体的形成。然而,在用分离的靶向S2的VHH R3_DC23和R3_C4的处理的样品中,合胞体形成几乎完全被阻止(图15)。这些数据一致表明,分离的靶向S2的VHH通过有效干扰刺突蛋白介导的膜融合来预防感染。

[0499] 测试了R3DC23是否可阻断VeroE6/TMPRSS2细胞感染具有复制能力的、表达GFP的、使用SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的VSV后形成合胞体。感染四小时后添加R3DC23有效(IC_{50}=9.2±2.6ng/ml)阻止合胞体形成,而使用S309则观察到中度抑制(IC_{50}=328.1±110.8ng/ml)(图26D)。通过延时成像监测R3DC23对共表达刺突蛋白和GFP的VeroE6细胞融合动力学的影响。与仅表达GFP的细胞的孔相比,表达GFP和刺突蛋白的细胞的孔在转染24小时后GFP阳性细胞的面积显著增加,反映了合胞体的形成。然而,这种增加被R3DC23严重削弱(图26E)。实施例7:分离的VHH与膜近端HR2的S2亚基结合。

[0500] 将Vero E6-TMPRSS2单层接种于96孔板中,用约200PFU的表达GFP的、具有复制能力的VSVdelG-刺突蛋白病毒感染,并用10μg/ml的R3_DC23处理。使用VSV-刺突蛋白代替真实的SARS-CoV-2病毒,因为VSV的复制明显更容易出错。GFP用于监测合胞体形成和病毒复制。在10μg/ml时,R3_DC23 GFP完全阻断了合胞体形成和WT病毒的第二轮感染(也参见实施例6)。因此,在最初感染的细胞外存在10μg/mlR3_DC23的情况下,合胞体的形成或复制可能表明病毒逃逸。收集显示明显合胞体形成或病毒复制的孔的生长培养基,并用于制备与R3_DC23(2μg/ml)或培养基混合的梯度稀释液。选择了显示在没有和存在R3_DC23的情况下病毒复制的梯度稀释液。从这些梯度稀释液中选出包含单个噬菌斑的孔,并在2μg/ml R3_DC23存在下在6孔板中的Vero E6-TMPRSS2细胞上进一步繁殖,以进行序列分析。对9个病毒克隆的S2编码序列进行测序,并将其与在没有R3_DC23的情况下平行生长的亲本病毒的编码序列进行比较。

[0501] 每个病毒克隆都显示出单个非沉默点突变,这些突变都位于刺突蛋白柄的靠近病毒膜七肽重复区2(HR2)内(图16)。在HR2内的4个位置上发现了以下5个取代:N1192D(1/9)、L1197P(2/9)、L1200P(1/9)、Q1201R(4/9)和Q1201K(1/9)。括号中的数字表示在9个选定的逃逸变体中观察到的每个取代的频率。

[0502] 2022年4月13日对全球共享禽流感数据倡议(GISAID)数据库的搜索显示,在10.247.044个序列中,只有247、49、20、358和3865个序列分别具有N1192D、L1197P、L1200P、Q1201R和Q1201K取代。位置N1192、L1197、L1200和Q1201分别仅突变了1459、790、1762和5931次。

[0503] 值得注意的是,位置N1194处的潜在N-糖基化位点位于包含突变(AA1192-Q1201R)的受限线性序列内。位点特异性质谱分析显示该位点几乎100%糖基化(Watanabe等人,(2020)Science369:330-333)。不希望受任何理论的束缚,常规抗体可能很难到达如此狭窄的表位。

[0504] 对进化枝1、2和3沙贝病毒S2茎区序列分析表明,该序列在沙贝病毒中高度保守(图17)。

[0505] 实施例8:靶向HR2的VHH.R3_DC23、VHH.R3_C4和VHH.R4DC20的Fc融合可有效结合细胞表面表达的刺突蛋白并有效中和SARS-CoV-2。

[0506] 产生了靶向HR2的VHH R3_DC23的Fc(YTE)融合体,并测试了它们与表面表达SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞的结合。HEK293T细胞用GFP表达载体单独或与SARS-CoV-2刺突蛋白

表达载体(614G)组合转染,并通过流式细胞术测试R3_DC23-Fc(YTE)结合。图18表明R3_DC23-Fc(YTE)可非常有效地与表面表达SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞结合。与此形成鲜明对比的是,当R3_DC23-Fc(YTE)浓度增加至100μg/ml时,未观察到其与未表达SARS-CoV-2刺突蛋白的对照细胞结合。

[0507] 为了测试R3_DC23-Fc(YTE)的中和活性,用使用SARS-CoV-2的刺突蛋白(614G)或Omicron BA.2和Omicron BA.1变体的刺突蛋白假型化的VSV报告病毒进行中和测定。图19表明R3_DC23-Fc(YTE)可有效中和使用SARS-CoV-2(614G)和Omicron BA.1变体的刺突蛋白假型化的VSV颗粒,EC50为1ng/ml,而使用Omicron BA.2刺突蛋白假型化的VSV颗粒的EC50仅为0.35ng/ml。这表明VHH-Fc融合体可有效识别所鉴定的膜近端表位(参见实施例7),并且可以优异的效力中和SARS-CoV-2及其变体。

[0508] 与R3DC23类似,另外两个相关VHH(R3C4和R4DC20)的框架区被人源化,N末端谷氨酰胺被天冬氨酸残基取代,并且这些结合S2的VHH与人IgG1-Fc_YTE基因融合。在哺乳动物细胞中产生人源化构建体huR3DC23-Fc(SEQ ID NO:96)、huR3C4-Fc(SEQ ID NO:130)和huR4DC20-Fc(SEQ ID NO:131),并与它们的单价对应物进行比较,用于中和展示SARS-CoV-2 614G和BA.5的刺突蛋白的假型化VSV。SEQ ID NO:130和131所定义的序列也如下所示。

[0509] SEQ ID NO:130

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAIRWSG
GTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYR
ASGLYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT

[0510] LYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0511] SEQ ID NO:131

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVASIRWSG
GTTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYR
NSGLYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT

[0512] LYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0513] 对于这些VHH中的每一种,人源化Fc融合体比其单价形式更有效地中和SARS-CoV-2 614G和BA.5,其中huR3DC23-Fc最有效。此外,R3DC23的人源化不会影响huR3DC23-Fc的中和活性(图30B)。生物制品开发的一个重要参数是其溶解度。因此,通过疏水相互作用色谱研究了VHH-Fc融合体的疏水性。在三种人源化VHH-Fc融合构建体中,huR3DC23-Fc在疏水相互作用色谱上的保留时间最短,低于其非人源化对应物,且远低于经临床验证的VHH-Fc XVR011。这些数据表明,基于溶解度和中和活性,huR3DC23-Fc最有利于进一步开发(图

30E)。与SARS-CoV-2 614G和BA.5类似,huR3DC23-Fc也能有效中和展示SARS-CoV-2BA.1、BA.2、BA2.75、BA4.6、BQ1.1和XBB的刺突蛋白的VSV假型,IC_{50}值接近甚至低于1ng/ml(图30C)。此外,huR3DC23-Fc还能有效中和真实的SARS-CoV-2D614G和BA.1(图30D)。

[0514] 实施例9:靶向HR2的VHH.R3_DC23的Fc融合体可保护小鼠免受SARS-CoV-2致命的病毒攻击

[0515] 在上皮细胞表面表达人ACE2的K18-hACE2小鼠在用614G SARS-CoV-2病毒进行致命的感染前1天,用100μg R3_DC23-Fc或100μ同种型对照IgG(帕利珠单抗)进行处理。未处理的感染小鼠作为对照。图21表明,与用同种型对照抗体处理的小鼠或未处理的小鼠形成鲜明对比的是,所有用R3_DC23-Fc处理的小鼠均在攻击中存活下来并且没有表现出明显的体重减轻,这表明R3_DC23-Fc可保护小鼠免受SARS-CoV-2的致命的病毒攻击。

[0516] 实施例10:结合S2的VHH与七肽重复2的膜近端区域结合(逃逸病毒选择实验)

[0517] 根据实施例6选择逃逸病毒。具有突变L1197P、L1200P或Q1201R的逃逸病毒完全抵抗R3DC23中和,而N1192D突变病毒仍然对R3DC23的中和敏感,特别是在VeroE6细胞上(图27A和图27B)。与此一致,R3DC23仍然可与具有N1192D取代的细胞表面表达的刺突蛋白结合,而与具有任何其他逃逸选择突变的刺突蛋白突变体的结合则丧失(图27C)。

[0518] 逃逸病毒中消除R3DC23结合的氨基酸被限制在位于病毒膜和位置N1194的大的四触角N-聚糖之间的刺突蛋白部分。SARS-CoV-2的完整HR2与SARS-CoV-1的相同,但在MERS和HKU1中有所不同。特别地,MERS和HKU-1的HR2都含有Q1201K突变,该突变通过病毒逃逸突变体获得,并且完全消除了R3DC23的结合和中和。不希望受任何理论的束缚,这可能解释了R3DC23和相关VHH无法识别MERS和HKU-1刺突蛋白。在SARS-CoV-2刺突蛋白融合前构象中,HR2的膜近端部分组装成3个平行α螺旋的卷曲线圈结构,在转变为融合后构象时,这些螺旋最初解体,然后通过与HR1卷曲线圈结构拉上拉链使病毒和宿主细胞膜接近,形成稳定的6螺旋束(6HB)。膜近端HR2区域在融合过程中的这一关键功能解释了为什么VSV假型R3DC23逃逸病毒都是高度减毒的(图27D)。根据SARS-CoV-1 HR2的可用NMR结构,Q1201朝外取向,但是L1197和L1200都朝向卷曲线圈结构的中心取向(图27E)。这表明R3DC23结合HR2的开放构象,或者位置1197和1200处的亮氨酸不与R3DC23直接接触,但是这些位置上对脯氨酸的取代对HR2卷曲线圈结构的折叠具有显著影响。为了解决这个问题,我们用L1197F、L1197A、L1200V或L1200A取代脯氨酸来评估R3DC23与刺突突变蛋白的结合,脯氨酸被认为是螺旋断裂剂。R3DC23可与具有L1197F、L1197A、L1200V或L1200A取代的刺突蛋白结合,表明完整的HR2卷曲线圈结构三级结构对于其结合而言至关重要(图27F)。

[0519] 实施例11:结合S2的VHH与七肽重复2的膜近端区域结合(HDX-MS)

[0520] 为了进一步确认R3DC23的表位,在存在和不存在R3DC23的情况下,在重组SARS-CoV-2刺突蛋白上进行通过质谱监测的氢-氘交换(HDX-MS)。发现残基1187至1205的两个相邻肽(肽(1187-1199)和肽(1200-1205))在R3DC23存在下受到高度保护(图27G)。重要的是,病毒逃逸变体获得突变的所有4个位置都位于这两个肽内。与该区域中纳米抗体与刺突蛋白的结合一致,在该蛋白质的任何其他区域中没有观察到这种高度保护(图27H)。这些数据一致地表明,R3DC23与HR2的膜近端区域结合。

[0521] 实施例12:R3DC23结合HR2中的四级表位(晶体结构)

[0522] 为了详细了解R3DC23与其靶标之间的相互作用,我们解析了R3DC23与跨越完整

HR2(H1159-K1211)的肽的复合物的晶体结构。晶体不对称单元显示与三个R3DC23分子复合的HR2卷曲线圈结构三聚体,每个分子结合两个HR2肽之间的界面(图28A)。R3DC23结合位点跨越残基N1192至Y1206,包含HR2的C末端区域(图28A至图28C)。R3DC23结合两个相邻的HR2螺旋,对于螺旋(i)包含407Å^{2}掩埋表面积、8个氢键、2个盐桥和-4.7kcal/mol的计算的复合物形成的溶剂化自由能增益^{i}G(即疏水对结合的贡献),对于螺旋(ii)包含461Å^{2}掩埋表面积、6个氢键、1个盐桥和-2.4kcal/mol的计算的^{i}G(图28C、图28E)。VHH CDR3形成复合物中的主要接触面,其中N100a和Y100b与螺旋(ii)中的N1194、Q1201和E1202以及螺旋(i)中的S1196形成广泛的氢键网络,Y96与螺旋(ii)主链羰基发生氢键接触,S98与螺旋(i)中的E1195发生氢键相互作用,并且V97结合由螺旋(i)中的L1200和L1203形成的疏水性补丁。VHHCDR1和CDR2分别参与疏水相互作用和两个具有螺旋(i)的盐桥(R52-D1199)(图28C、图28E)。将Q1201鉴定为R3DC23逃逸突变体与其在具有CDR3的氢键网络中的中心部分一致。然而,L1197和L1200并不与R3DC23直接接触,这表明它们作为逃逸位置的活性是间接的,可能是由于HR2卷曲线圈结构界面上相邻的结合表位不稳定和/或构象调整所致。R3DC23复合物中HR2三聚体的构象与融合前形式的S蛋白中所见的构象紧密匹配(图28B),其中它对应于膜与HR2和被N-糖基化覆盖的接头区域之间约3nm高的区域(图28A)。在融合后形式中,HR2重排以结合HR1卷曲线圈结构的表面,从而破坏成对的HR2接触并导致HR2 C末端区域部分解折叠(图28A、图28D)。这种重排破坏了R3DC23结合位点。相反,R3DC23与HR2卷曲线圈结构的界面结合可能对融合前S蛋白发挥稳定活性。

[0523] 实施例13:R3DC23结合HR2中的四级表位(ELISA)

[0524] 为了测试R3DC23是否识别HR2卷曲线圈结构内的单个HR2α-螺旋或四级表位,测试了此VHH与全长刺突蛋白的结合,该全长刺突蛋白通过T4 fibritin(折叠子)三聚化结构域和SUMO-HR2肽稳定在三聚体构象中,该SUMO-HR2肽通过SEC-MALS分析显示为单体。尽管R3DC23与三聚体刺突蛋白的结合与被包被的全长刺突蛋白的量直接相关,但是当以高密度包被时,R3DC23仅与单体SUMO-HR2结合(图29)。这强烈表明R3DC23与包含超过1个HR2 α螺旋的HR2卷曲线圈结构内的四级表位结合。

[0525] 实施例14:人源化R3DC23 Fc融合体的LS突变体有效中和多种SARS-CoV-2变体。

[0526] 除YTE Fc变体之外,LS(M428L/N434S)突变也增加工程化抗体在低pH下对FcRn的亲和力,从而延长工程化抗体的半衰期。因此,生成了构建体,其中人源化形式的R3_DC23通过$(G_4S)_2$接头(SEQ ID NO:121)与含有LS突变的人IgG1 Fc在N末端融合(R3_DC23hum-Fc(LS)或huR3DC23-Fc_LS或XVR013)(SEQ ID NO:118)。

[0527] R3_DC23hum-Fc(LS)或huR3DC23-Fc_LS或XVR013:

[0528] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGRIFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAVRWG

[0529] AGTIYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYVSKANYGSLWY
QDSRRYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO: 118）

[0530] 类似地,对于YTE Fc变体(huR3DC23-Fc)所观察到的(图30E),huR3DC23-Fc_LS显示出低的表观疏水性(图31A),并且从SEC在44kDa和158kDa摩尔质量标记之间的单峰中洗脱,这与完全组装的VHH-Fc一致(图31B)。

[0531] 该构建体有效中和展示SARS-CoV-2D614G、BQ1.1和XBB刺突蛋白的假型化VSV,其IC_{50}值与含有YTE突变的huR3DC23-Fc的观察值相似(表7和图30C)。此外,huR3DC23-Fc_LS还有效中和了使用SARS-CoV-2BA.4.6、BF.7和XBB刺突蛋白假型化的VSV,其中应用了导致XBB1.5对ACE2具有更高亲和力的额外突变(XBB.1.5-G252V)(表7)。相反,但与之前报道的一致,索托韦单抗和贝特洛韦单抗对XBB和BQ1.1的中和活性显著降低。(Imani NEJM2023)。

[0532] 表7:huR3DC23-Fc_LS、索托韦单抗和贝贝替洛单抗对使用SARS-CoV-2变体614G、BA4.6、BF.7、BQ1.1、XBB和XBB.1.5(-G252V)的刺突蛋白假型化的VSV的中和。显示了通过非线性回归曲线拟合(log(抑制剂)vs.标准化反应)(四参数)计算的平均IC_{50}值(ng/mL)。(*)贝贝替洛单抗生物仿制药和索托韦单抗生物仿制药用作阳性对照。(ND*)由于在贝贝替洛单抗的测试浓度范围(0.0064ng/ml-20ng/m1)内缺乏中和活性,因此无法计算IC_{50}值。

[0533]

IC50 ± SD (ng/mL)	huR3DC23-Fc_LS	索托韦单抗*	贝贝替洛单抗*
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*

[0534] 此外,真实的SARS-CoV-2D614G、Delta、BA.1、BA.2和BA.5病毒也被huR3DC23-Fc_LS有效中和,IC_{50}为2.1ng/ml至3.7ng/ml,接近在使用真实的D614G和BA.1 SARS-CoV-2病毒进行的病毒中和测定中对单价R3DC23 VHH和携带YTE突变的huR3DC23-Fc观察到的结果(表8和图11和图30D)。

[0535] 表8:通过微量中和测定确定的huR3DC23-Fc LS、索托韦单抗、西加韦单抗和贝贝替洛单抗对真实的SARS-CoV-2病毒(614G、Delta、Omicron BA.1和Omicron BA.2)的中和。该表显示了基于Zielinska方法计算的几何平均IC_{50}值(ng/mL)和几何SD因子(GSD因子)。(ND*)无法确定索托韦单抗在测试浓度范围内(0.128ng/ml-10 000ng/ml)的IC_{50}值。(NT*)未针对Omicron BA.5测试西加韦单抗。(*)针对BA.1的西加韦单抗的IC_{50}基于2次生物学重复,其中最高浓度的西加韦单抗(500ng/m1)导致病毒复制减少50%以上,但在第三次生物学重复中并非如此。

[0536]

GM IC_{50} (ng/mL) (GSD因子)	huR3DC23-Fc_LS	索托韦单抗生物仿制药	西加韦单抗生物仿制药	贝贝替洛单抗生物仿制药
D614G (n=3)	2.5 (1.5)	205.4 (1.2)	30.9 (1.2)	3.8 (1.5)
Delta (n=3)	3.6 (1.2)	141.1 (1.3)	28.8 (1.1)	1.6 (1.5)
Omicron BA.1 (n=3)	3.8 (1.2)	1101.3 (2)	156.5 (2)	2.5 (1.8)
Omicron BA.2 (n=3)	2.0 (1.6)	7147.7 (1.3)	21.2 (1.3)	1.7 (1.4)
Omicron BA.5 (n=3)	3.6 (1.1)	ND*	NT*	2.4 (1.5)

[0537] 实施例15:人源化R3DC23 Fc融合体的LS突变体控制仓鼠中的病毒复制

[0538] 评估了huR3DC23-Fc在叙利亚仓鼠模型中的治疗潜力。用祖先SARS-CoV-2分离株(BetaCoV/Munich/BavPat1/2020)攻击仓鼠,4小时后,通过腹腔内注射10mg/kg或2mg/kg huR3DC23-Fc_LS、10mg/kg贝特洛韦单抗(生物仿制药)或10mg/kg帕利珠单抗(阴性对照处理)。感染后4天,在所有用2mg/kg处理的仓鼠和用10mg/kg该构建体处理的4只仓鼠中均检测到高水平的huR3DC23-Fc_LS(数据未显示)。与此形成鲜明对比的是,在用10mg/kg huR3DC23-Fc_LS处理的两只动物的血清中未检测到或检测到非常低水平的huR3DC23-Fc_LS。这很可能是由于注射不成功造成的,其他人也观察到了这种情况(Starr等人,2021 Nature 597:97-102)。除了这2只仓鼠外,在攻击后第4天取样的肺病毒载量在huR3DC23-Fc处理的仓鼠中低于检测限,而对照处理的动物则具有显著更高的肺病毒载量(图31D)。根据用huR3DC23-Fc_LS或贝贝替洛单抗处理的仓鼠肺,观察到病毒RNA的显著减少(图31E)。该实验表明,结合S2的huR3DC23-Fc可强烈限制SARS-CoV-2的体内复制。

[0539] 实施例16:R3_DC23-Fc(LS)对FcRn的亲和力评估

[0540] 为了确认R3DC23 VHH-Fc构建体中引入的LS突变也与人新生儿受体FcRn的高亲和力相关,通过表面等离子体共振(SPR)确定了huR3DC23-Fc-LS对FcRn的动力学参数和平衡解离常数(K_D)(表9)。在测定中使用贝贝替洛单抗生物仿制药和人IgG1同种型对照抗体作为对照。

[0541] 表9:R3_DC23-Fc(LS)、贝贝替洛单抗和人IgG1同种型对照抗体在pH6.0和7.4时对FcRn的动力学参数和平衡解离常数(K_D)。RU:共振单位;RUmax:最大共振单位。*1500nM下的RUmax;N/D:未测定。

[0542]

	FcRn pH 6.0				FcRn pH 7.4	
	浓度范围	稳态亲和力		1:1结合模型亲和力	浓度范围	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
贝贝替洛单抗	1500-7.8 nM	57.1	19.4	N/D	N/D	1500-7.8 nM	8.2
huIgG1 同种型对照	1500-7.8 nM	37.5	15.0	N/D	N/D	1500-7.8 nM	16.2

[0543] 在pH 6.0时,与对照贝贝替洛单抗生物仿制药相比,huR3DC23-Fc-LS表现出对FcRn的改善的稳态亲和力。在3.5nM-4.5nM(分别为稳态亲和力和1:1结合模型)时,huR3DC23-Fc_LS对人FcRn的亲和力为不携带LS突变的IgG1同种型和贝贝替洛单抗生物仿制药对照对人FcRn的亲和力的1/3至1/5(图31C和表7)。由于结合和解离速度较快,无法应用1:1结合模型来确定对照抗体的结合和解离速度。对于R3_DC23-Fc(LS),通过稳态和1:1结合模型计算的亲和力值是一致的。在pH7.4时,如对所有测试项目所预期的,观察到与FcRn的结合非常低。

[0544] 实施例17:R3_DC23-Fc(LS)与SARS-CoV-2刺突蛋白结合的特异性

[0545] 为了评估特异性脱靶结合的缺乏,使用固定的人HEK293细胞通过人质膜蛋白细胞阵列筛选R3_DC23hum-Fc(LS),分别表达6101个全长人质膜蛋白、分泌的和细胞表面束缚的人分泌蛋白以及另外的396个人异二聚体和SARS-CoV-2刺突蛋白。在预筛选中,对R3_DC23hum-Fc(LS)与固定的未转染HEK293细胞以及覆盖有SARS-CoV-2刺突蛋白的细胞的结

合水平的研究表明,2.5μg/mL的R3_DC23hum-Fc(LS)是合适的筛选浓度。在文库筛选中,筛选了包括R3_DC23hum-Fc(LS)的测试抗体池。在确认筛选中,每个文库相互作用与2个对照受体一起重新表达,并用R3_DC23hum-Fc(LS)或对照处理重新测试。这在固定细胞和活细胞上都进行过。

[0546] R3_DC23hum-Fc(LS)在固定细胞微阵列上显示出与主要靶标SARS-CoV-2刺突蛋白的单一显著特异性相互作用(图32)。在活细胞微阵列上未观察到显著的特异性相互作用(由于技术限制,无法在活细胞微阵列上发现SARS-CoV-2刺突蛋白)(数据未显示)。这些数据表明R3_DC23hum-Fc(LS)对其主要靶标:SARS-CoV-2刺突蛋白的高度特异性。

[0547] 实施例18:基于靶向S1和S2的VHH的多特异性构建体的生成

[0548] 生成了双特异性串联(TD)VHHx-VHHy-Fc构建体,其中靶向S2的VHH(特别是人源化形式的VHHR3_DC23)和靶向S1的VHH(特别是人源化形式的VHH3.117)通过10、20或30GS接头(特别是$(G_4S)_2$(SEQ ID NO:121)、$(G_4S)_4$(SEQ ID NO:123)或$(G_4S)_6$(SEQ ID NO:120))头尾融合,该头尾融合构建体通过10 GS接头($(G_4S)_2$(SEQ ID NO:121))与Fc结构域融合(TDR3DC23-117(10)-Fc(SEQ ID NO:112)、TDR3DC23-117(20)-Fc(SEQ ID No:113)和TDR3DC23-117(30)-Fc(SEQ ID NO:114),分别对应于图33(A)、图33(B)、图33(C))。

[0549] 类似地,生成了三特异性串联VHHx-VHHy-VHHz-Fc构建体,其中靶向S2的VHH(特别是人源化形式的VHHR3-DC23)、结合或竞争VHH3.117表位的靶向S1的VHH(特别是人源化形式的VHH3.117)以及结合或竞争VHH72表位的靶向S1的VHH(特别是人源化形式的VHH3.83)通过20GS接头($(G_4S)_4$(SEQ ID NO:123))头尾融合,该头尾融合构建体通过10 GS接头($(G_4S)_2$(SEQ ID NO:121))与Fc结构域融合(TD R3DC23-117-83(20)-Fc(SEQ ID NO:117和图33(F))。

[0550] 此外,还生成了对照双特异性构建体,其中结合或竞争VHH72表位的靶向S1的VHH(特别是人源化形式的VHH3.83)和结合或竞争VHH3.117表位的靶向S1的VHH(特别是人源化形式的VHH3.117)通过20GS接头($(G_4S)_4$(SEQ ID NO:123))头尾融合,该头尾融合构建体通过10 GS接头($(G_4S)_2$(SEQ ID NO:121))与Fc结构域融合(TD 83-117(20)-Fc(SEQ ID NO:116)和图33(E))。SEQ ID NO:116定义的序列还如下所示。

[0551] DVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCVLSGGVFTSYAMGWFRQAPGKEREFLAAITFNS
DATYYADSVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLRPEDTAVYSCAAGGNHYNPQYYHDYD
KYDHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGGSLRLS
CAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVY
LEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLELWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG（SEQ ID NO:
116）

[0552] 生成了四价双特异性VHHx-Fc-VHHy融合构建体(本文中也称为moonlander构建体),其中两个分别靶向S1和S2的VHH,特别是分别为人源化形式的VHH R3_DC23和人源化形

式的VHH3.117,分别通过10 GS接头(($G_4S)_2$(SEQ ID NO:121))和15GS接头(($G_4S)_3$(SEQ ID NO:122))与Fc结构域的N末端和C末端分别融合(R3DC23-Fc-117(SEQ ID NO:115)和图33(D))。

[0553] 使用的Fc结构域是含有LS突变(M428L与N434S结合)的人IgG1 Fc。

[0554] 图33显示了不同构建体的示意图。

[0555] 构建体在巴斯德毕赤酵母和/或CHO细胞或任何另选合适的产生宿主中表达,然后进行纯化和生物化学和生物物理表征,如本文所述和/或技术人员已知的。

[0556] 实施例19:靶向S1和S2的结合剂中和SARS-CoV-2变体D614G、Omicron BA.2和BA.5(活病毒测定)

[0557] 在活病毒测定(微量中和法)中测试了实施例18中生成的靶向S1和S2的多特异性构建体的中和效力。所有多特异性构建体均能够中和测试的变体(614G、Omicron BA.2和Omicron BA.5)(表10)。

[0558] 表10:通过微量中和法确定的实施例18中生成的靶向S1和S2的多特异性构建体对真实的SARS-CoV-2变体(614G、Delta、Omicron BA.2和Omicron BA.5)的中和。显示了几何平均IC_{50}值(ng/mL)。

[0559]

		D614G (n=3)	Omicron BA.2 (n=3)	Omicron BA.5 (n=3)
	构建体	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

[0560] 实施例20:靶向S1和S2的结合剂的组合物(XVR012)中和使用SARS-CoV-2刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒

[0561] 生成了VHH-Fc构建体,其中人源化形式的R3_DC23通过$(G_4S)_2$接头(SEQ ID NO:121)与含有LS突变的人IgG1 Fc在N末端融合(XVR013)(SEQ ID NO:118)。生成了VHHx-Fc-VHHy构建体,其中能够结合或竞争VHH3.117表位的人源化形式的靶向S1的VHH3.117通过$(G_4S)_2$接头(SEQ ID NO:121)与含有LS突变的人IgG1 Fc在Fc结构域的N末端融合,并且其中能够结合或竞争VHH72表位的人源化形式的靶向S1的VHH3.83通过$(G_4S)_2$接头(SEQ ID NO:121)与C末端融合(XVR014)(SEQ ID NO:119)。

[0562] XVR014:

[0563] DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKAVSISDMGWYRQPPGKQRELVATITKTG STNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLEMNSLRPEDTAVYYCNAWLPYGLGPDYYGLEL WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEA LHSHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCVLSGGVFTSYA

[0564] MGWFRQAPGKEREFLAAITFNSDATYYADSVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLRPEDT AVYSCAAGGNHYNPQYYHDYDKYDHWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 119）

[0565] XVR013和XVR014以1:1的比例混合,生成组合物或混合物(XVR012)(图34)。

[0566] 用使用SARS-CoV-2D614G参考毒株或Omicron变体BA.2.75.2、BA.4.6、BF.7、BQ.1.1、XBB和XBB.1.5的刺突蛋白假型化的VSV颗粒,在假病毒中和测定中测试了XVR012、XVR013和XVR014的中和效力。测定中包括阴性对照抗体(同种型对照)。

[0567] XVR012、XVR013和XVR014能够中和所有测试的SARS-CoV-2变体(D614G、Omicron BA.2.75.2、BA4.6、BF.7、BQ1.1、XBB和XBB.1.5),平均IC_{50}值范围:对于XVR012为1.1ng/mL至23.9ng/mL,对于XVR013为0.6ng/mL至18.5ng/mL,对于XVR014范围为66.8ng/mL至239.8ng/mL(表11)。相对于BA.2.75.2变体,XVR012和XVR013的IC_{50}值仅略有增加。

[0568] 表11:如在假病毒中和测定中测定的XVR012、XVR013和XVR014对SARS-CoV-2变体(D614G、Omicron BA.2.75.2、BA4.6、BF.7、BQ1.1、XBB和XBB.1.5)的中和。Vero E6细胞用使用SARS-CoV-2D614G刺突蛋白或使用SARS-CoV-2变体BA.2.75.2、BA.4.6、BF.7、BQ.1.1、XBB或XBB.1.5的刺突蛋白假型化的VSV-GFP报告病毒转导,这些病毒已与不同浓度的构建体或组合物预孵育。16小时后,用荧光计测量GFP荧光值。显示了计算出的平均IC_{50}值(ng/ml;除XBB外,所有变体的N＝3±SD)。通过非线性回归曲线拟合(log(抑制剂)vs.标准化反应)(四参数)计算平均IC_{50}值。

[0569]

刺突蛋白靶标	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

[0570] 实施例21:靶向S1和S2的结合剂的组合物(XVR012)中和SARS-CoV-2变体D614G、Omicron BA.2和BA.5(活病毒测定)

[0571] 在活病毒测定(微量中和法)中测试了实施例20中描述的构建体和组合物的中和效力。XVR012、XVR013和XVR014能够中和所有测试的SARS-CoV-2变体,几何平均IC_{50}值范围:对于XVR012为0.6ng/mL至1.9ng/mL,对于XVR013为2.8ng/mL至3.7ng/mL,对于XVR014为98ng/mL至124.5ng/mL。(表12).

[0572] 表12:通过活病毒法确定的实施例20中描述的XVR012、XVR013和XVR014对真实的SARS-CoV-2变体(614G、Delta、Omicron BA.2和Omicron BA.5)的中和。显示了几何平均IC_{50}值(ng/mL;N＝3)。

[0573]

刺突蛋白靶标	抗体	D614G	Omicron BA.2	Omicron 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

[0574] 实施例22:XVR012、XVR013和XVR014在叙利亚金黄仓鼠SARS-CoV-2攻击模型中的体内功效

[0575] 在叙利亚金黄仓鼠感染后攻击模型(Wuhan-Hu-1毒株)中评估了实施例20中描述的XVR012、XVR013和XVR014的体内功效。攻击后4小时(治疗环境),腹腔内施用剂量为4mg/kg和20mg/kg的XVR012,以及剂量为2mg/kg和10mg/kg的XVR013和XVR014。对照动物接受10mg/kg帕利珠单抗(一种针对人呼吸道合胞病毒融合蛋白的人源化单克隆抗体)(阴性对照),一组动物接受10mg/kg贝贝替洛单抗(阳性对照)。

[0576] 在用高剂量和低剂量XVR012和XVR013处理的动物以及阳性对照中,肺中的病毒复制被完全清除(图35A)。用XVR014观察到对肺中病毒复制的剂量依赖性影响。与阴性对照组相比,用XVR012、XVR013、XVR014或阳性对照处理降低了肺组织中的病毒RNA载量(图35B)。

[0577] 实施例23:XVR012、XVR013和XVR014的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)

[0578] 研究进行了Fc γ RIIIa报告基因测定以评估实施例20中描述的XVR012、XVR013和XVR014的抗体依赖性细胞毒性。以表达SARS CoV-2刺突蛋白的CHO-K1靶细胞系为靶细胞,以JurkatFc γ RIIIa(CD16)V176-NFAT-RELuc为报告细胞。研究进行了三次独立的测定运行。该测定采用的效应细胞与靶细胞比例为40:1,样品以8点梯度稀释液进行评估,XVR013和XVR014的起始浓度为30μg/mL,XVR012的起始浓度为60μg/mL,进行三次独立重复(每次运行3个测定板)。在30μg/mL的单一浓度下评估了同种型对照。在添加SteadyGlo(发光终点)之前,将测定板孵育过夜(21小时±1小时)。

[0579] XVR012、XVR013和XVR014以剂量依赖性方式介导ADCC反应,并且该反应与同种型对照(IC)或测定对照(效应细胞和靶细胞)的反应相比显著更大(图36)。

[0580] 实施例24:XVR012、XVR013和XVR014在叙利亚金黄仓鼠SARS-CoV-2攻击模型中的体内预防功效

[0581] 在叙利亚金黄仓鼠攻击模型(Wuhan-Hu-1毒株)中评估了如实施例20中描述的XVR012、XVR013和XVR014的体内功效。在感染前约24小时通过腹腔内注射施用10mg/kg XVR014和1mg/kg XVR013的混合物(XVR012)、1mg/kg XVR013和10mg/kg XVR014。

[0582] 在这种预防环境下,用XVR012、XVR013和XVR014处理的动物肺中的病毒复制被清除(图37)。

[0583] 实施例25:XVR012、XVR013和XVR014在叙利亚金黄仓鼠SARS-CoV-2攻击模型中的体内治疗功效

[0584] 在SARS-CoV2攻击后4小时,通过腹腔内注射施用5mg/kg XVR014和0.5mg/kg XVR013的混合物、10mg/kg XVR014和1mg/kg XVR013的混合物、或20mg/kg XVR014和2mg/kg XVR013的混合物(XVR012);0.5mg/kg、1mg/kg和2mg/kg XVR013;5mg/kg、10mg/kg和20mg/kg XVR014。对照组动物接受10mg/kg帕利珠单抗(阴性对照),并且一组动物接受10mg/kg贝贝替洛单抗(用作阳性对照)。

[0585] 在治疗环境中,用XVR012、XVR013、XVR014和阳性对照处理的动物肺中病毒复制受到抑制,而对照处理的动物则具有较高的肺病毒载量(图38)。

[0586] 实施例26:使用R3_DC23-Fc进行预防性治疗保护K18-hACE2小鼠免受SARS-CoV-2感染

[0587] 在上皮细胞表面表达人ACE2的K18-hACE2小鼠在用SARS-CoV-2 614G变体病毒进行致命的感染前1天,通过腹腔内注射100μg R3_DC23-Fc(YTE)(R3_DC23-Fc;SEQ ID NO:96)或100μ同种型对照IgG(帕利珠单抗)进行处理。用帕利珠单抗处理、对SARS-CoV-2感染非易感的经感染野生型(WT)小鼠用作保护对照。

[0588] 正如预期的那样,所有用帕利珠单抗处理的K18-hACE2均出现明显的体重减轻并因病毒攻击而死亡。与此形成鲜明对比的是,R3-DC23-Fc保护受感染的K18-hACE2小鼠免于体重减轻和死亡,与用帕利珠单抗处理的WT小鼠类似。这表明R3-DC23-Fc可保护小鼠免受致命的SARS-CoV-2感染(图39A和图39B)。

[0589] 为了测试R3_DC23-Fc是否也能控制肺中的病毒复制,在感染SARS-CoV-2 614G变体病毒前1天,通过腹腔内注射100μg R3_DC23-Fc或100μg同种型对照IgG(帕利珠单抗)处理K18-hACE2小鼠。感染后五天,处死部分小鼠以分离肺,用于通过噬菌斑测定和qPCR定量病毒复制,部分小鼠用于监测体重和死亡率。

[0590] R3_DC23-Fc处理保护K18-hACE2小鼠在受到病毒攻击时不会出现体重减轻和死亡(图40A和图40B)。尽管可从用帕利珠单抗处理的所有K18-hACE2小鼠的肺中分离出高水平的复制SARS-CoV-2病毒,但在用R3-DC23-Fc处理的K18-hACE2小鼠或WT小鼠的肺中未检测到复制病毒(图40C)。同样,与用帕利珠单抗处理的K18-hACE2小鼠相比,在用R3-DC23-Fc处理的K18-hACE2小鼠或WT小鼠的肺中未检测到病毒RNA(图40D)。这些数据表明,使用R3-DC23-Fc进行预防性治疗可预防或显著减少高度易感的K18-hACE2小鼠中的病毒复制。

[0591] 实施例27:R3 DC23与SARS-CoV-2刺突蛋白2P(S-2P)蛋白结合的化学计量和结合

[0592] 动力学

[0593] 通过生物层干涉法评估了R3_DC23的SARS-CoV-2刺突蛋白2P(S2P)结合动力学。

[0594] 在以完全可用于分析物结合的方式将配体捕获到生物传感器上时,配体和分析物之间相互作用的化学计量可按照以下公式在捕获的配体饱和时确定:

[0595] $$化学计量=\frac{反应_{分析物}\cdot MW_{配体}}{反应_{配体}\cdot MW_{分析剂}}$$

[0596] 三次重复实验显示,每个S-2P三聚体的R3_DC23 VHH的化学计量约为3.5个分子,表明S-2P三聚体中的每个单体结合一个R3_DC23 VHH(表13,图41)。

[0597] 表13使用上述公式确定的Strep tag捕获的S-2P三聚体(MW:456.4kDa;配体)与饱和(20nM)R3_DC13单体(MW:16.6kDa;分析物)之间相互作用的化学计量。

[0598]

实验类型	重复	S-2P三聚体（RU，以nM表示）	R3_DC23（RU，以nm表示）	化学计量
动力学20nM***	1	1.710	0.2283	1:3.678
	2	1.725	0.2140	1:3.417
	3	1.540	0.1956	1:3.499

[0599] S-2P与R3_DC23的20nM至1.25nM梯度稀释液之间的相互作用的结合相无法用全局指数1:1结合模型来描述。在$k_{off}=2.3\cdot10^{-4}\pm5.2\cdot10^{-5}s^{-1}$时确定解离速率。

[0600] 序列表自由文本

[0601]

SEQ ID NO	自由文本(<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的CDR1 Kabat
12	VHH R4_DC6的CDR1 Kabat
13	VHH R3_C4、VHH R4_DC16、VHH R3_DC20的CDR2 Kabat
14	VHH R3_DC9的CDR2 Kabat
15	VHH R3_DC2的CDR2 Kabat
16	VHH R4_DC20的CDR2 Kabat
17	VHH R4_DC13的CDR2 Kabat
18	VHH R4_DC9的CDR2 Kabat
19	VHH R4_DC6的CDR2 Kabat
20	VHH R3_DC23的CDR2 Kabat

[0602]

21	VHH R3_C4的CDR3 Kabat
22	VHH R4_DC16的CDR3 Kabat
23	VHH R3_DC20、VHH R3_DC9、VHH R3_DC2、VHH R4_DC20的CDR3 Kabat
22	VHH R4_DC16的CDR3 Kabat
23	VHH R3_DC20、VHH R3_DC9、VHH R3_DC2、VHH R4_DC20的CDR3 Kabat
24	VHH R4_DC13的CDR3 Kabat
25	VHH R4_DC9的CDR3 Kabat
26	VHH R4_DC6的CDR3 Kabat
27	VHH R3_DC23的CDR3 Kabat
28	VHH R3_C4、VHH R4_DC16、VHH R3_DC20的FR1 Kabat
29	VHH R3_DC9、VHH R3_DC2、VHH R4_DC20、VHH R4_DC13的FR1 Kabat
30	VHH R4_DC9的FR1 Kabat
31	VHH R4_DC6的FR1 Kabat
32	VHH R3_DC23的FR1 Kabat
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的FR2 Kabat、Martin
34	VHH R4_DC9的FR2 Kabat、Martin
35	VHH R3_C4的FR3 Kabat
36	VHH R4_DC16的FR3 Kabat
37	VHH R3_DC20的FR3 Kabat
38	VHH R3_DC9的FR3 Kabat
39	VHH R3_DC2的FR3 Kabat
40	VHH R4_DC20的FR3 Kabat
41	VHH R4_DC13的FR3 Kabat
42	VHH R4_DC9的FR3 Kabat
43	VHH R4_DC6的FR3 Kabat
44	VHH R3_DC23的FR3 Kabat
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的FR4 Kabat、Martin
46	CDR1 Kabat
47	CDR2 Kabat
48	CDR3 Kabat、Martin
49	变异CDR1 Kabat
50	变异CDR2 Kabat
51	变异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的CDR2 Martin
56	VHH R3_DC9的CDR2 Marti
57	VHH R3_DC2的CDR2 Martin
58	VHH R4_DC20的CDR2 Martin
59	VHH R4_DC13的CDR2 Martin
60	VHH R4_DC9的CDR2 Martin

61	VHH R4_DC6的CDR2 Martin
62	VHH R3_DC23的CDR2 Martin
63	CDR1 Martin、AbM、IMGT
64	CDR2 Martin、AbM
65	变异CDR1 Martin、AbM、IMGT
66	变异CDR2 Martin、AbM
67	CDR3 AbM、Chothia
68	变异CDR3 AbM、Chothia
69	CDR1 Chothia
70	CDR2 Chothia
71	变异CDR1 Chothia
72	变异CDR2 Chothia
73	CDR2 IMGT
74	CDR3 IMGT
75	变异CDR2 IMGT
76	变异CDR3 IMGT
77	CDR1 MacCallum
78	CDR2 MacCallum
79	CDR3 MacCallum
80	变异CDR1 MacCallum
81	变异CDR2 MacCallum
82	变异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的FR1 Martin
98	VHH R3_DC9、VHH R3_DC2、VHH R4_DC20、VHH R4_DC13的FR1 Martin
99	VHH R4_DC9、R4_DC6的FR1 Martin
100	VHH R3_DC23的FR1 Martin
101	VHH R3_C4的FR3 Martin
102	VHH R4_DC16的FR3 Martin
103	VHH R3_DC20的FR3 Martin
104	VHH R3_DC9的FR3 Martin
105	VHH R3_DC2的FR3 Martin
106	VHH R4_DC20的FR3 Martin
107	VHH R4_DC13的FR3 Martin
108	VHH R4_DC9的FR3 Martin
109	VHH R4_DC6的FR3 Martin
110	VHH R3_DC23的FR3 Martin
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

[0603]

[0604]

117	TD R3DC23-117-83 (20)- Fc
118	XVR013
119	XVR014
120	Gly-Ser接头$(G_4S)_6$
121	Gly-Ser接头$(G_4S)_2$
122	Gly-Ser接头$(G_4S)_3$
123	Gly-Ser接头$(G_4S)_4$
124	VHH72
125	VHH83
126	VHH3.117
127	人源化R3_DC23
128	人源化R3_C4
129	人源化R4_DC20
130	huR3C4-Fc
131	huR4DC20-Fc

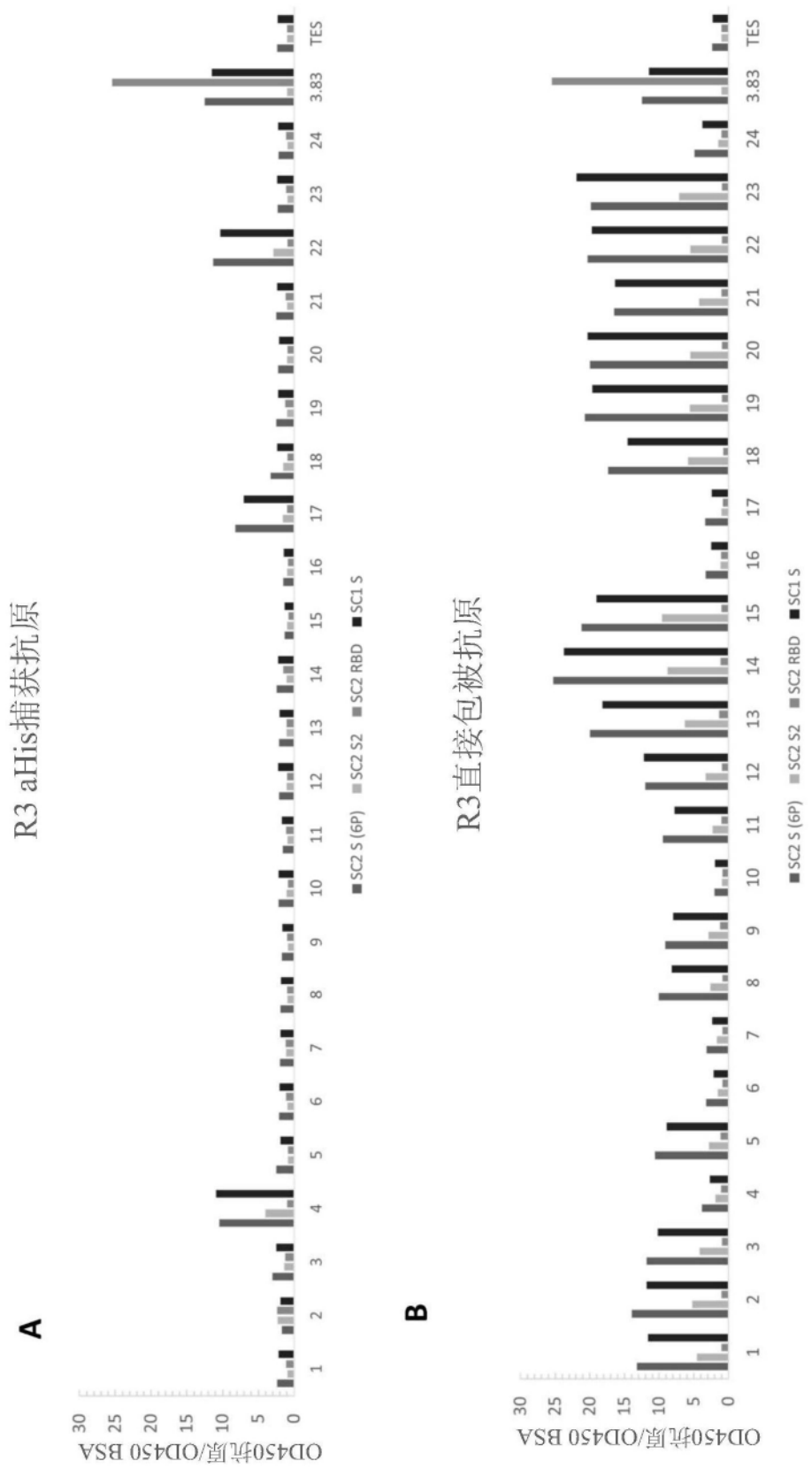

A
R3 aHis捕获抗原
OD450抗原/OD450 BSA
SC2 S (6P)
SC2 S2
SC2 RBD
SC1 S
TES
B
R3直接包被抗原
OD450抗原/OD450 BSA
SC2 S (6P)
SC2 S2
SC2 RBD
SC1 S

图1


C
R4 aHis捕获
OD450抗原/OD450 BSA
30
25
20
15
10
5
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 3.83 TES
R4 C
SC2 S (6P)
SC2 S2
SC2 RBD
SC1 S
D
R4直接包被
OD450抗原/OD450 BSA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 3.83 TES
R4 DC
SC2 S (6P)
SC2 S2
SC2 RBD
SC1 S

图1(续)

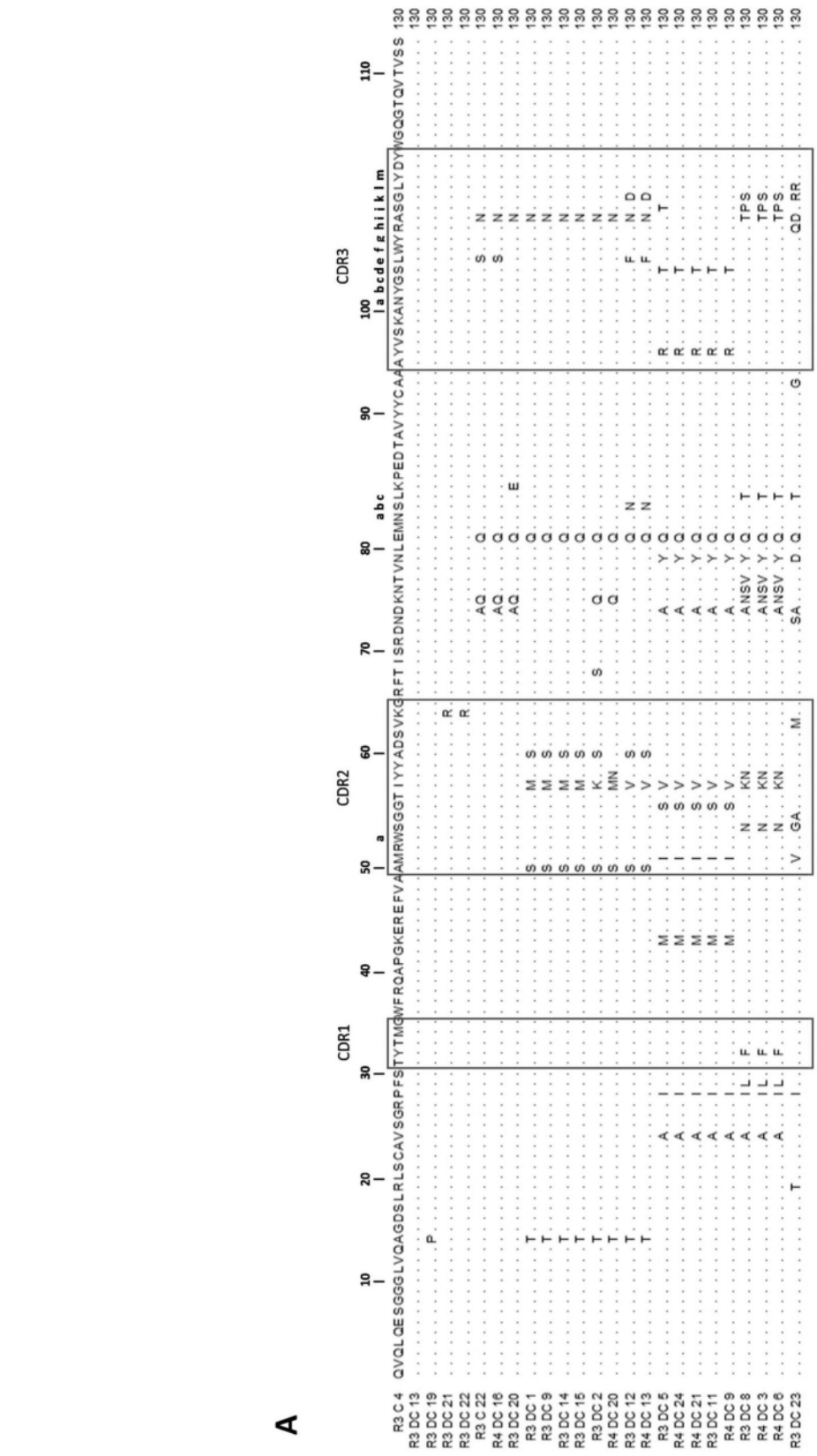

A
CDR1
CDR2
CDR3
R3 C 4 QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRPFSTYTMGWFRQAPGKEREFVAAMRWSGGTIYYADSVKGRFTISRDNDKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAAAYVSKANYGSLWYRASGLYDYWGQGTQVTVSS 130
R3 DC 13 130
R3 DC 19 130
R3 DC 21 130
R3 DC 22 130
R3 C 22 130
R4 DC 16 130
R3 DC 20 130
R3 DC 1 130
R3 DC 9 130
R3 DC 14 130
R3 DC 15 130
R3 DC 2 130
R4 DC 20 130
R3 DC 12 130
R4 DC 13 130
R3 DC 5 130
R4 DC 24 130
R4 DC 21 130
R3 DC 11 130
R4 DC 9 130
R3 DC 8 130
R4 DC 3 130
R4 DC 6 130
R3 DC 23 130

图2

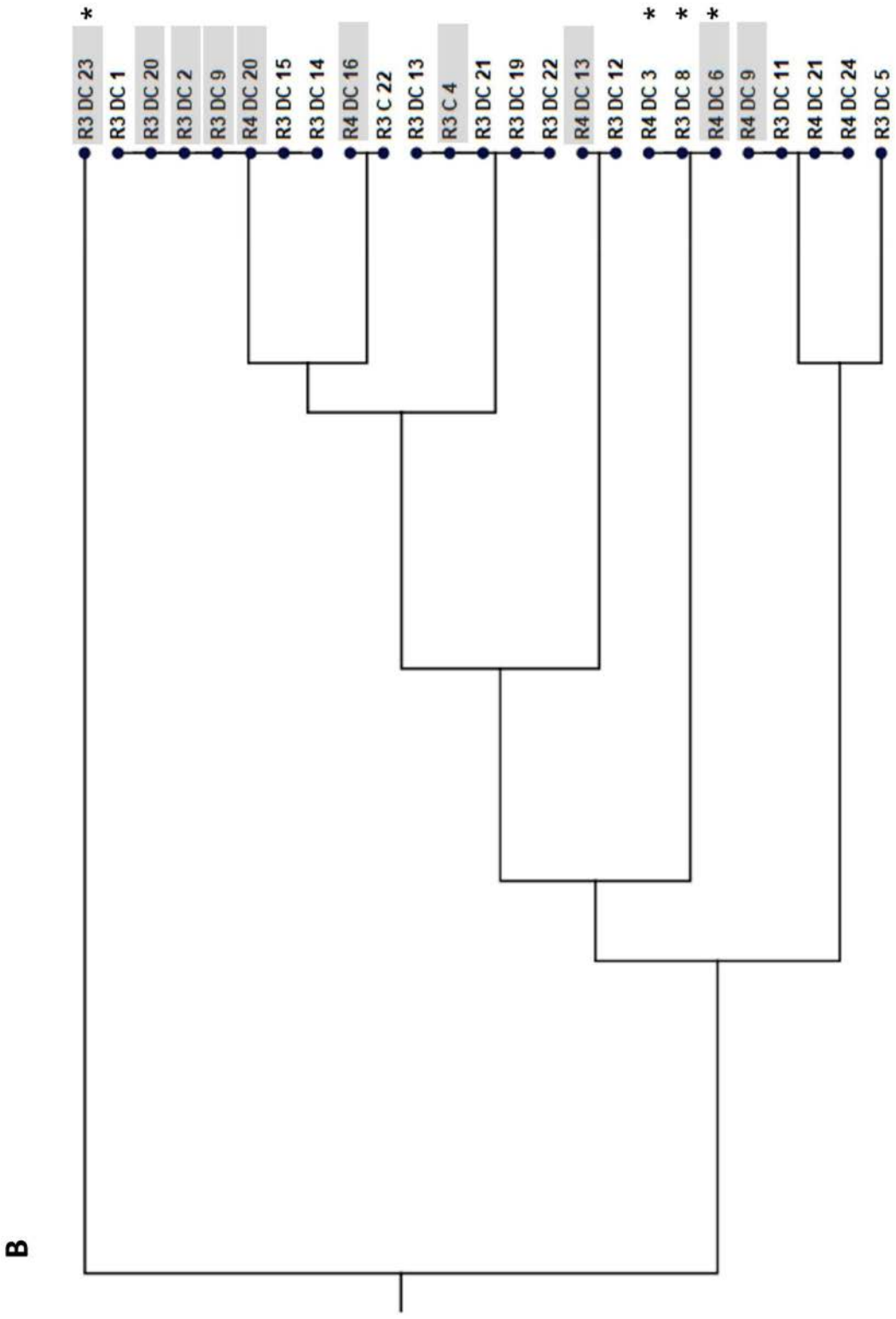

B
R3 DC 23
R3 DC 1
R3 DC 20
R3 DC 2
R3 DC 9
R4 DC 20
R3 DC 15
R3 DC 14
R4 DC 16
R3 C 22
R3 DC 13
R3 C 4
R3 DC 21
R3 DC 19
R3 DC 22
R4 DC 13
R3 DC 12
R4 DC 3
R3 DC 8
R4 DC 6
R4 DC 9
R3 DC 11
R4 DC 21
R4 DC 24
R3 DC 5

图2(续)

A

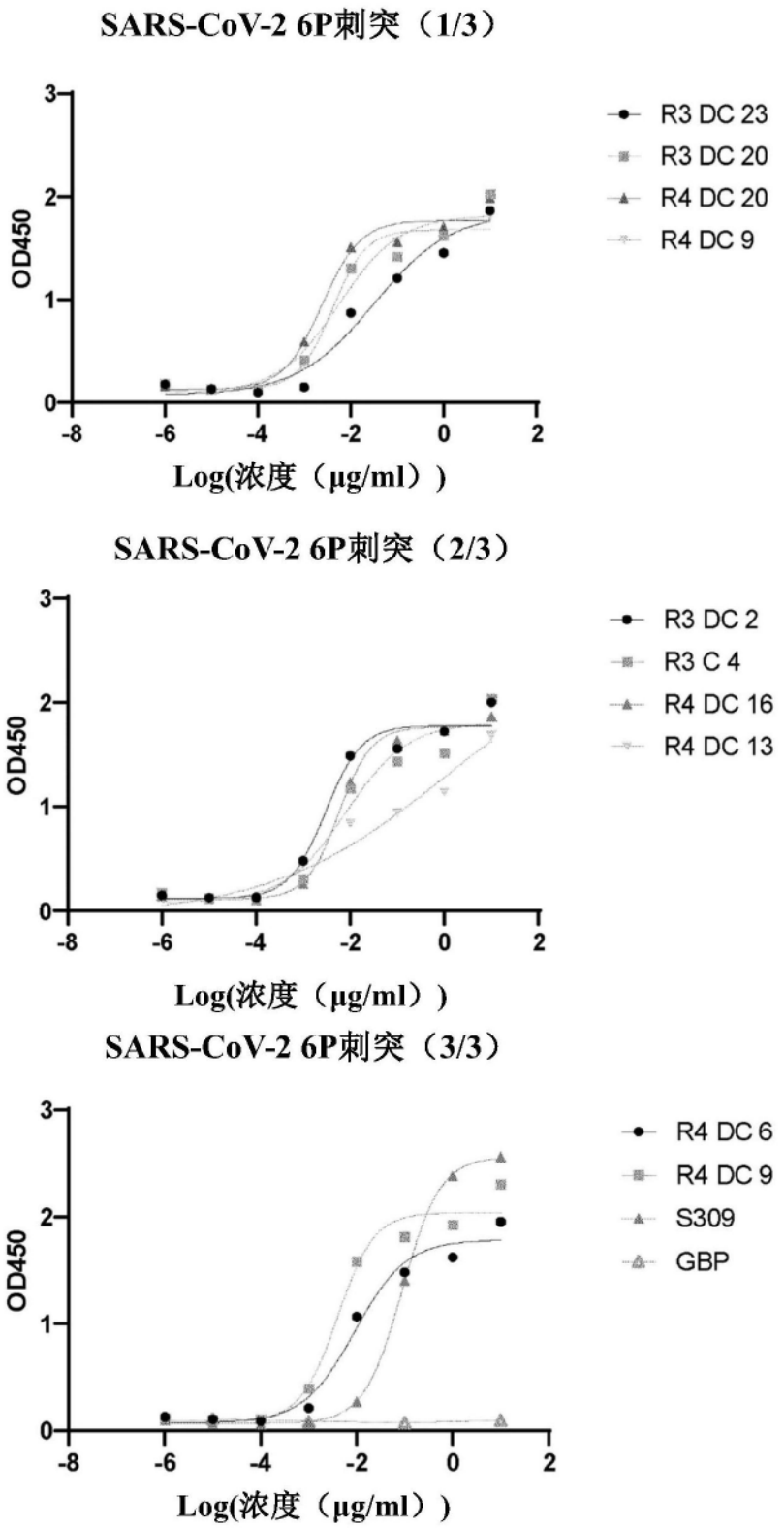

SARS-CoV-2 6P刺突（1/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R4 DC 9
SARS-CoV-2 6P刺突（2/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-2 6P刺突（3/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R4 DC 6
R4 DC 9
S309
GBP

图3

B

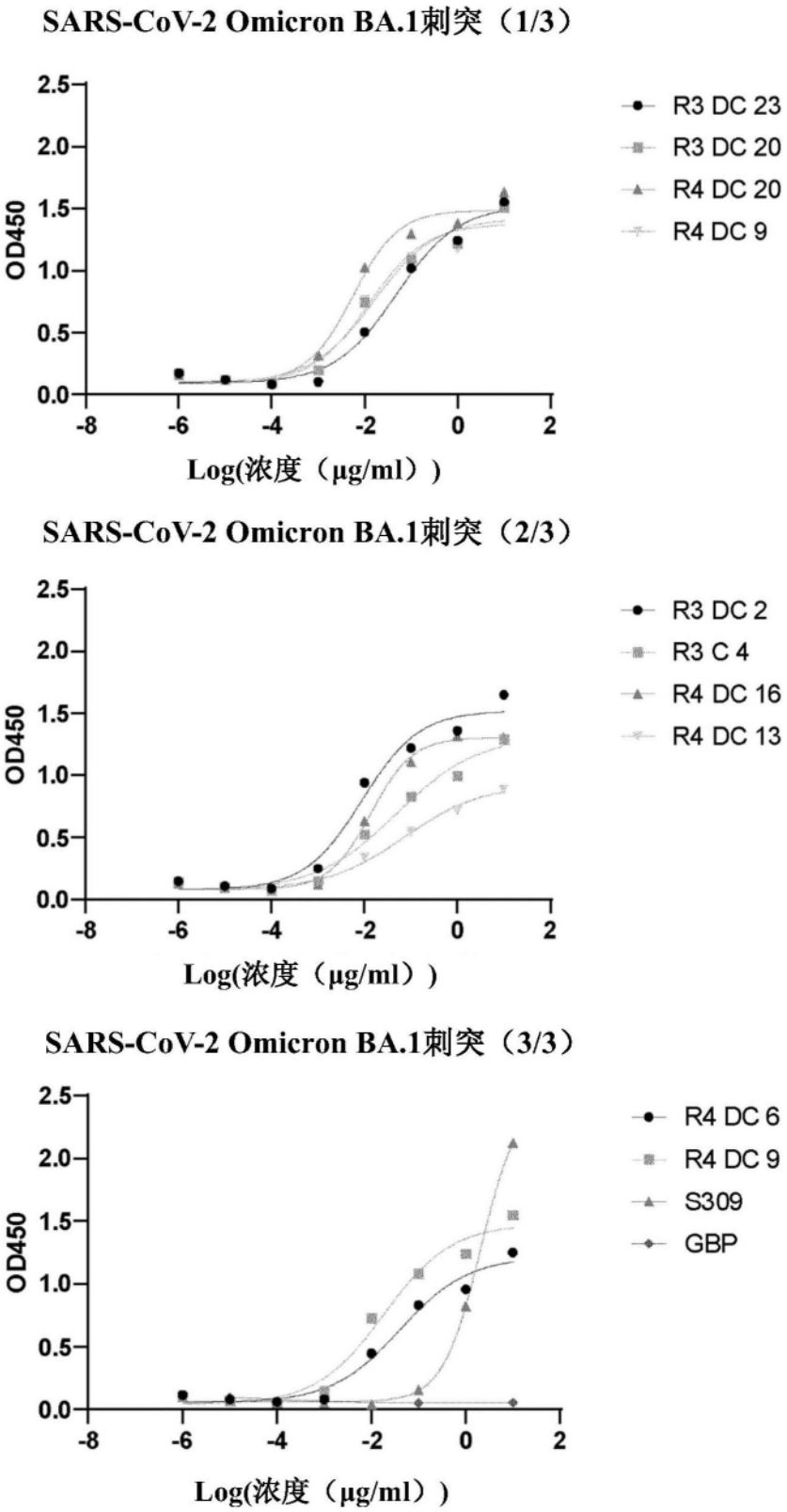

SARS-CoV-2 Omicron BA.1刺突（1/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R4 DC 9
SARS-CoV-2 Omicron BA.1刺突（2/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-2 Omicron BA.1刺突（3/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R4 DC 6
R4 DC 9
S309
GBP

图3(续)

C

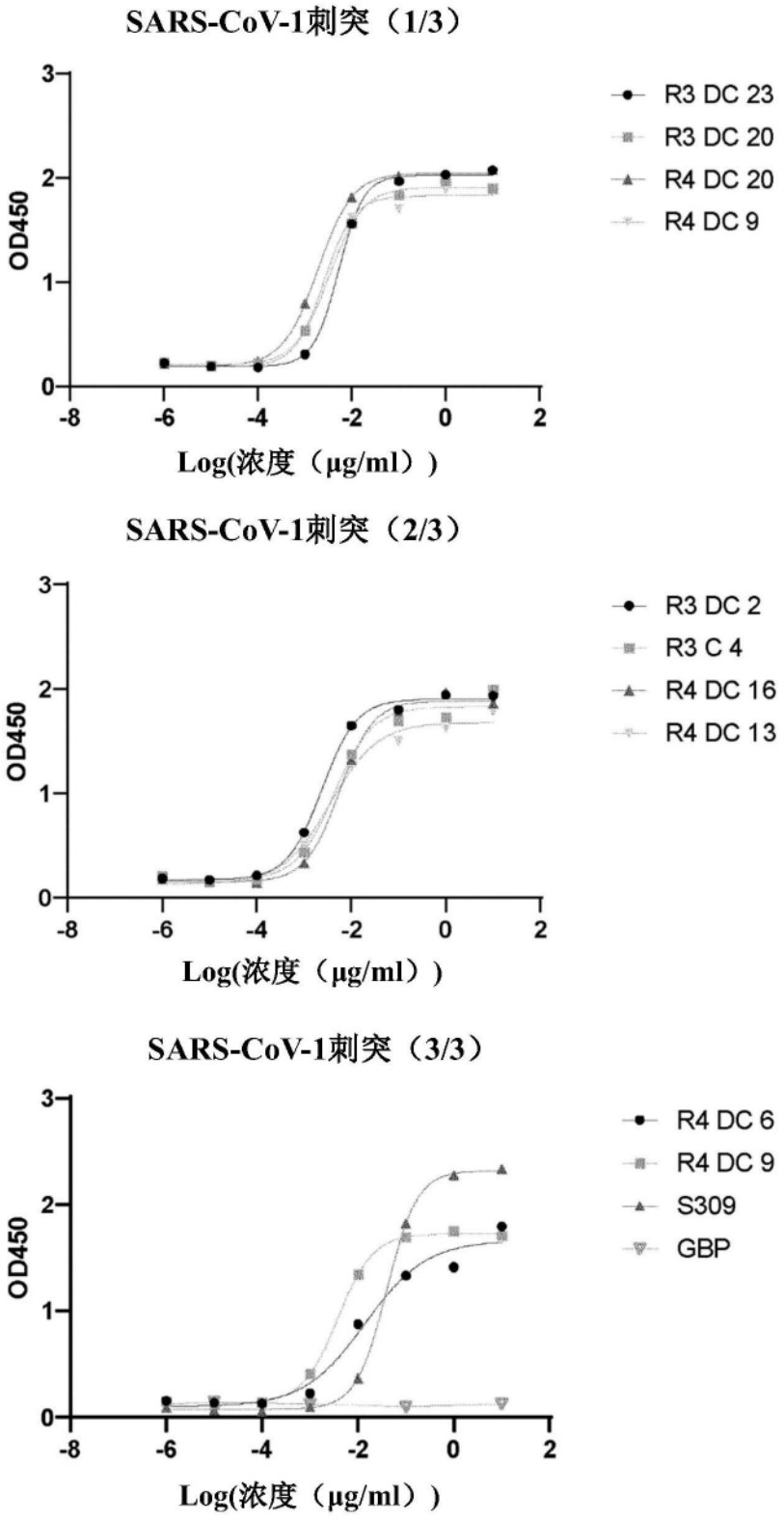

SARS-CoV-1刺突（1/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R4 DC 9
SARS-CoV-1刺突（2/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-1刺突（3/3）
OD450
Log(浓度（μg/ml）)
R4 DC 6
R4 DC 9
S309
GBP

图3(续)

D

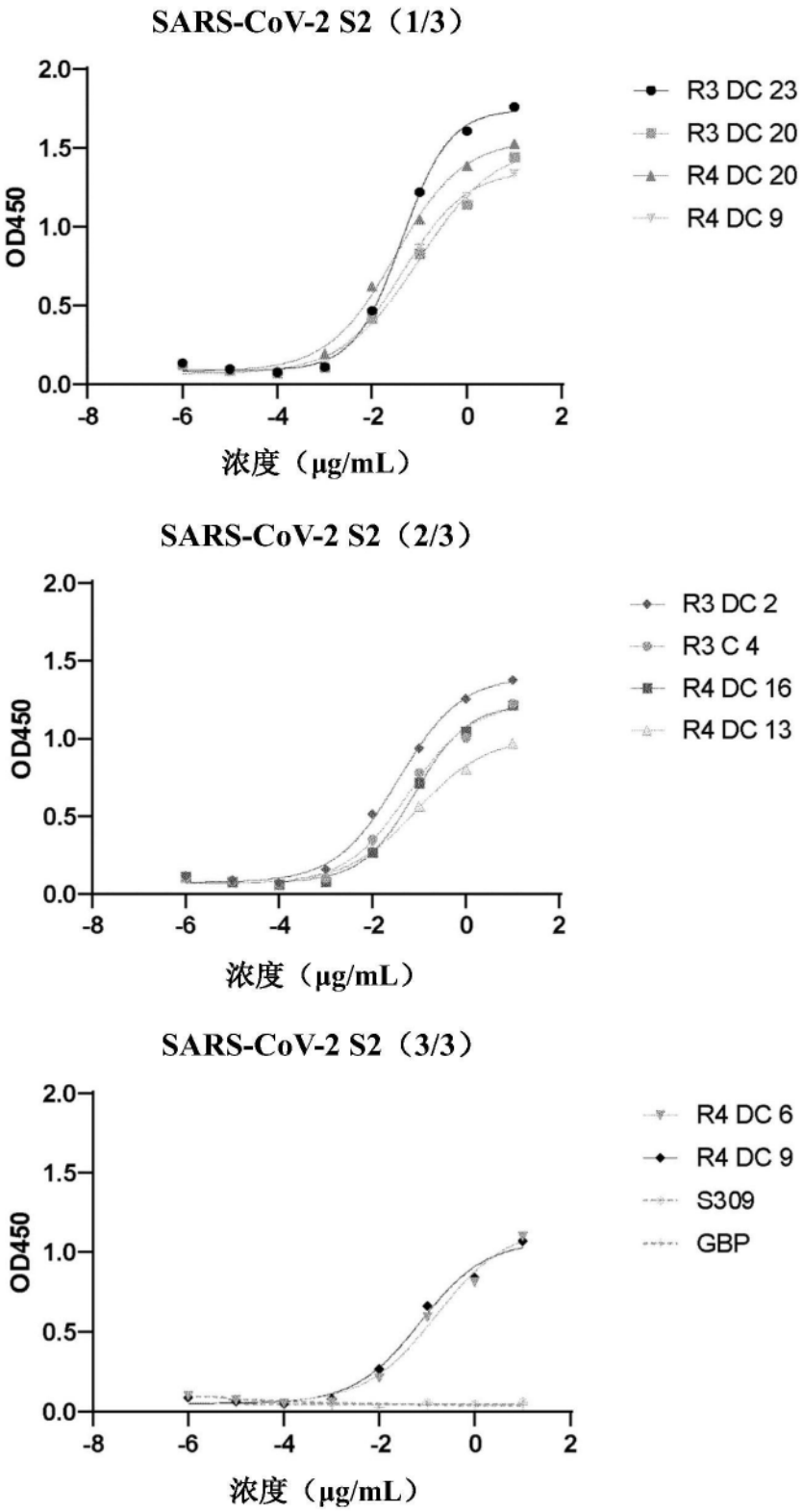

SARS-CoV-2 S2（1/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R4 DC 9
SARS-CoV-2 S2（2/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-2 S2（3/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R4 DC 6
R4 DC 9
S309
GBP

图3(续)

E

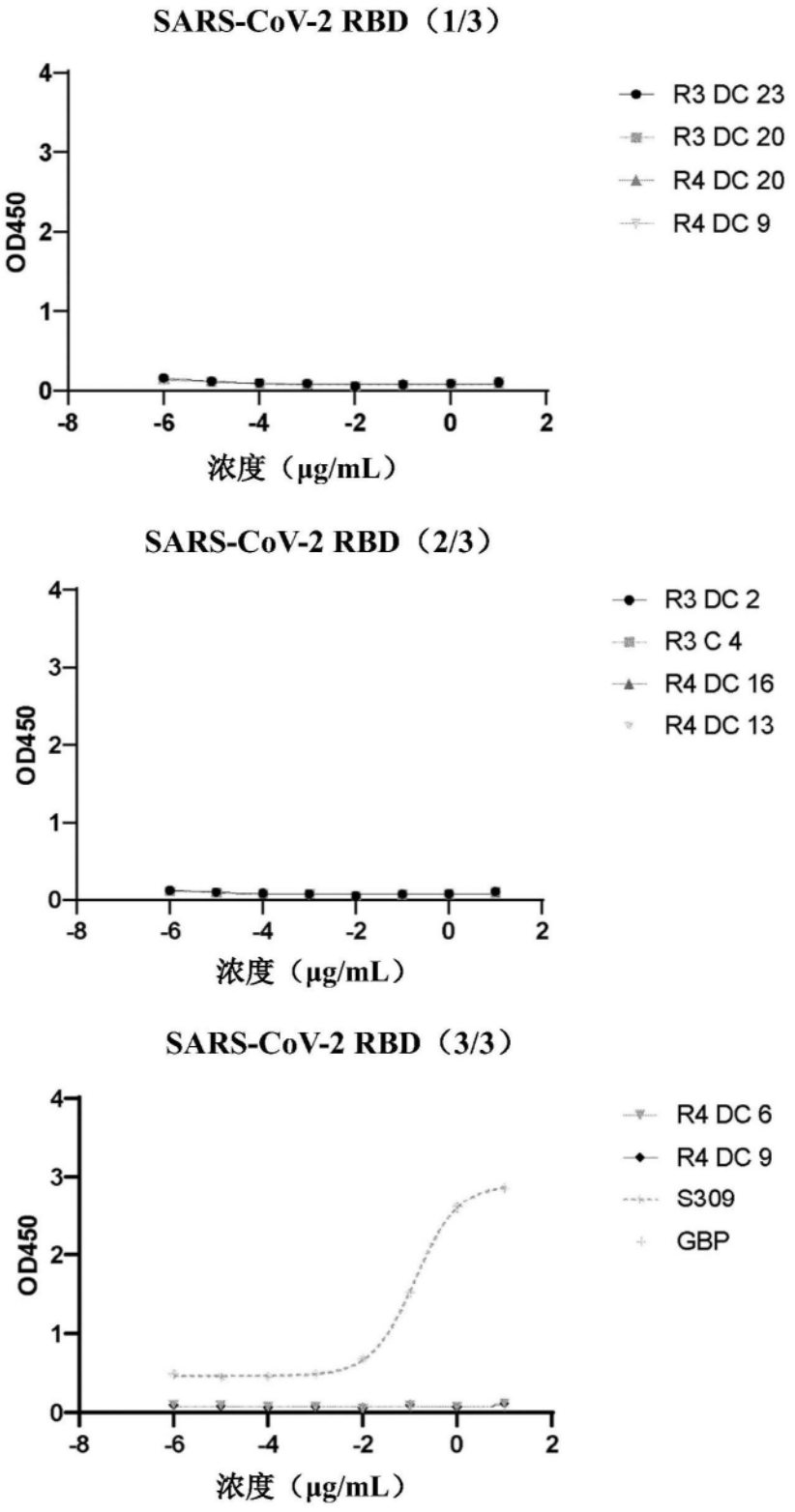

SARS-CoV-2 RBD（1/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R4 DC 9
SARS-CoV-2 RBD（2/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-2 RBD（3/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R4 DC 6
R4 DC 9
S309
GBP

图3(续)

F

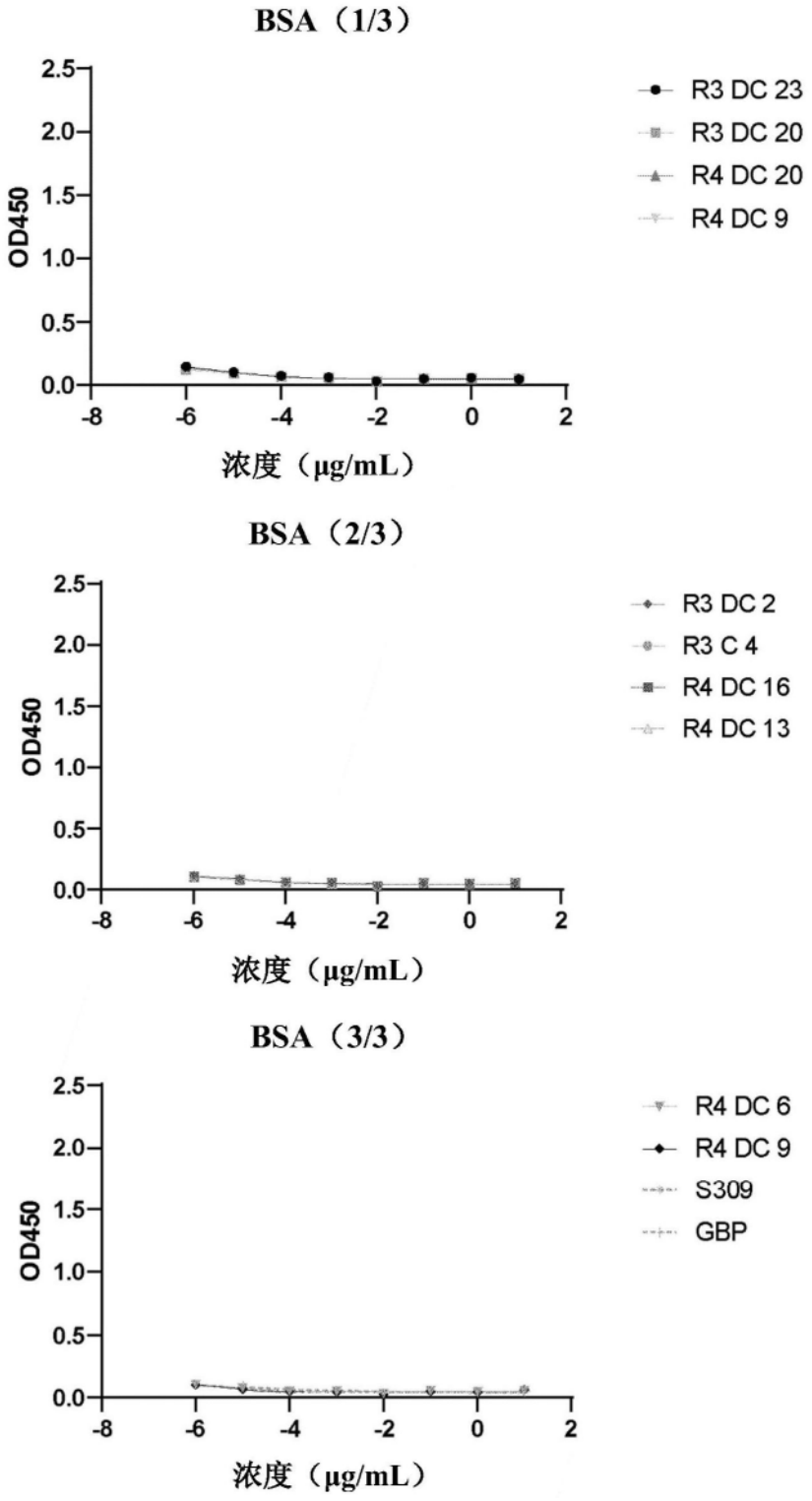

BSA（1/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R4 DC 9
BSA（2/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
BSA（3/3）
OD450
浓度（μg/mL）
R4 DC 6
R4 DC 9
S309
GBP

图3(续)

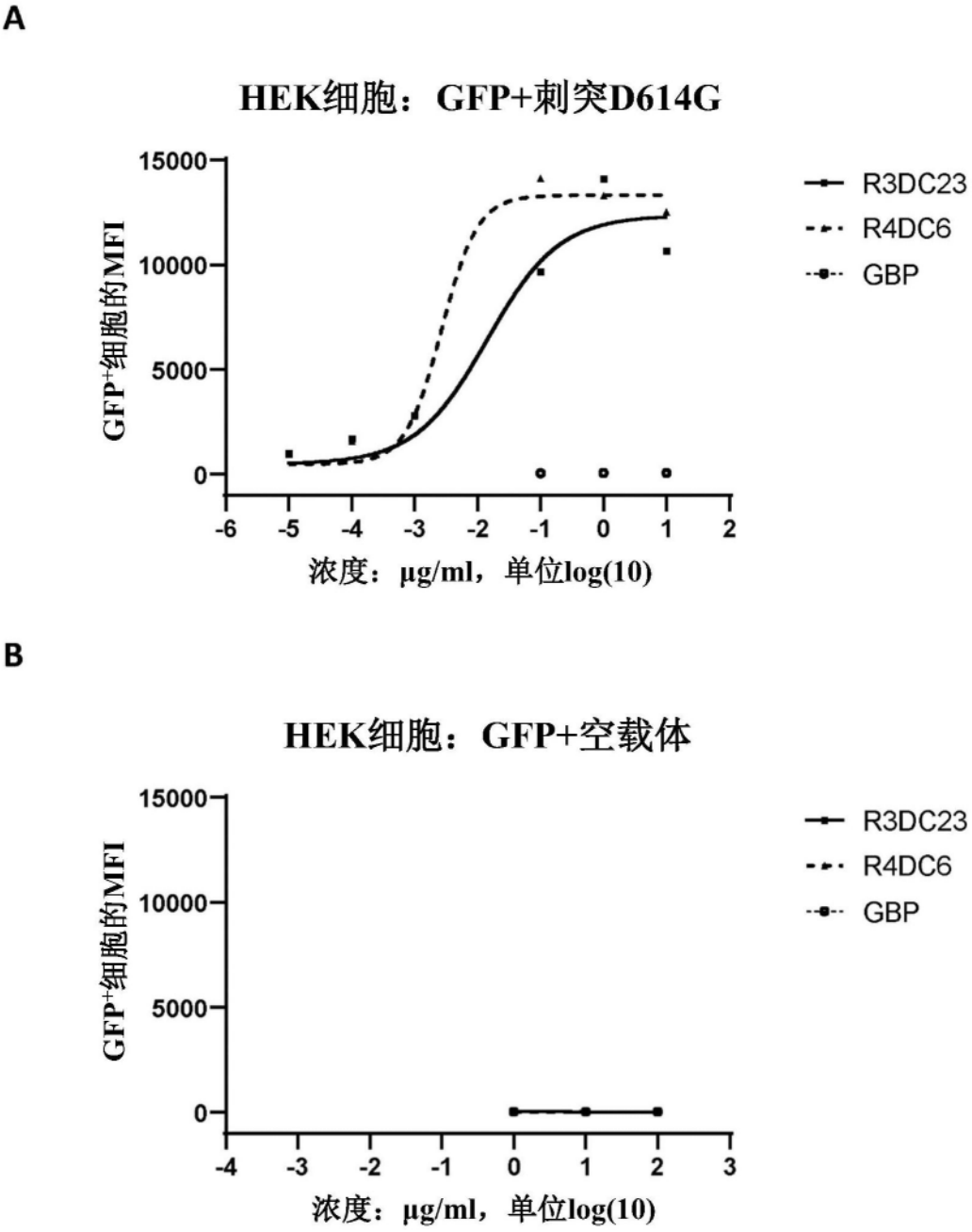

A
HEK细胞：GFP+刺突D614G
GFP+细胞的MFI
15000
10000
5000
0
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3DC23
R4DC6
GBP
B
HEK细胞：GFP+空载体
GFP+细胞的MFI
15000
10000
5000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3DC23
R4DC6
GBP

图4

A

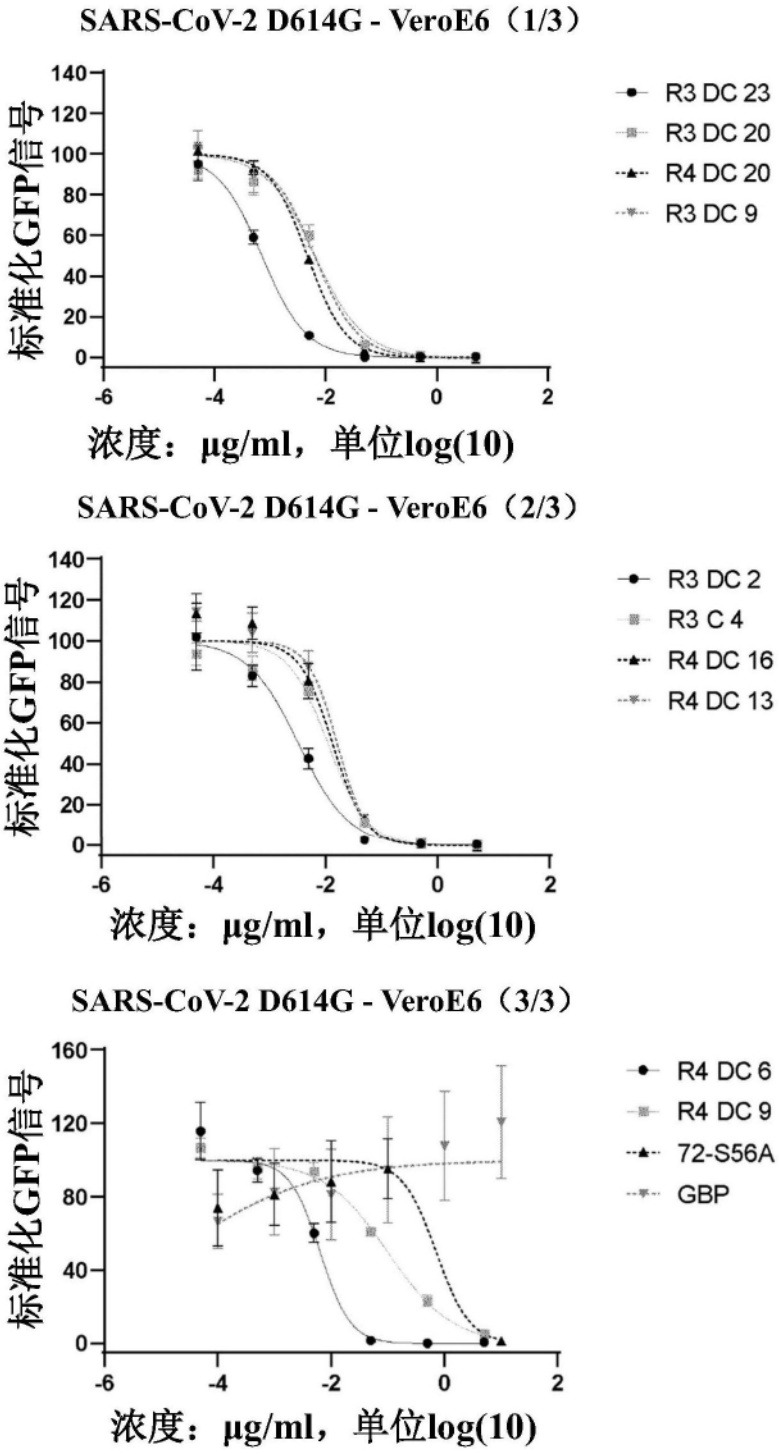

SARS-CoV-2 D614G - VeroE6（1/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
SARS-CoV-2 D614G - VeroE6（2/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-2 D614G - VeroE6（3/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4 DC 6
R4 DC 9
72-S56A
GBP

图5

B

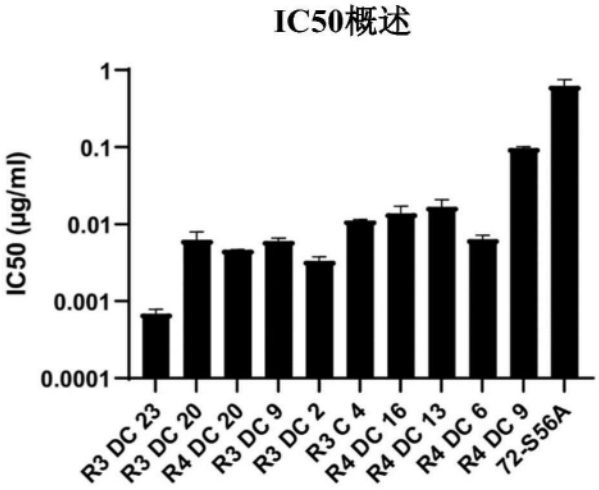

IC50概述
IC50 (μg/ml)
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
R4 DC 6
R4 DC 9
72-S56A

图5(续)

A

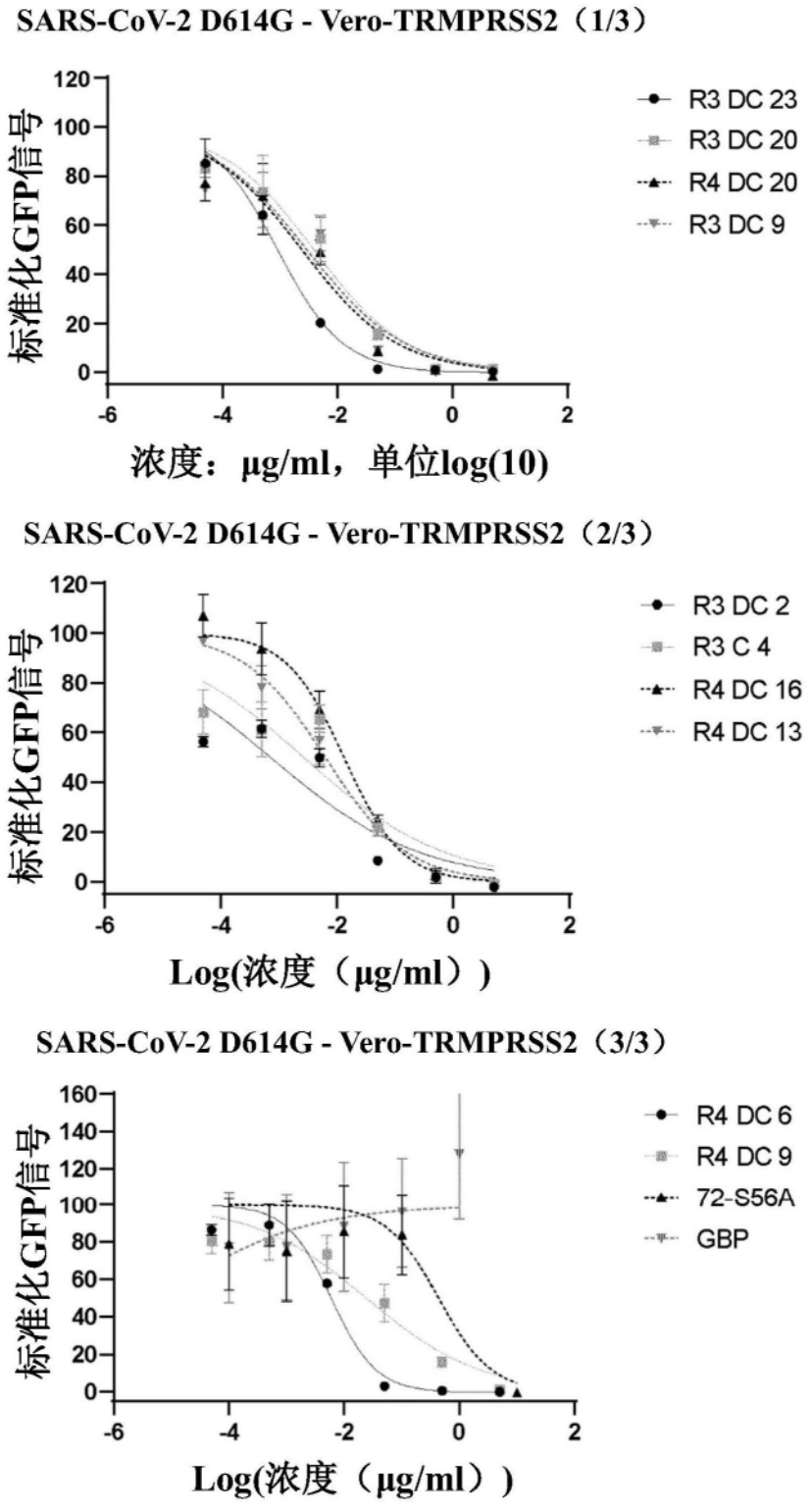

SARS-CoV-2 D614G - Vero-TRMPRSS2（1/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
SARS-CoV-2 D614G - Vero-TRMPRSS2（2/3）
标准化GFP信号
Log(浓度（μg/ml）)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-2 D614G - Vero-TRMPRSS2（3/3）
标准化GFP信号
Log(浓度（μg/ml）)
R4 DC 6
R4 DC 9
72-S56A
GBP

图6

B

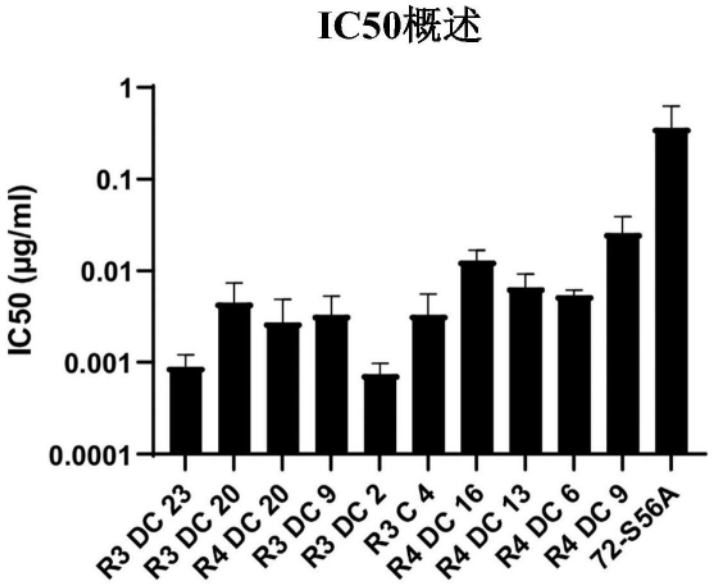

IC50概述
IC50 (μg/ml)
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
R4 DC 6
R4 DC 9
72-S56A

图6(续)

A

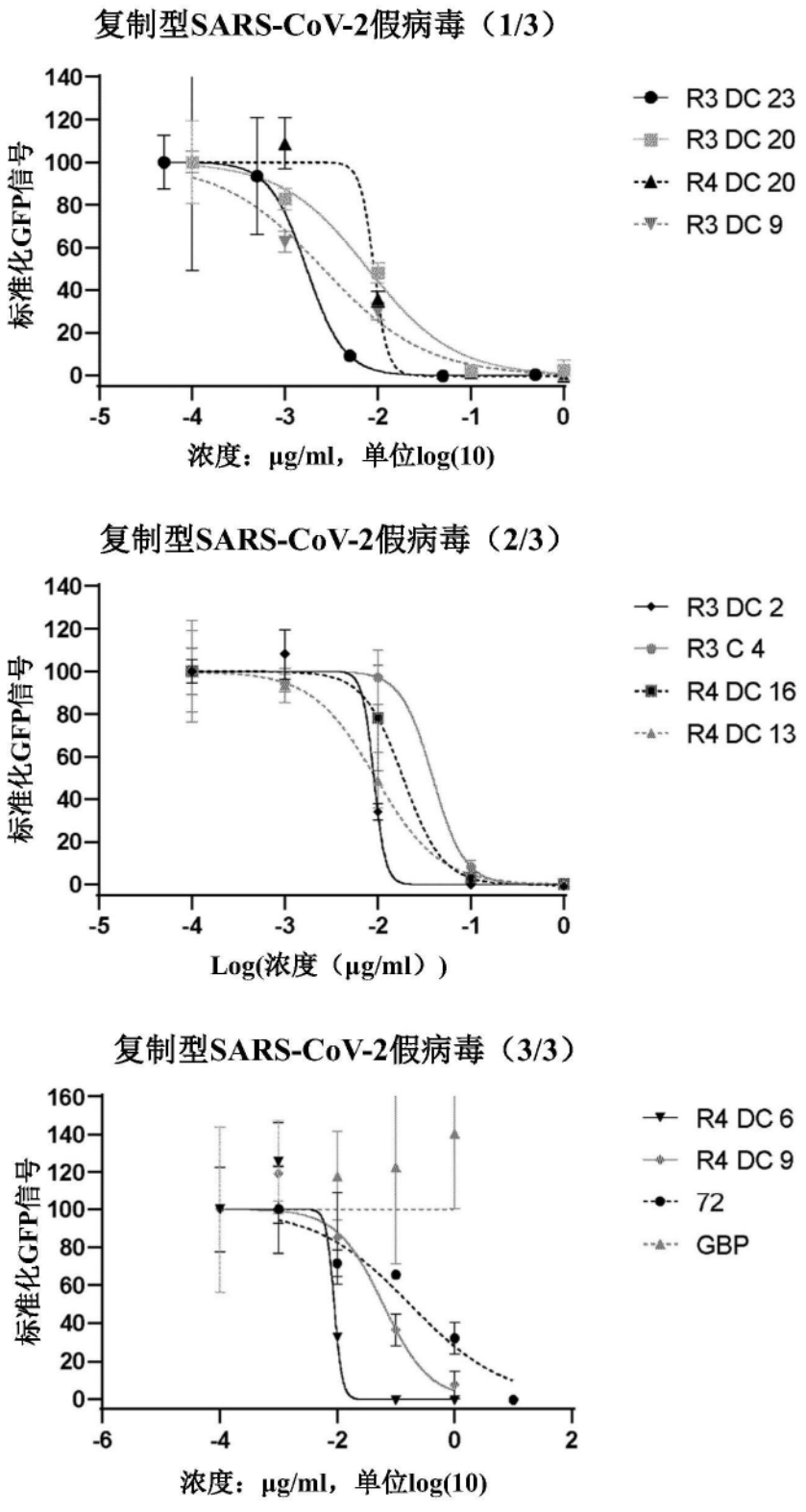

复制型SARS-CoV-2假病毒（1/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
复制型SARS-CoV-2假病毒（2/3）
标准化GFP信号
Log(浓度（μg/ml）)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
复制型SARS-CoV-2假病毒（3/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4 DC 6
R4 DC 9
72
GBP

图7

B

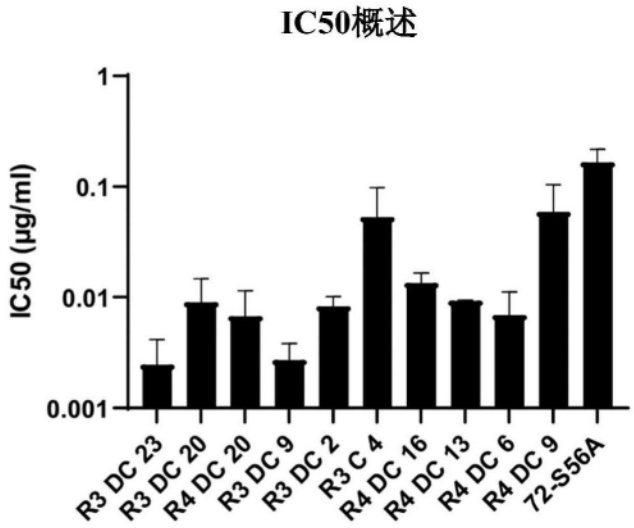

IC50概述
IC50 (μg/ml)
1
0.1
0.01
0.001
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
R4 DC 6
R4 DC 9
72-S56A

图7(续)

A

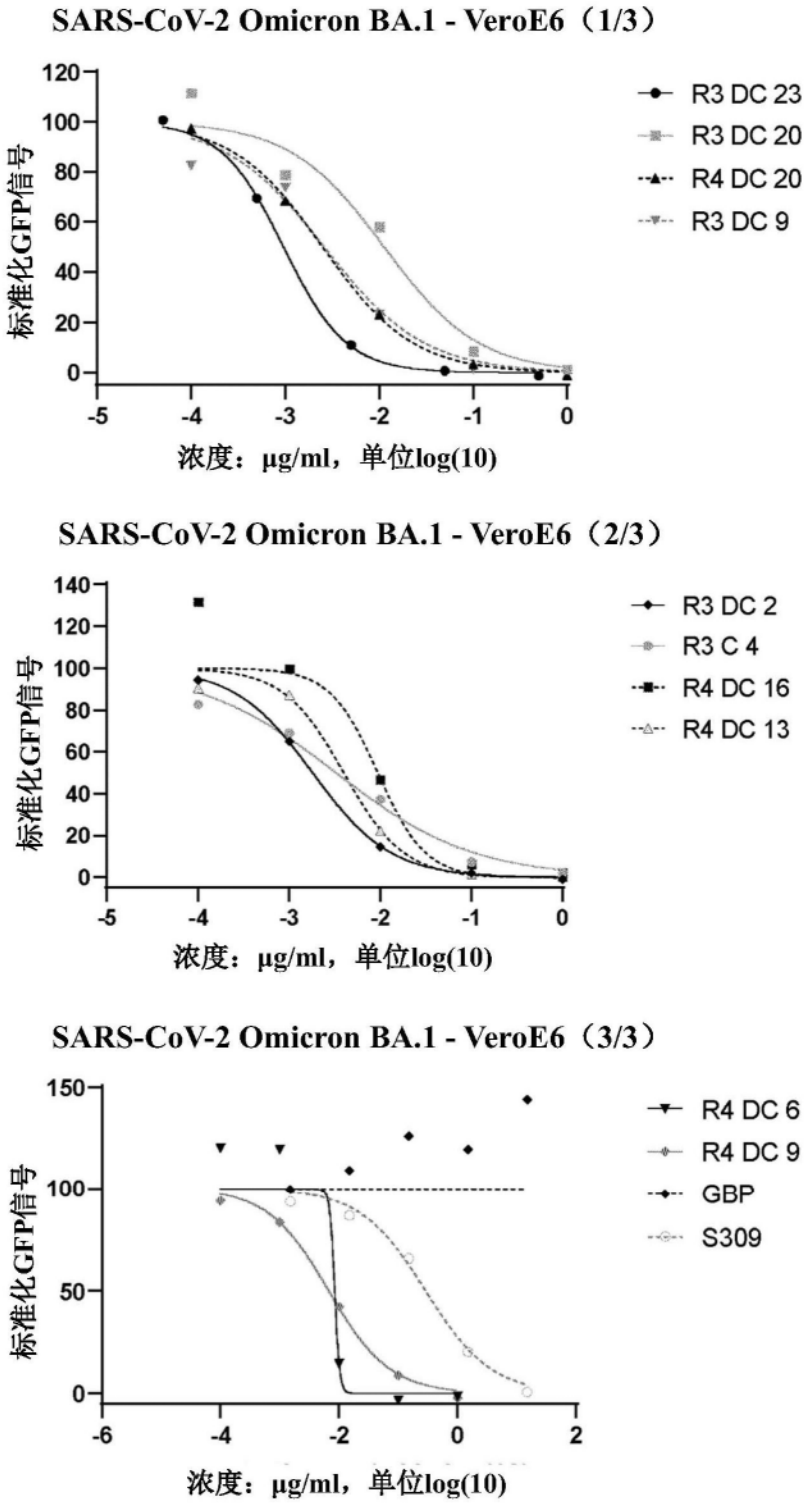

SARS-CoV-2 Omicron BA.1 - VeroE6（1/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
SARS-CoV-2 Omicron BA.1 - VeroE6（2/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-2 Omicron BA.1 - VeroE6（3/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4 DC 6
R4 DC 9
GBP
S309

图8

B

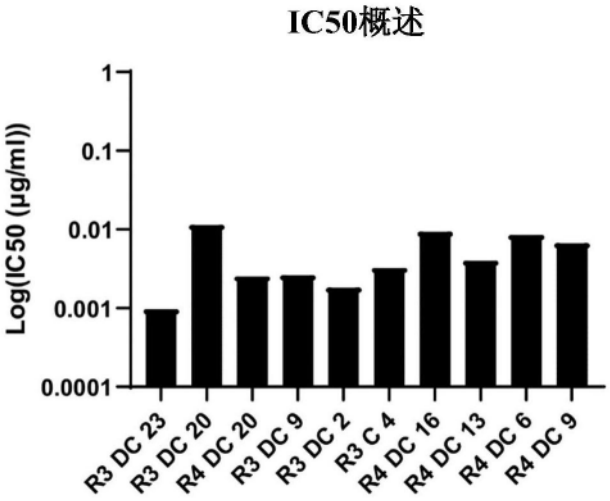

IC50概述
Log(IC50 (μg/ml))
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
R4 DC 6
R4 DC 9

图8(续)

A

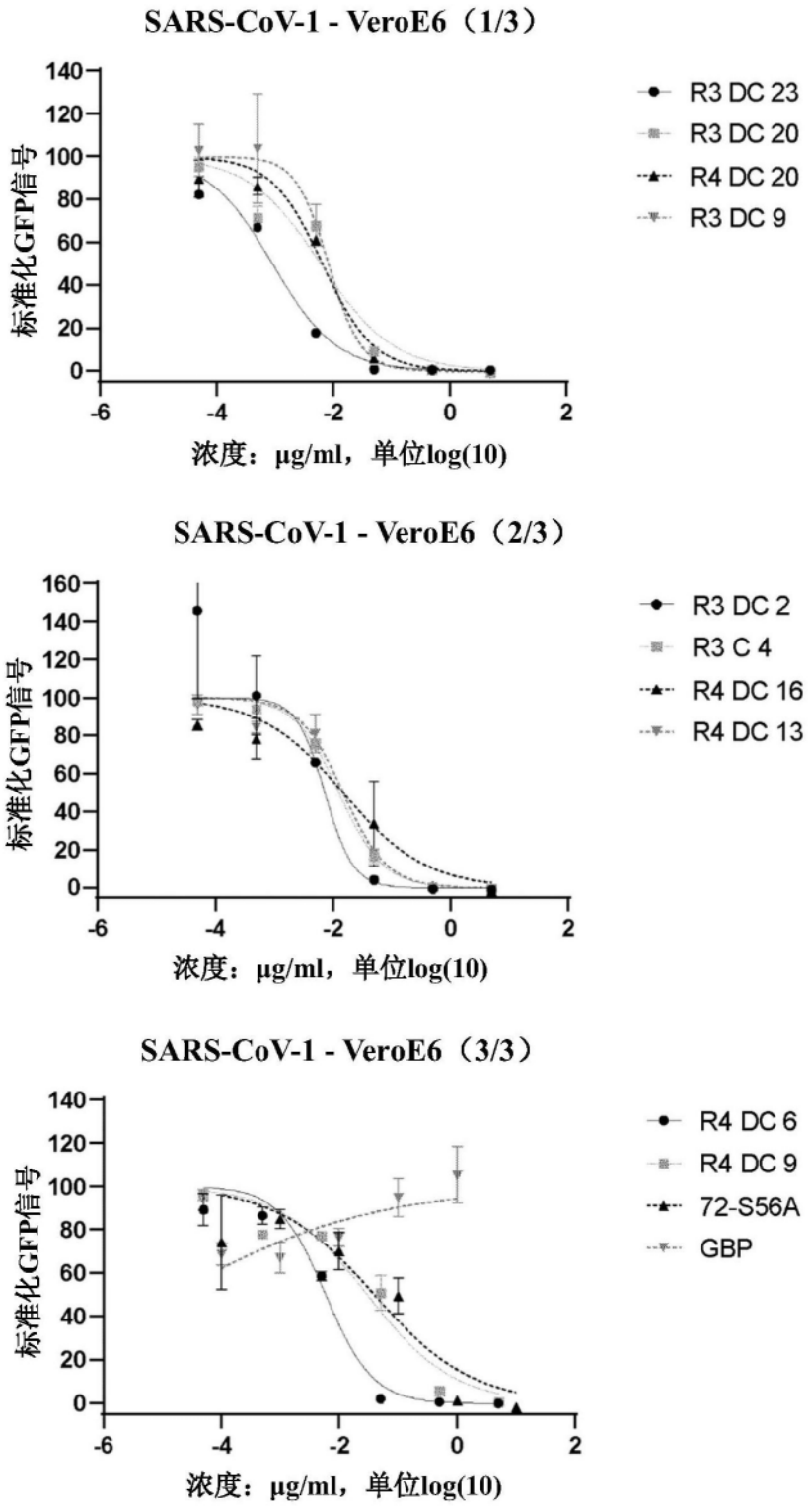

SARS-CoV-1 - VeroE6（1/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
SARS-CoV-1 - VeroE6（2/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-1 - VeroE6（3/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4 DC 6
R4 DC 9
72-S56A
GBP

图9

B

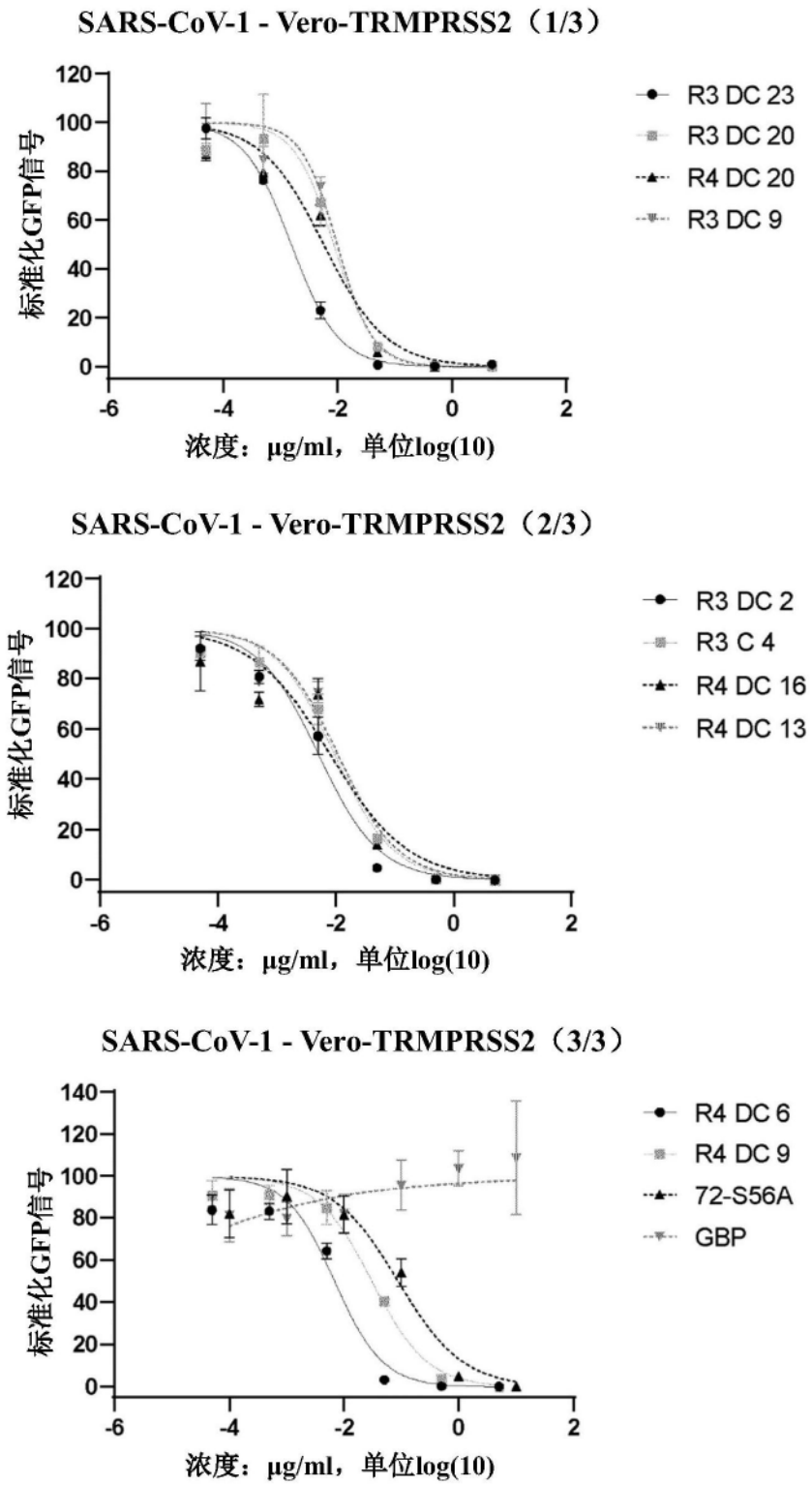

SARS-CoV-1 - Vero-TRMPRSS2（1/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
SARS-CoV-1 - Vero-TRMPRSS2（2/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
SARS-CoV-1 - Vero-TRMPRSS2（3/3）
标准化GFP信号
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4 DC 6
R4 DC 9
72-S56A
GBP

图9(续)

C

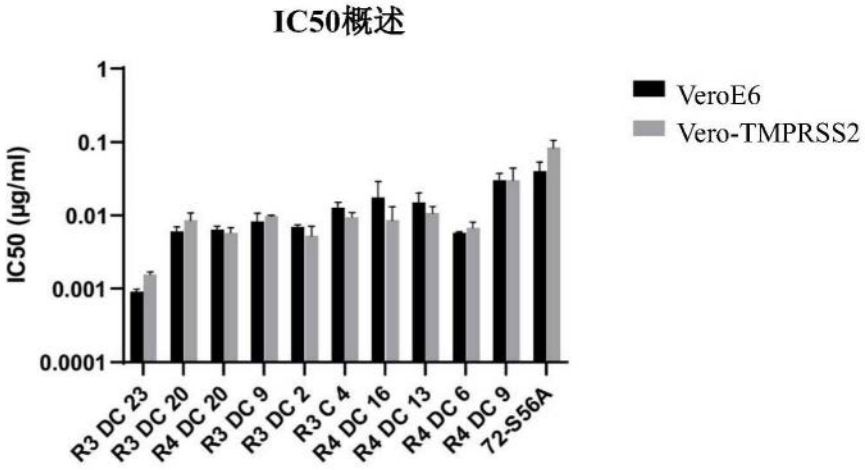

IC50概述
IC50 (μg/ml)
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
VeroE6
Vero-TMPRSS2
R3 DC 23
R3 DC 20
R4 DC 20
R3 DC 9
R3 DC 2
R3 C 4
R4 DC 16
R4 DC 13
R4 DC 6
R4 DC 9
72-S56A

图9(续)

A

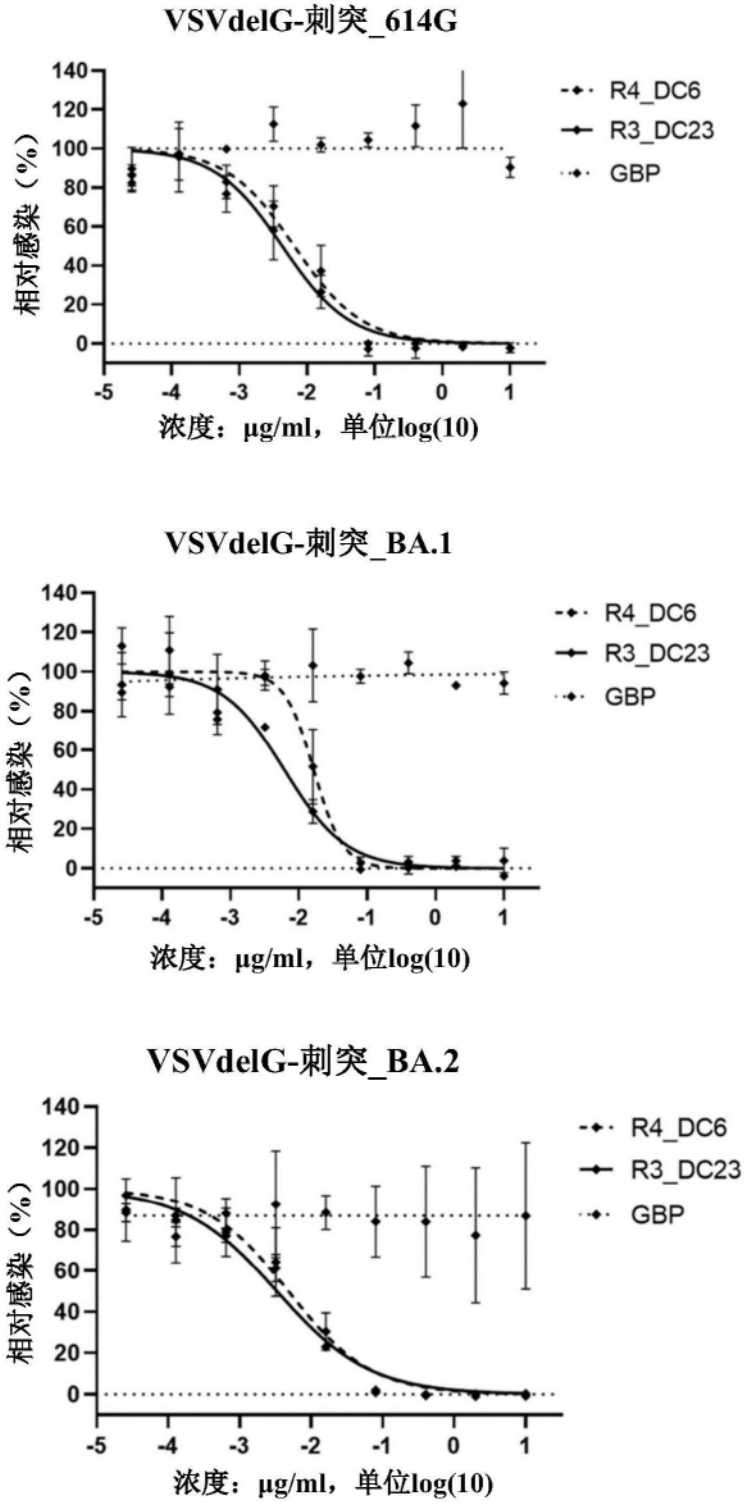

VSVdelG-刺突_614G
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4_DC6
R3_DC23
GBP
VSVdelG-刺突_BA.1
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4_DC6
R3_DC23
GBP
VSVdelG-刺突_BA.2
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4_DC6
R3_DC23
GBP

图10

B

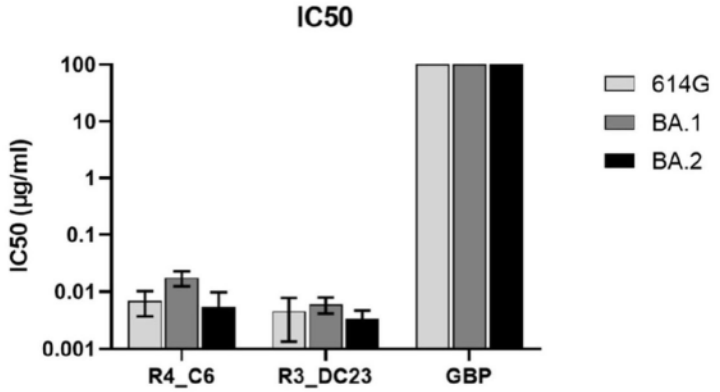
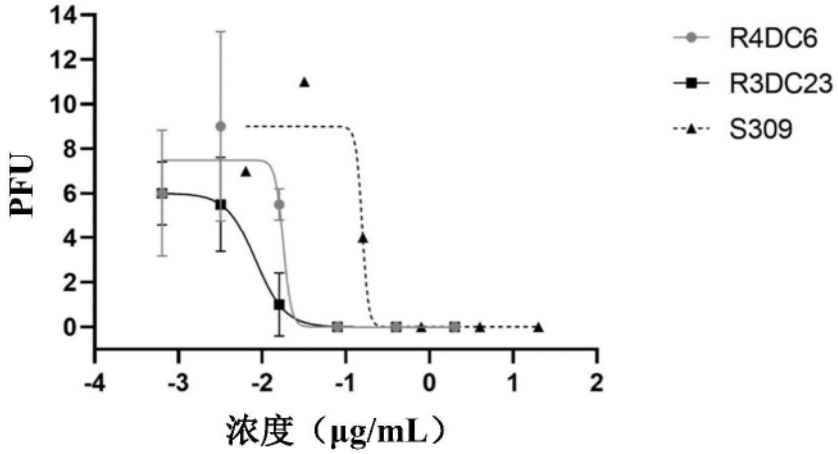

IC50
IC50 (μg/ml)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
R4_C6
R3_DC23
GBP
614G
BA.1
BA.2

图10(续)

A


PFU
14
12
10
8
6
4
2
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
浓度（μg/mL）
R4DC6
R3DC23
S309

B

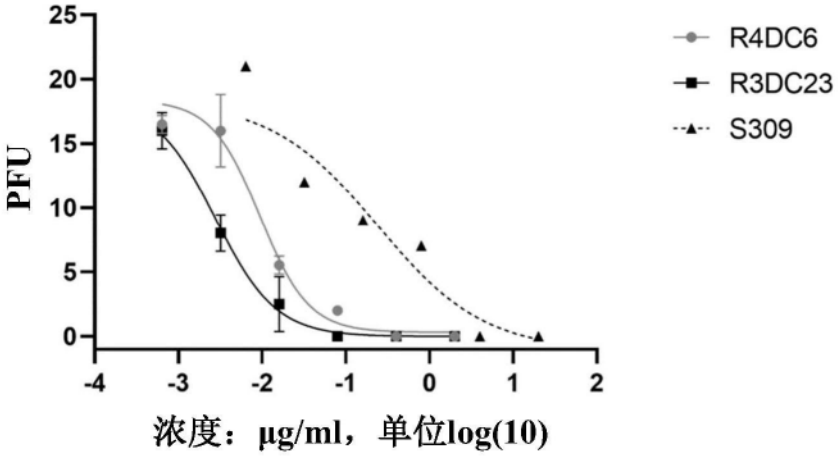

PFU
25
20
15
10
5
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
浓度：μg/ml，单位log(10)
R4DC6
R3DC23
S309

图11

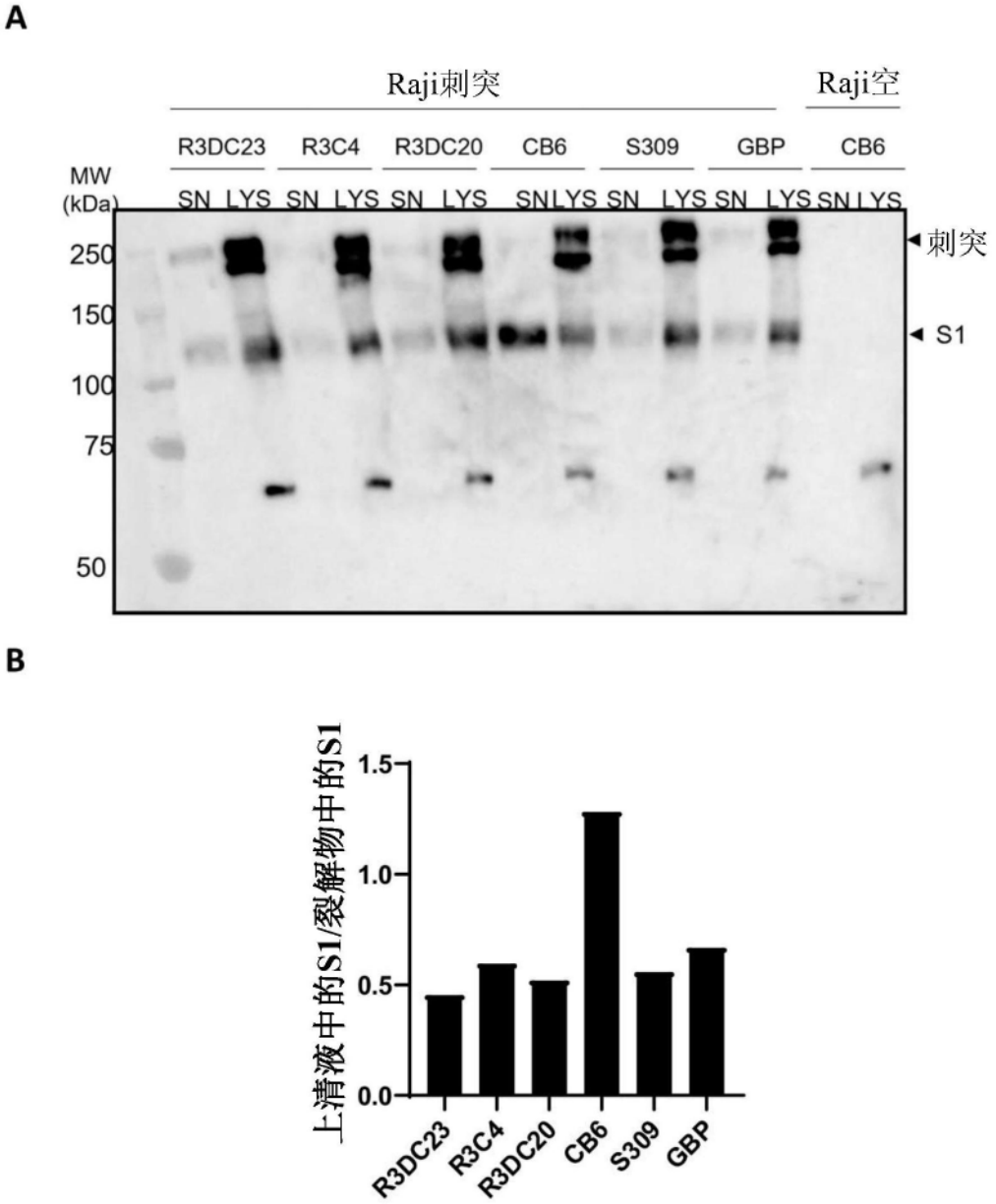

A
Raji刺突
Raji空
R3DC23
R3C4
R3DC20
CB6
S309
GBP
CB6
MW
(kDa)
SN LYS SN LYS SN LYS SN LYS SN LYS SN LYS SN LYS
250
150
100
75
50
刺突
S1
B
上清液中的S1/裂解物中的S1
1.5
1.0
0.5
0.0
R3DC23
R3C4
R3DC20
CB6
S309
GBP

图12

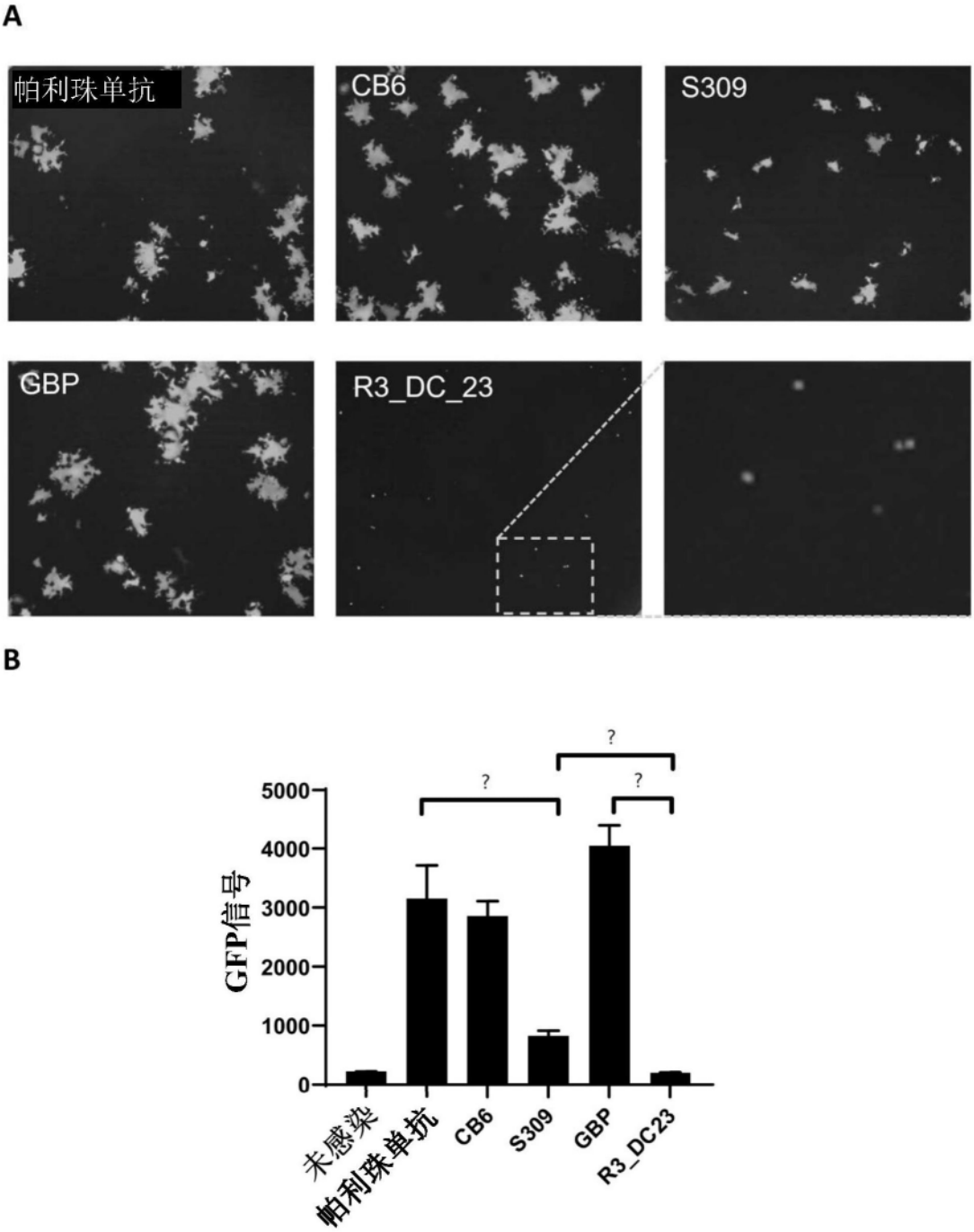

A
帕利珠单抗
CB6
S309
GBP
R3_DC_23
B
GFP信号
5000
4000
3000
2000
1000
0
?
?
?
未感染
帕利珠单抗
CB6
S309
GBP
R3_DC23

图13

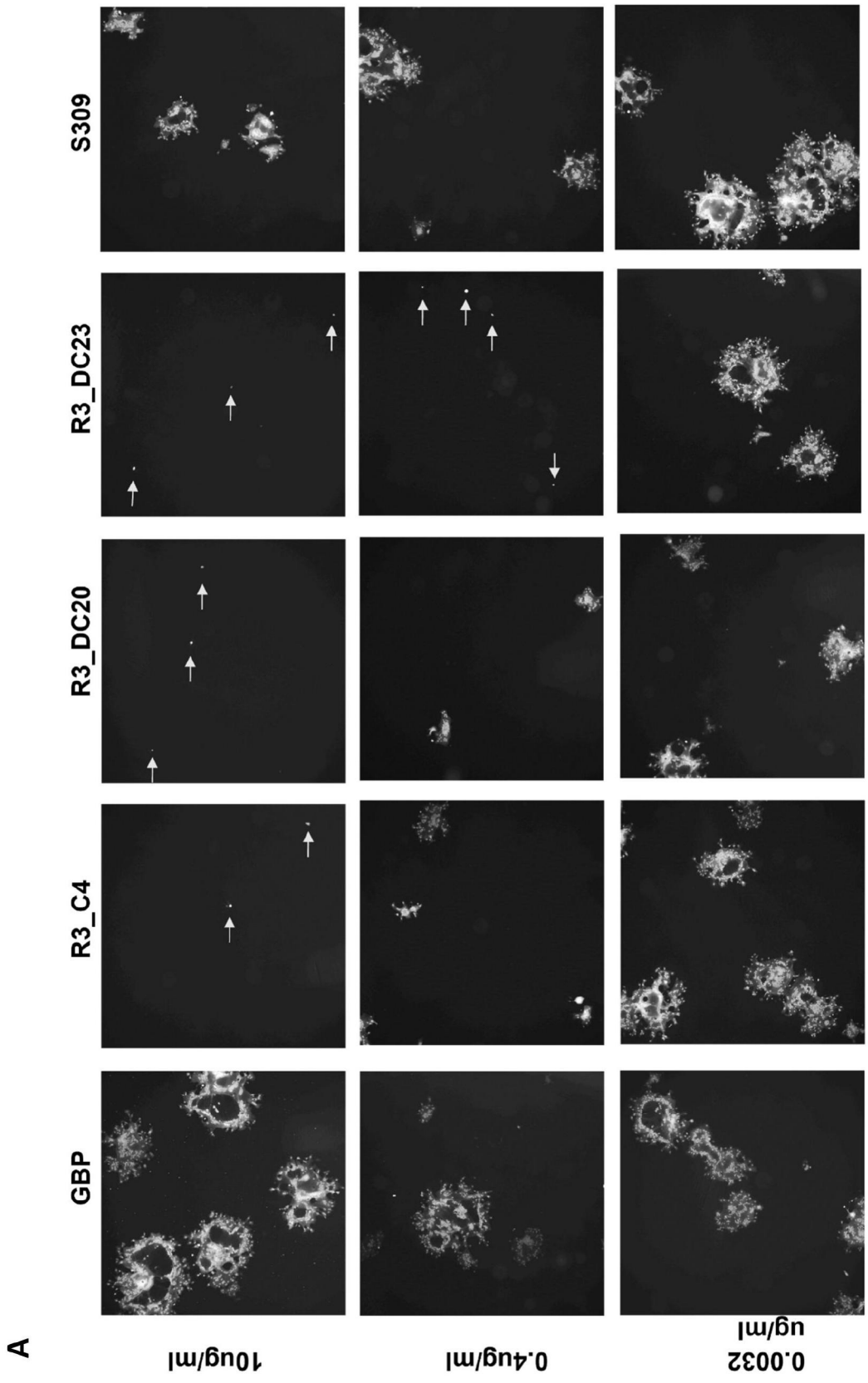


图14

B

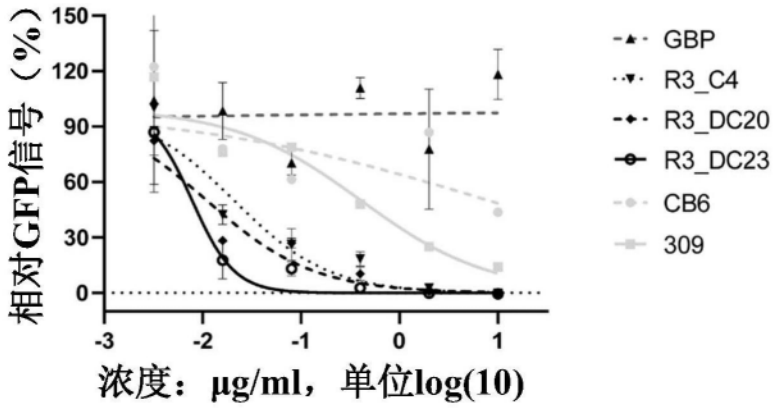


图14(续)

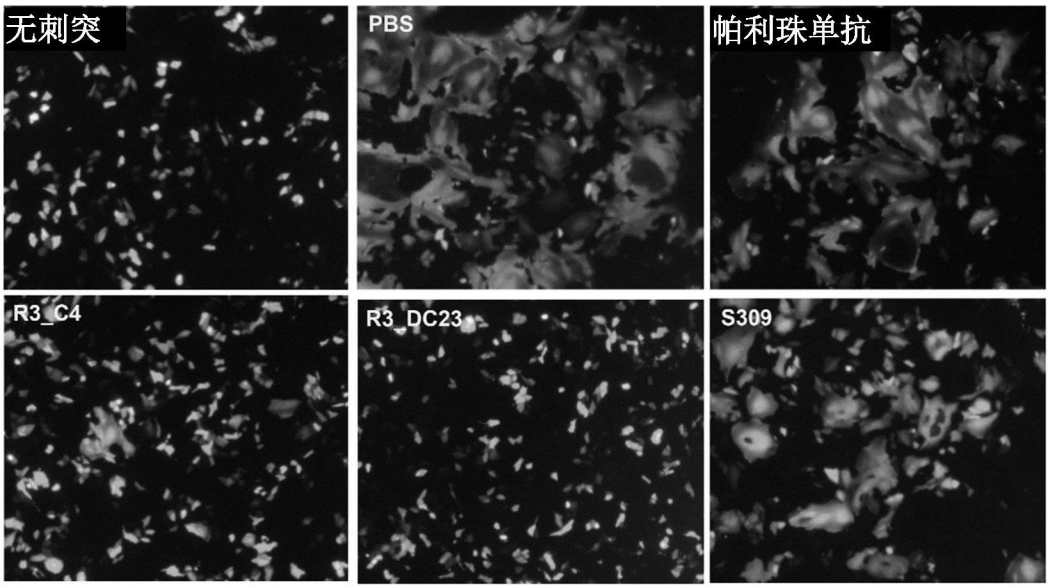


图15

A

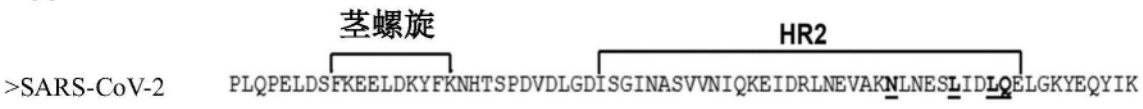


图16

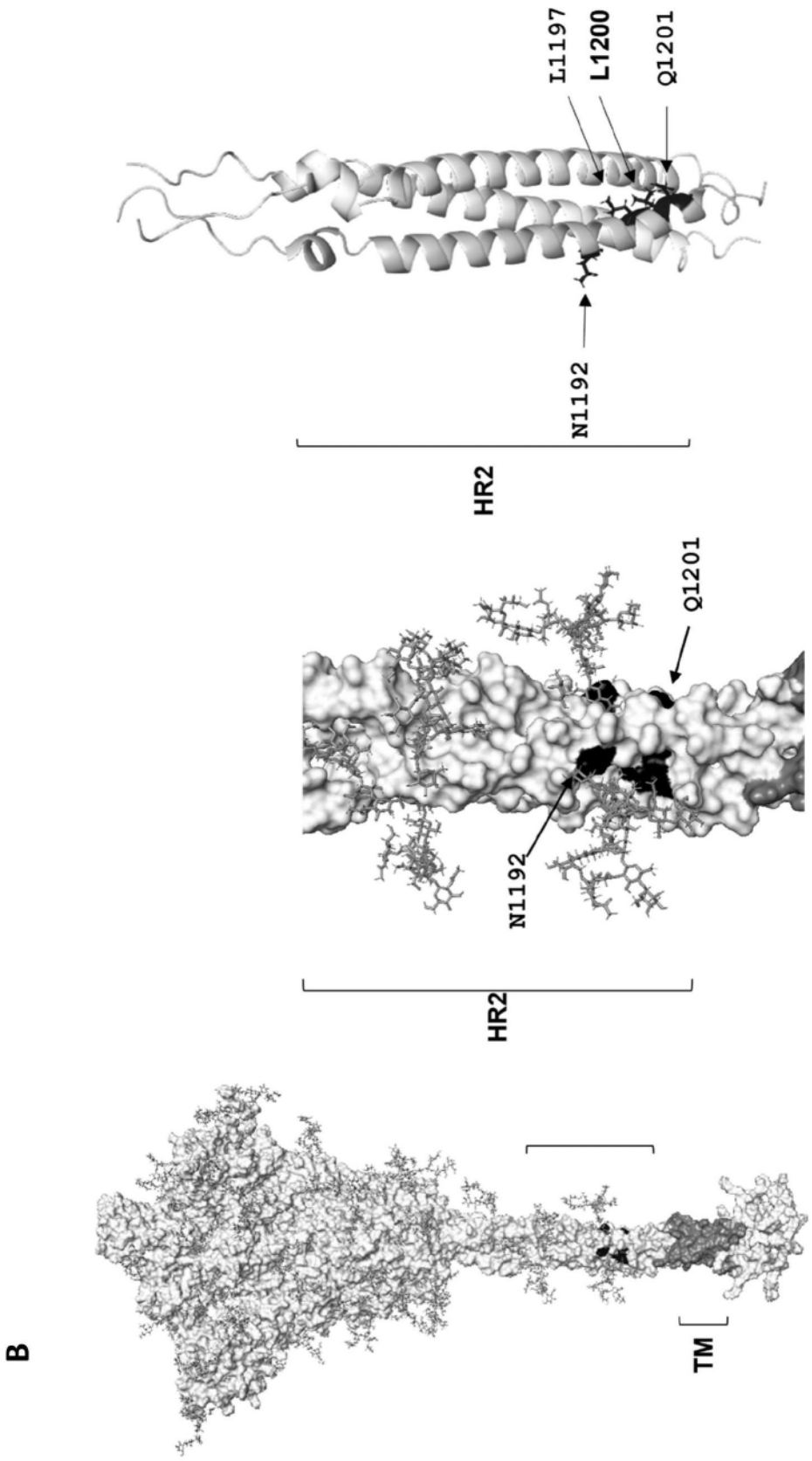


图16(续)

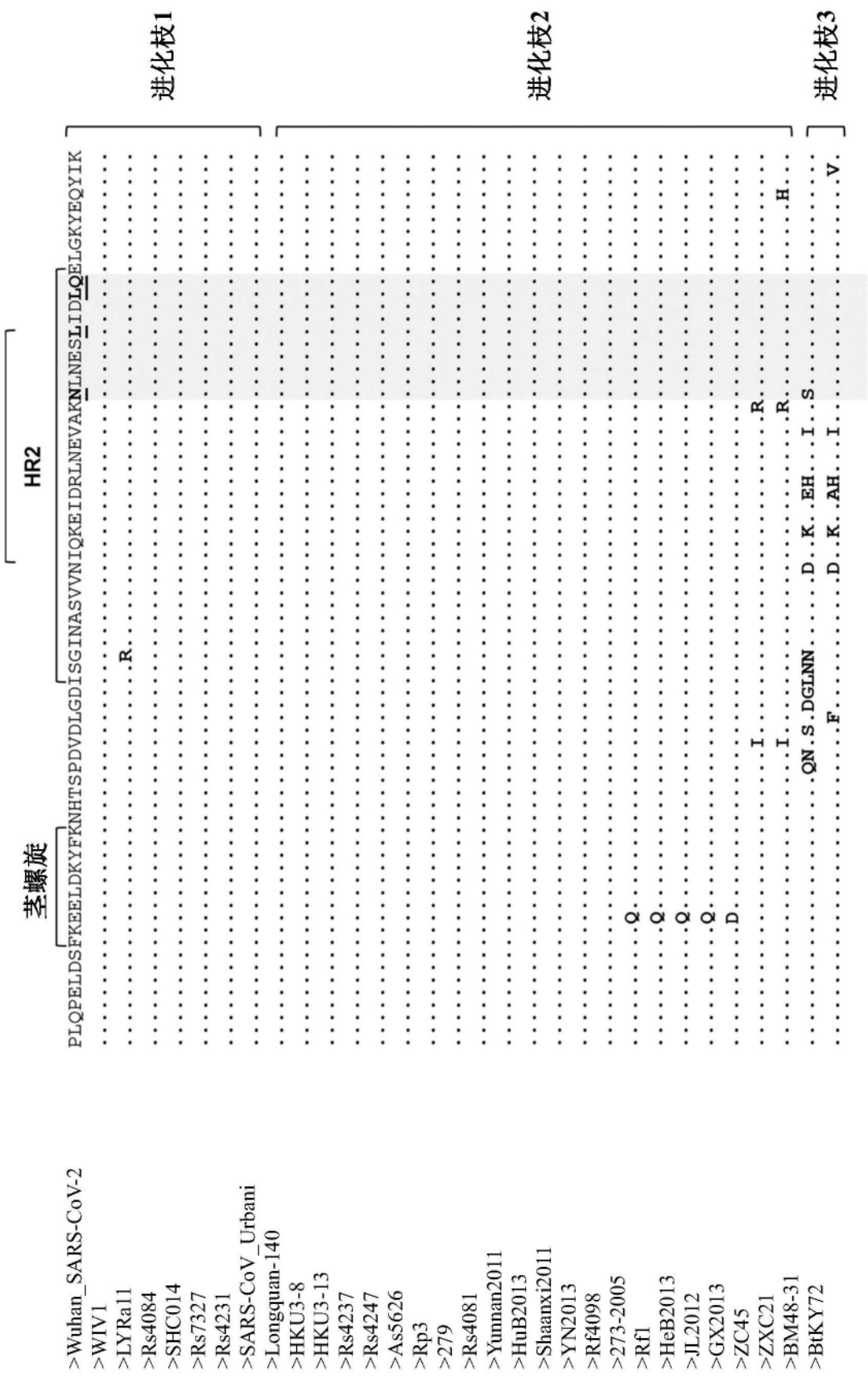
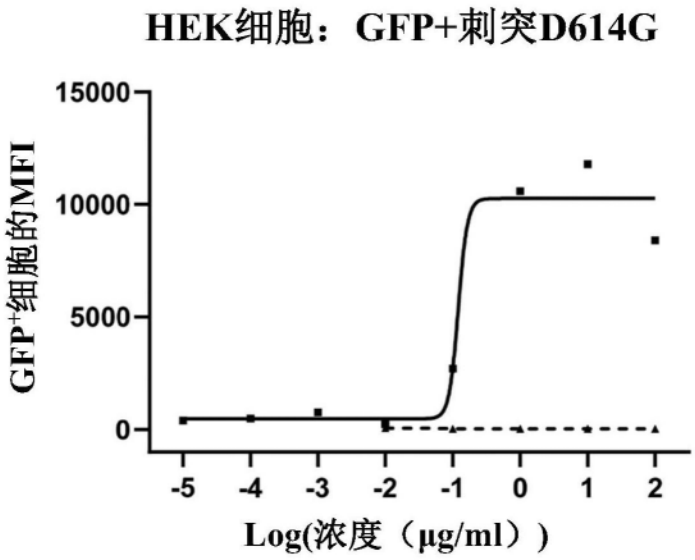

茎螺旋
HR2
进化枝1
进化枝2
进化枝3
>Wuhan_SARS-CoV-2
>WIV1
>LYRa11
>Rs4084
>SHC014
>Rs7327
>Rs4231
>SARS-CoV_Urbani
>Longquan-140
>HKU3-8
>HKU3-13
>Rs4237
>Rs4247
>As5626
>Rp3
>279
>Rs4081
>Yunnan2011
>HuB2013
>Shaanxi2011
>YN2013
>Rf4098
>273-2005
>Rf1
>HeB2013
>JL2012
>GX2013
>ZC45
>ZXC21
>BM48-31
>BtKY72

图17

A


HEK细胞：GFP+刺突D614G
GFP+细胞的MFI
15000
10000
5000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log(浓度（μg/ml）)

B

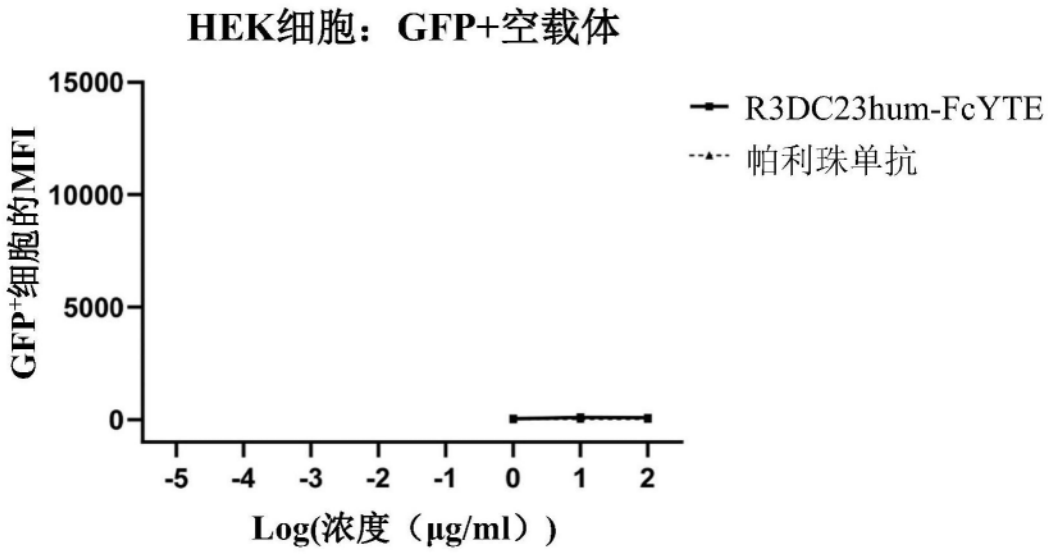

HEK细胞：GFP+空载体
GFP+细胞的MFI
15000
10000
5000
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Log(浓度（μg/ml）)
R3DC23hum-FcYTE
帕利珠单抗

图18

A

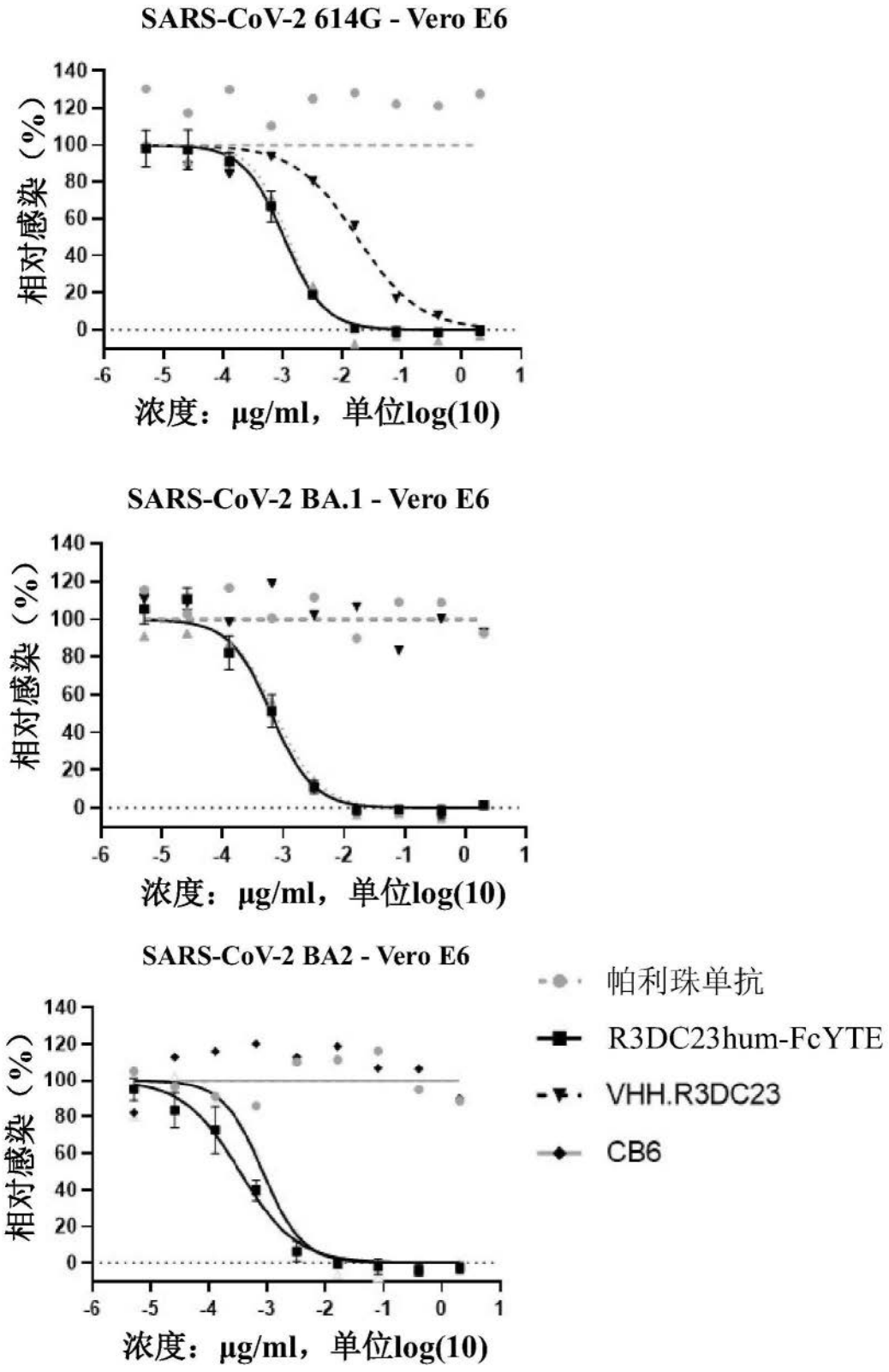
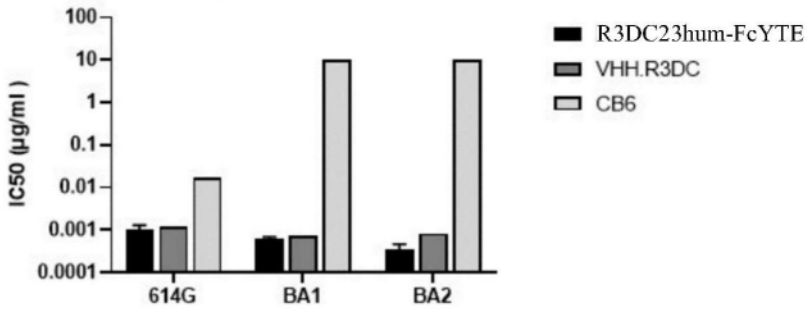

SARS-CoV-2 614G - Vero E6
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
SARS-CoV-2 BA.1 - Vero E6
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
SARS-CoV-2 BA2 - Vero E6
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
帕利珠单抗
R3DC23hum-FcYTE
VHH.R3DC23
CB6

图19

B



		614G	BA1	BA2
R3D C23hum-FcYTE	平均值	0.001	0.001	3.523e-004
	SD	0.0002	0.0001	0.0001
	N	3	3	3
VHH.R3DC	平均值	0.001	0.001	0.001
	SD	0.000	0.000	0.000
	N	1	1	1
CB6	平均值	0.018	10.000	10.000
	SD	0.000	0.000	0.000
	N	1	1	1

图19(续)

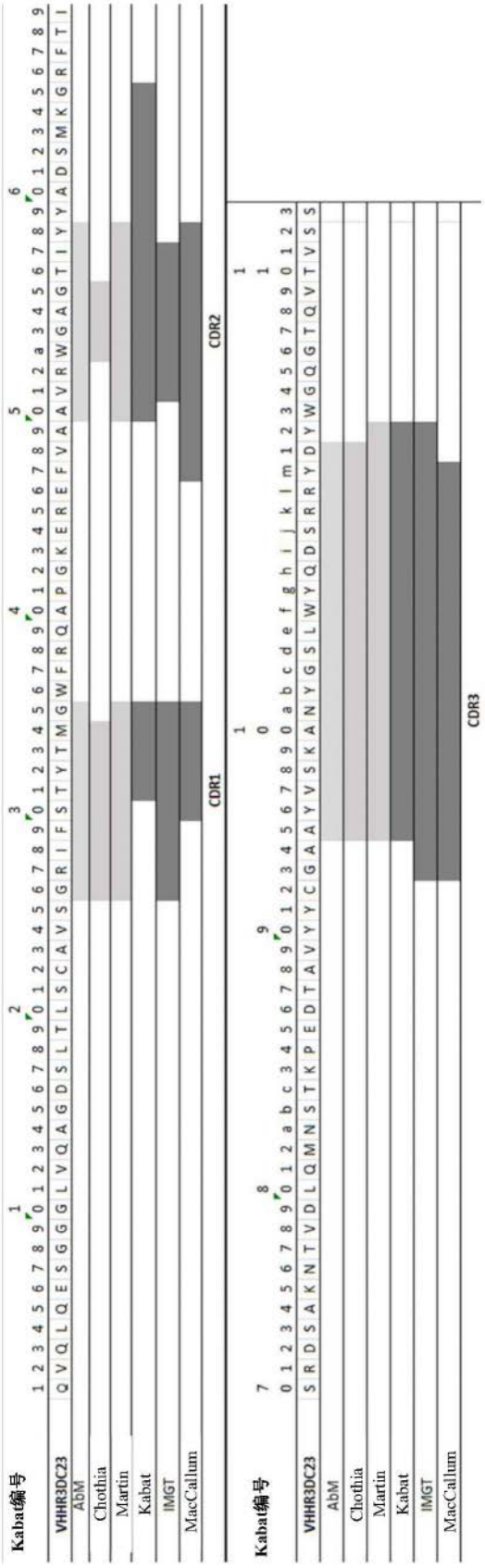

Kabat编号
VHHR3DC23
AbM
Chothia
Martin
Kabat
IMGT
MacCallum
CDR1
CDR2
CDR3

图20

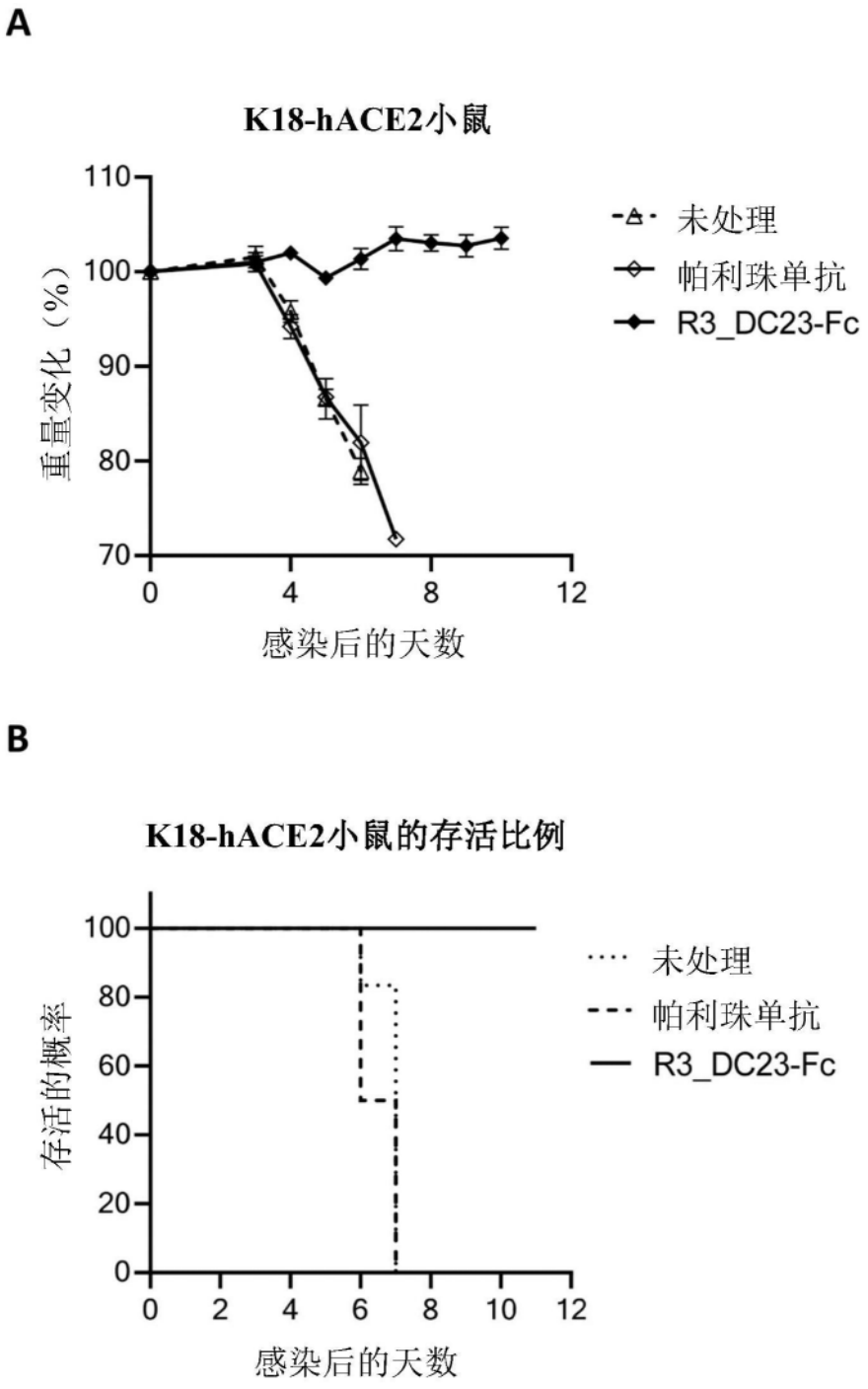

A
K18-hACE2小鼠
重量变化（%）
110
100
90
80
70
0
4
8
12
感染后的天数
未处理
帕利珠单抗
R3_DC23-Fc
B
K18-hACE2小鼠的存活比例
存活的概率
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
感染后的天数
未处理
帕利珠单抗
R3_DC23-Fc

图21

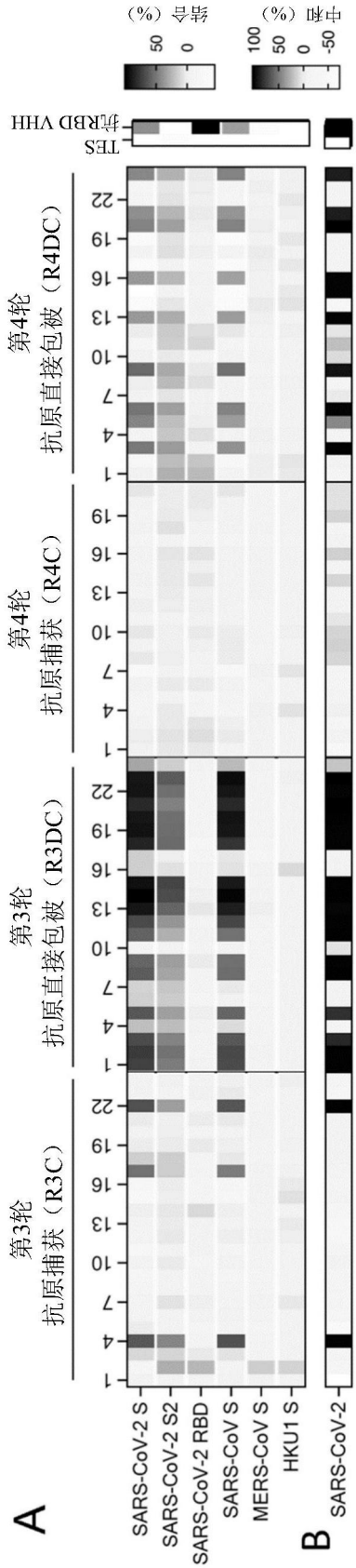

中和（%）
100
50
0
-50
结合（%）
50
0
TES
抗RBD VHH
第4轮
抗原直接包被（R4DC）
第4轮
抗原捕获（R4C）
第3轮
抗原直接包被（R3DC）
第3轮
抗原捕获（R3C）
1
4
7
10
13
16
19
22
SARS-CoV-2 S
SARS-CoV-2 S2
SARS-CoV-2 RBD
SARS-CoV S
MERS-CoV S
HKU1 S
A
SARS-CoV-2
B

图22

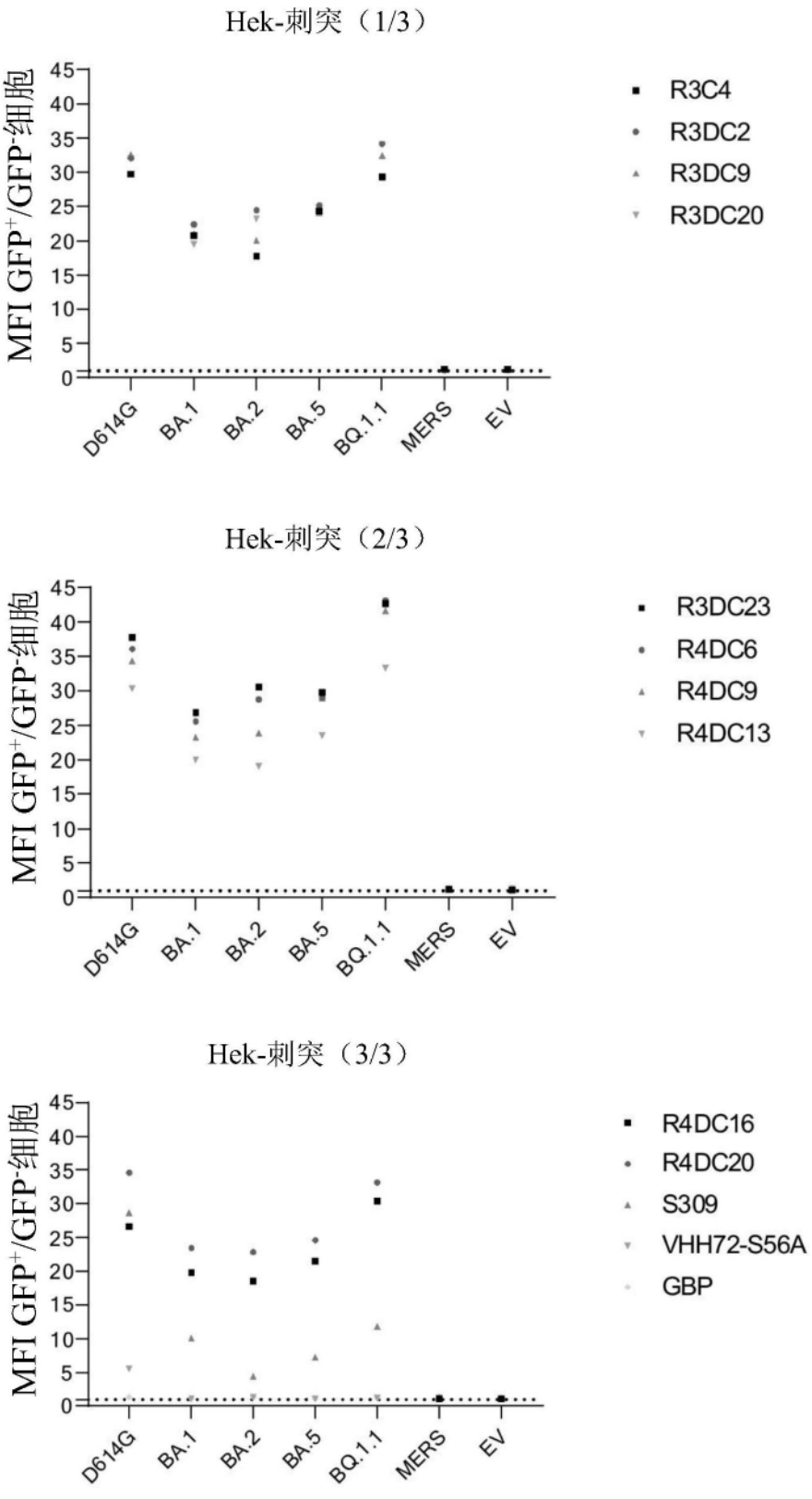

Hek-刺突（1/3）
MFI GFP+/GFP-细胞
R3C4
R3DC2
R3DC9
R3DC20
D614G
BA.1
BA.2
BA.5
BQ.1.1
MERS
EV
Hek-刺突（2/3）
MFI GFP+/GFP-细胞
R3DC23
R4DC6
R4DC9
R4DC13
Hek-刺突（3/3）
MFI GFP+/GFP-细胞
R4DC16
R4DC20
S309
VHH72-S56A
GBP

图23

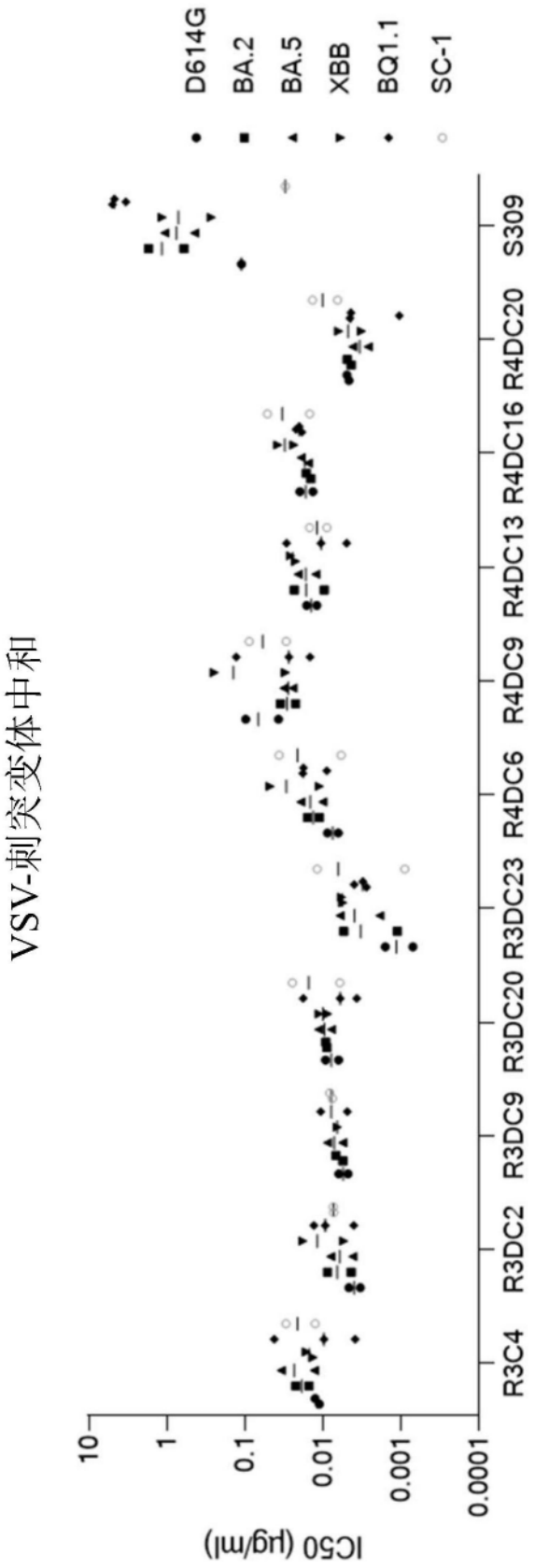

VSV-刺突变体中和
IC50 (μg/ml)
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
D614G
BA.2
BA.5
XBB
BQ1.1
SC-1
R3C4
R3DC2
R3DC9
R3DC20
R3DC23
R4DC6
R4DC9
R4DC13
R4DC16
R4DC20
S309

图24

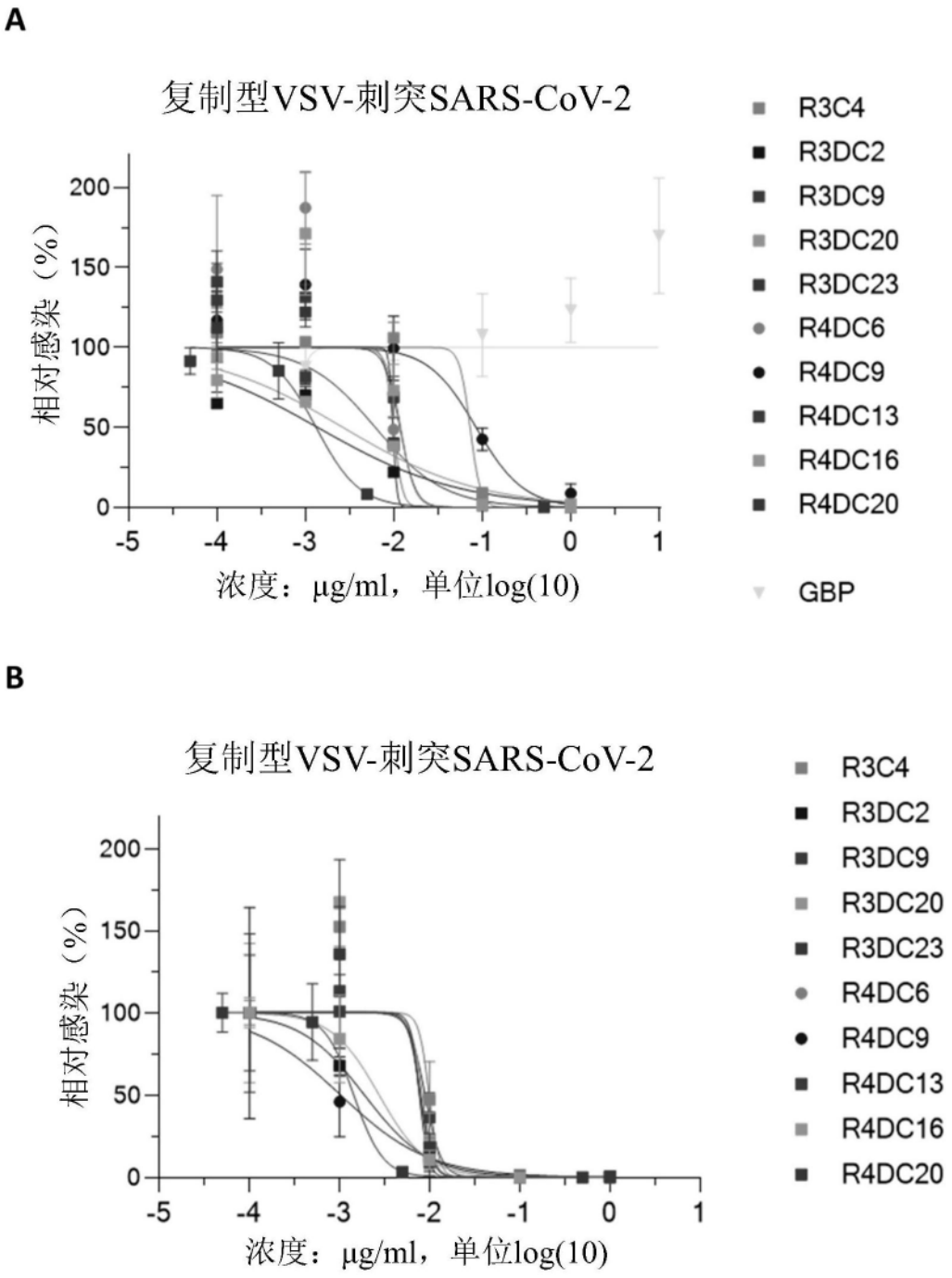

A
复制型VSV-刺突SARS-CoV-2
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3C4
R3DC2
R3DC9
R3DC20
R3DC23
R4DC6
R4DC9
R4DC13
R4DC16
R4DC20
GBP
B
复制型VSV-刺突SARS-CoV-2
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3C4
R3DC2
R3DC9
R3DC20
R3DC23
R4DC6
R4DC9
R4DC13
R4DC16
R4DC20

图25

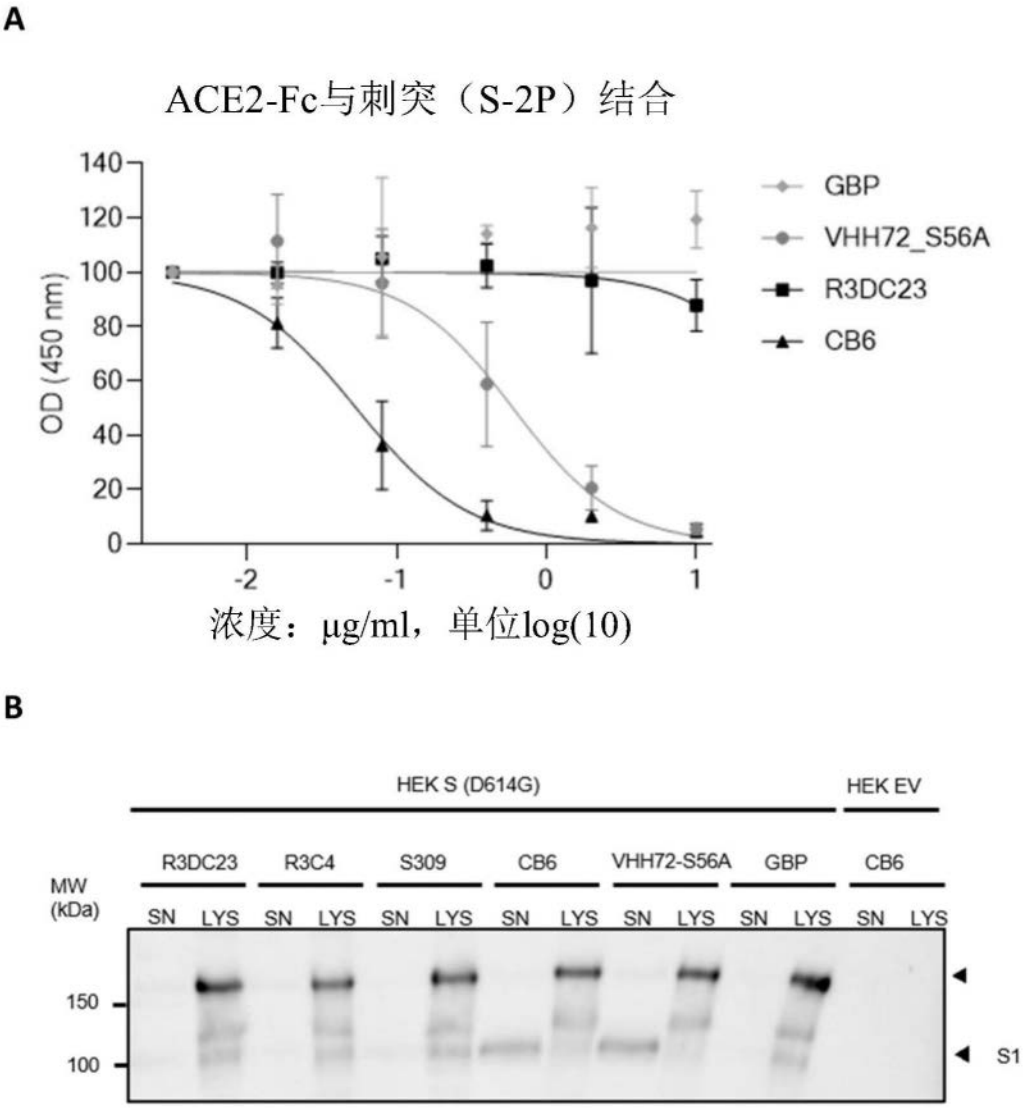
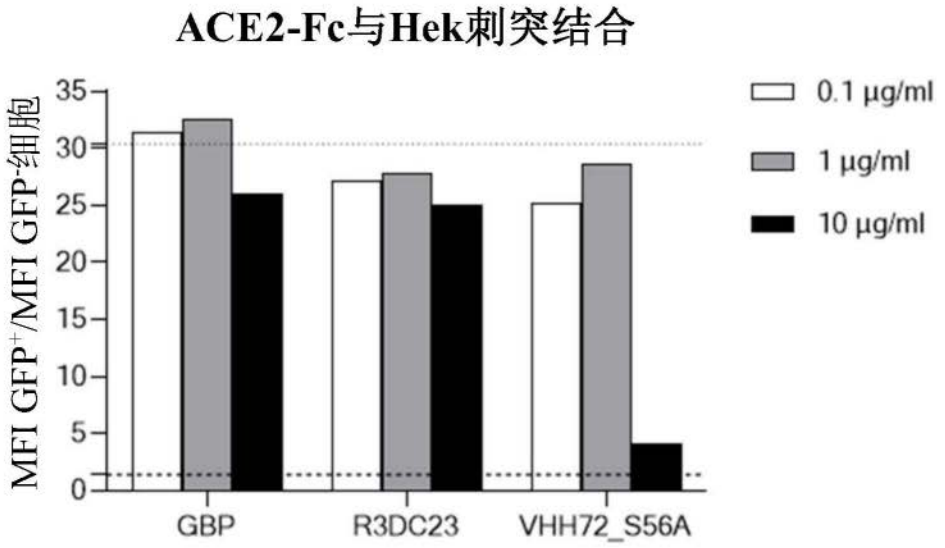

A
ACE2-Fc与刺突（S-2P）结合
OD (450 nm)
140
120
100
80
60
40
20
0
-2
-1
0
1
浓度：μg/ml，单位log(10)
GBP
VHH72_S56A
R3DC23
CB6
B
HEK S (D614G)
HEK EV
R3DC23
R3C4
S309
CB6
VHH72-S56A
GBP
CB6
MW
(kDa)
SN LYS SN LYS SN LYS SN LYS SN LYS SN LYS SN LYS
150
100
S1

图26

C


ACE2-Fc与Hek刺突结合
MFI GFP+/MFI GFP-细胞
35
30
25
20
15
10
5
0
GBP
R3DC23
VHH72_S56A
0.1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml

D

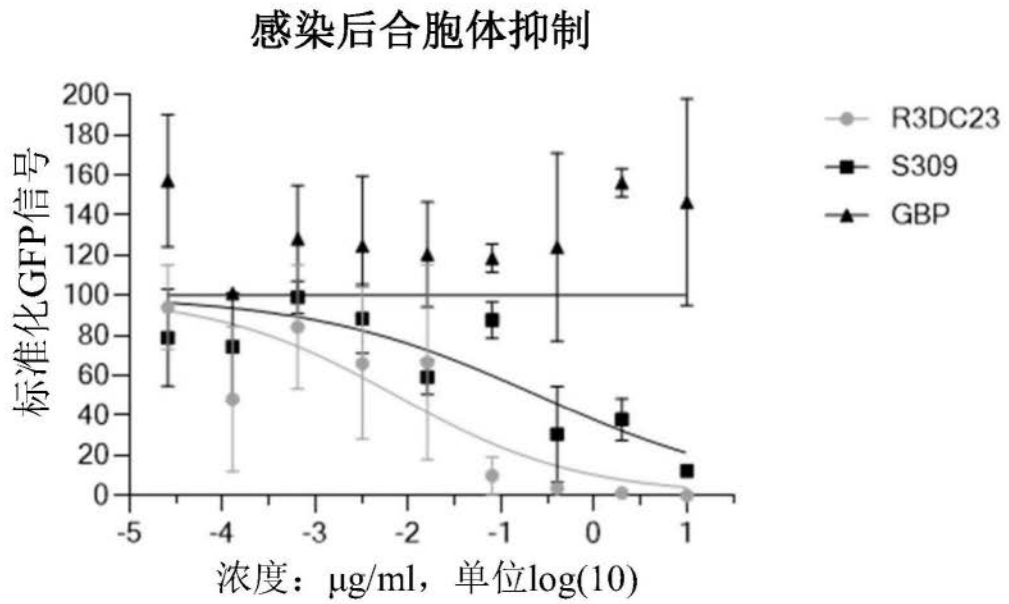

感染后合胞体抑制
标准化GFP信号
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
浓度：μg/ml，单位log(10)
R3DC23
S309
GBP

图26(续)

E

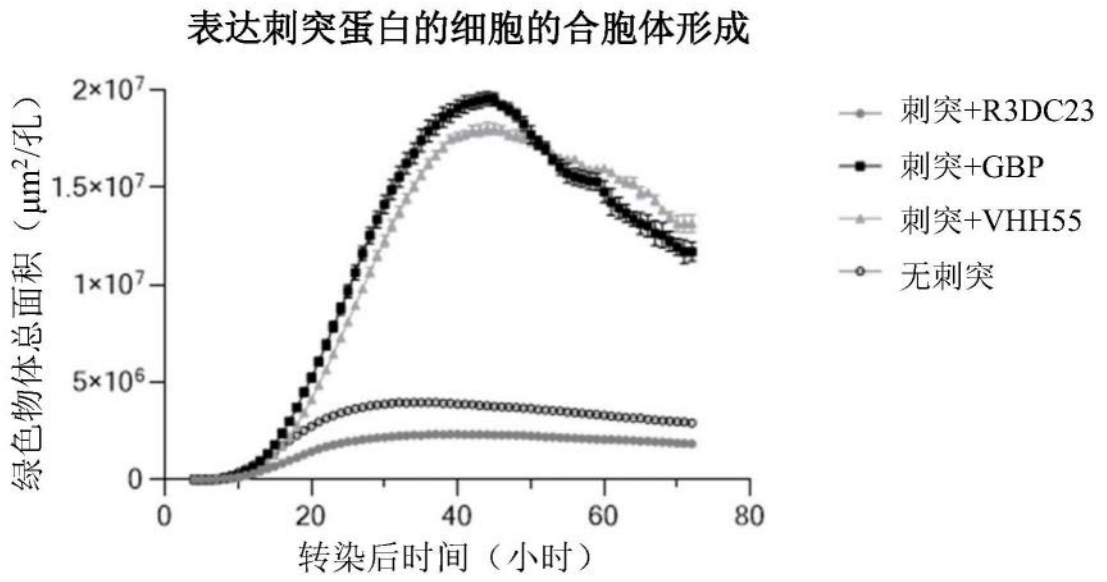

表达刺突蛋白的细胞的合胞体形成
绿色物体总面积（μm²/孔）
2×10⁷
1.5×10⁷
1×10⁷
5×10⁶
0
0
20
40
60
80
转染后时间（小时）
刺突+R3DC23
刺突+GBP
刺突+VHH55
无刺突

图26(续)

A

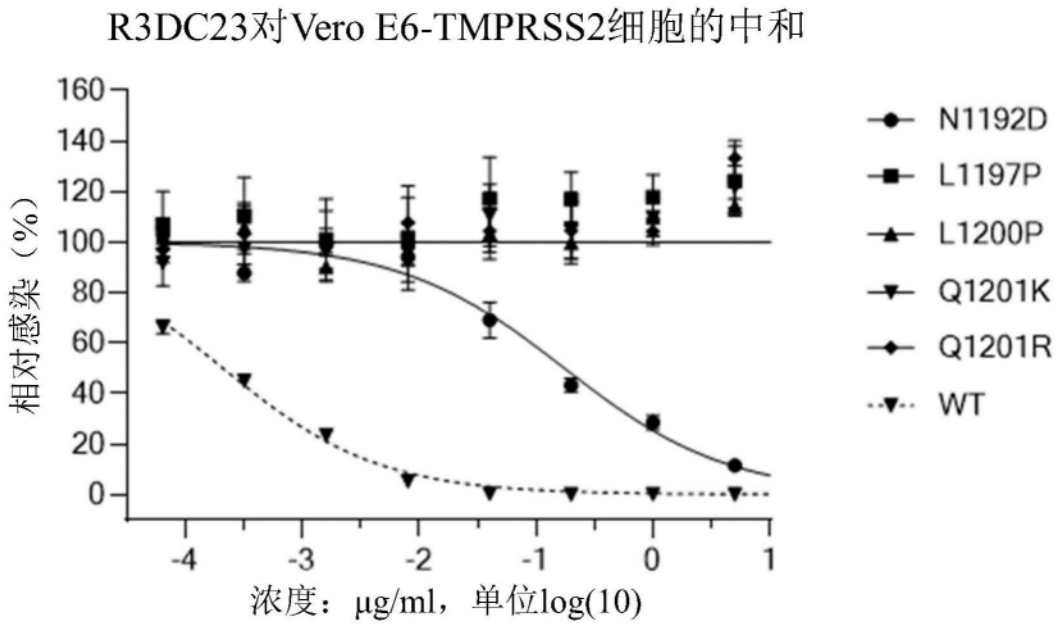

R3DC23对Vero E6-TMPRSS2细胞的中和
相对感染（%）
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
1
浓度：μg/ml，单位log(10)
N1192D
L1197P
L1200P
Q1201K
Q1201R
WT

图27

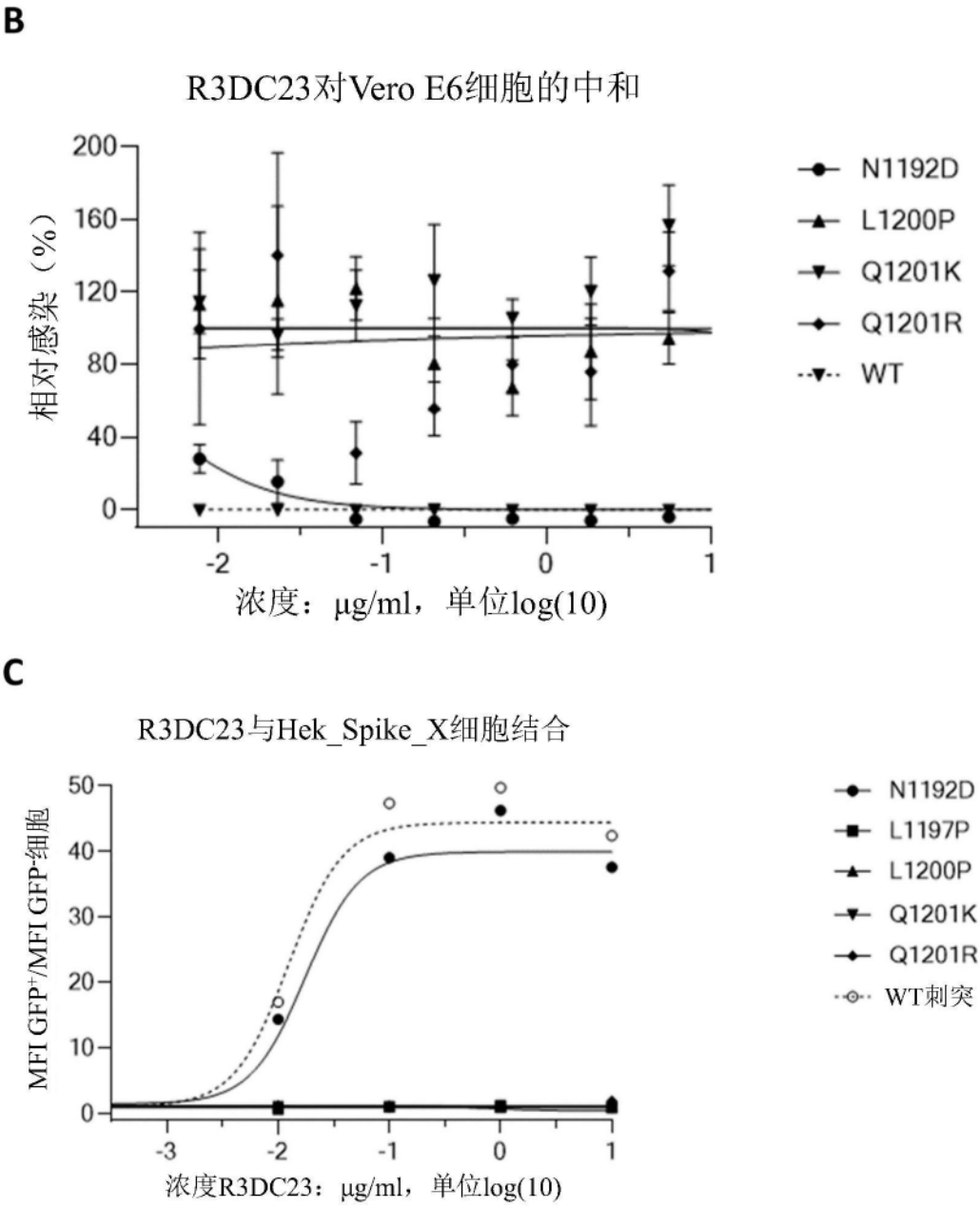

B
R3DC23对Vero E6细胞的中和
相对感染（%）
200
160
120
80
40
0
-2
-1
0
1
浓度：μg/ml，单位log(10)
N1192D
L1200P
Q1201K
Q1201R
WT
C
R3DC23与Hek_Spike_X细胞结合
MFI GFP+/MFI GFP-细胞
50
40
30
20
10
0
-3
-2
-1
0
1
浓度R3DC23：μg/ml，单位log(10)
N1192D
L1197P
L1200P
Q1201K
Q1201R
WT刺突

图27(续)

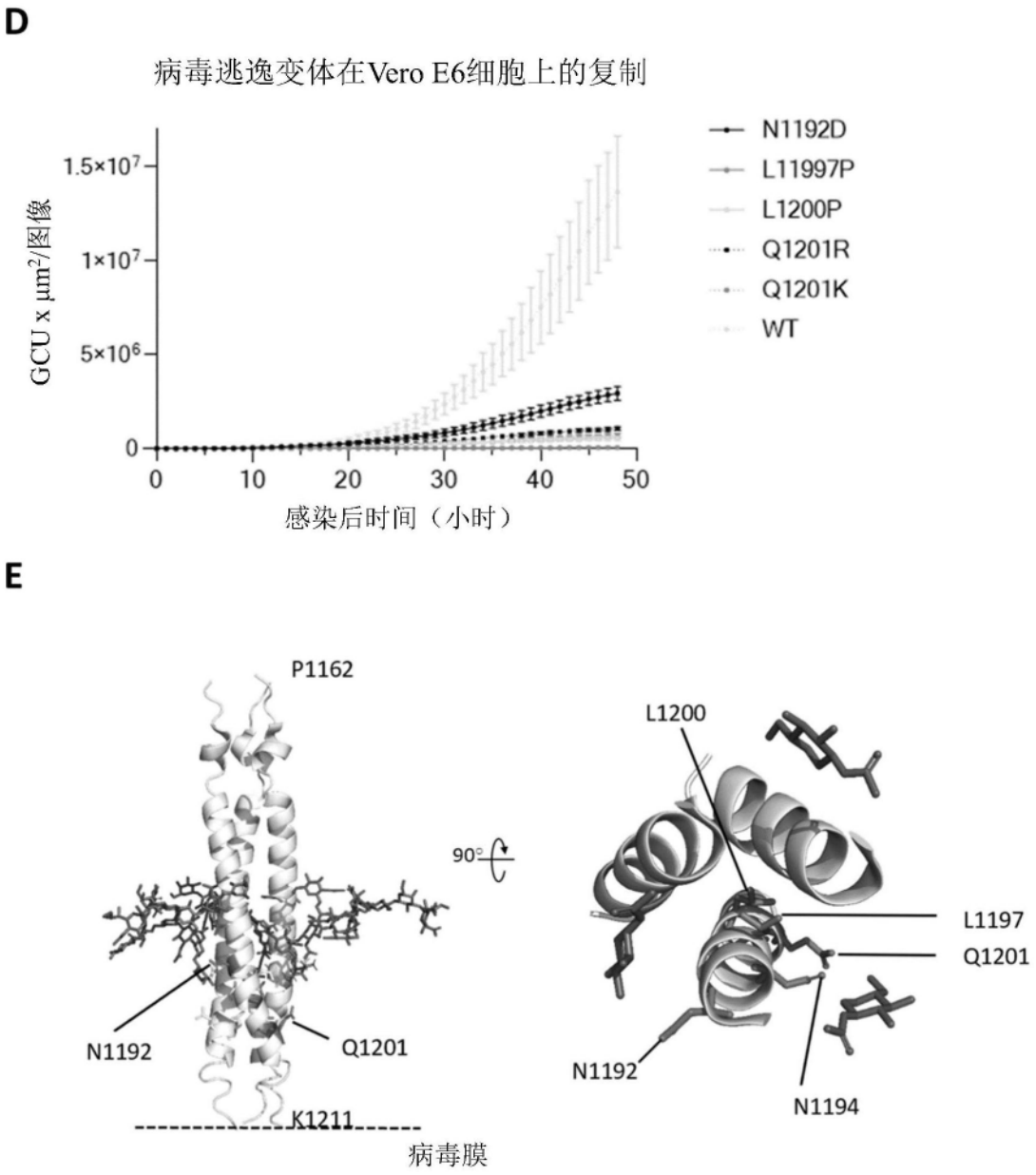

D
病毒逃逸变体在Vero E6细胞上的复制
GCU x μm²/图像
1.5×10⁷
1×10⁷
5×10⁶
0
0
10
20
30
40
50
感染后时间（小时）
N1192D
L11997P
L1200P
Q1201R
Q1201K
WT
E
P1162
90°
N1192
Q1201
K1211
病毒膜
L1200
L1197
Q1201
N1192
N1194

图27(续)

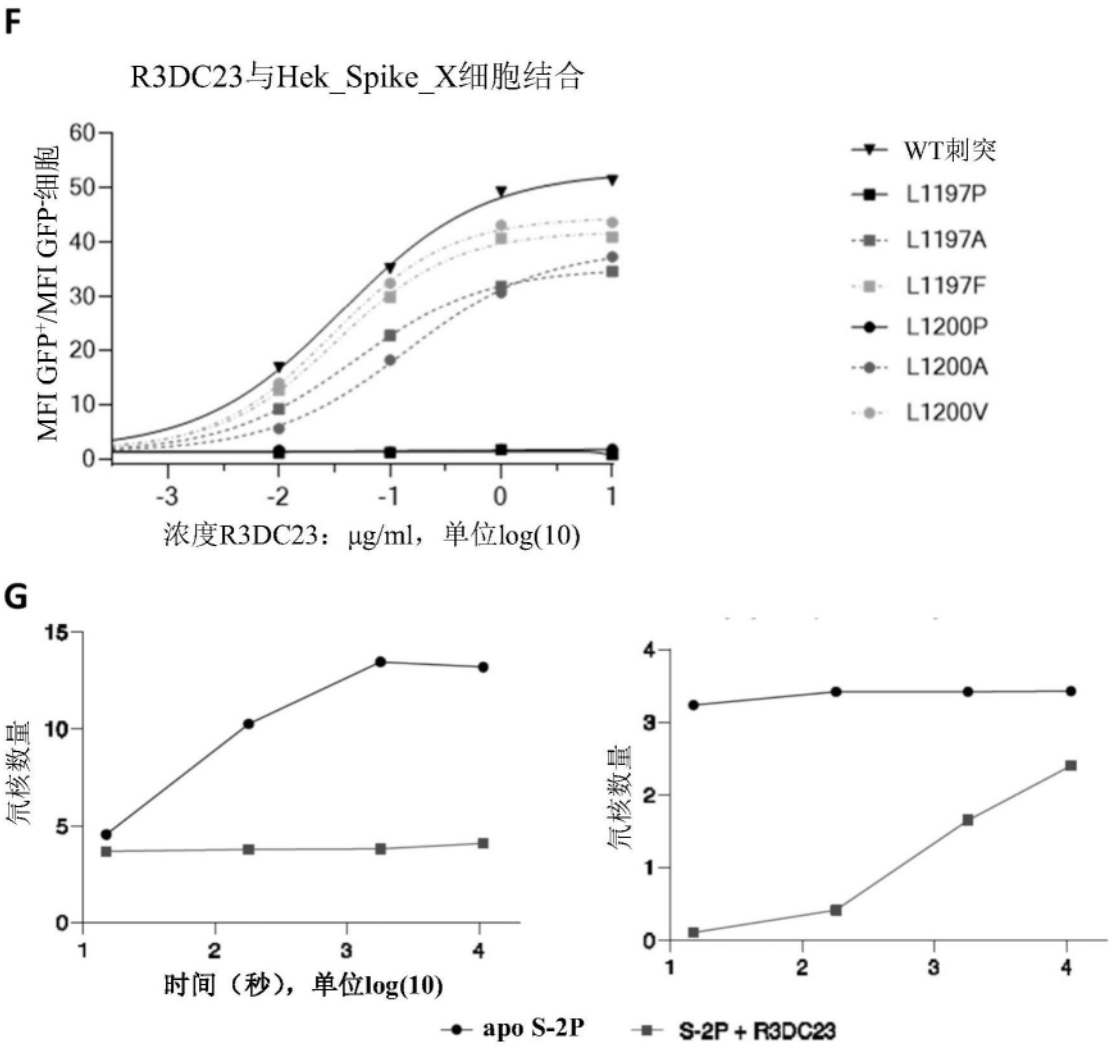

F
R3DC23与Hek_Spike_X细胞结合
MFI GFP+/MFI GFP-细胞
浓度R3DC23：μg/ml，单位log(10)
WT刺突
L1197P
L1197A
L1197F
L1200P
L1200A
L1200V
G
氘核数量
时间（秒），单位log(10)
apo S-2P
S-2P + R3DC23
H
Woods图apo S-2P-R3DC23结合
apo的更多交换
表位区
R3DC23的更多交换
氘核数量的差异
残基数目
氘化时间
15s
3m
15m
3h

图27(续)

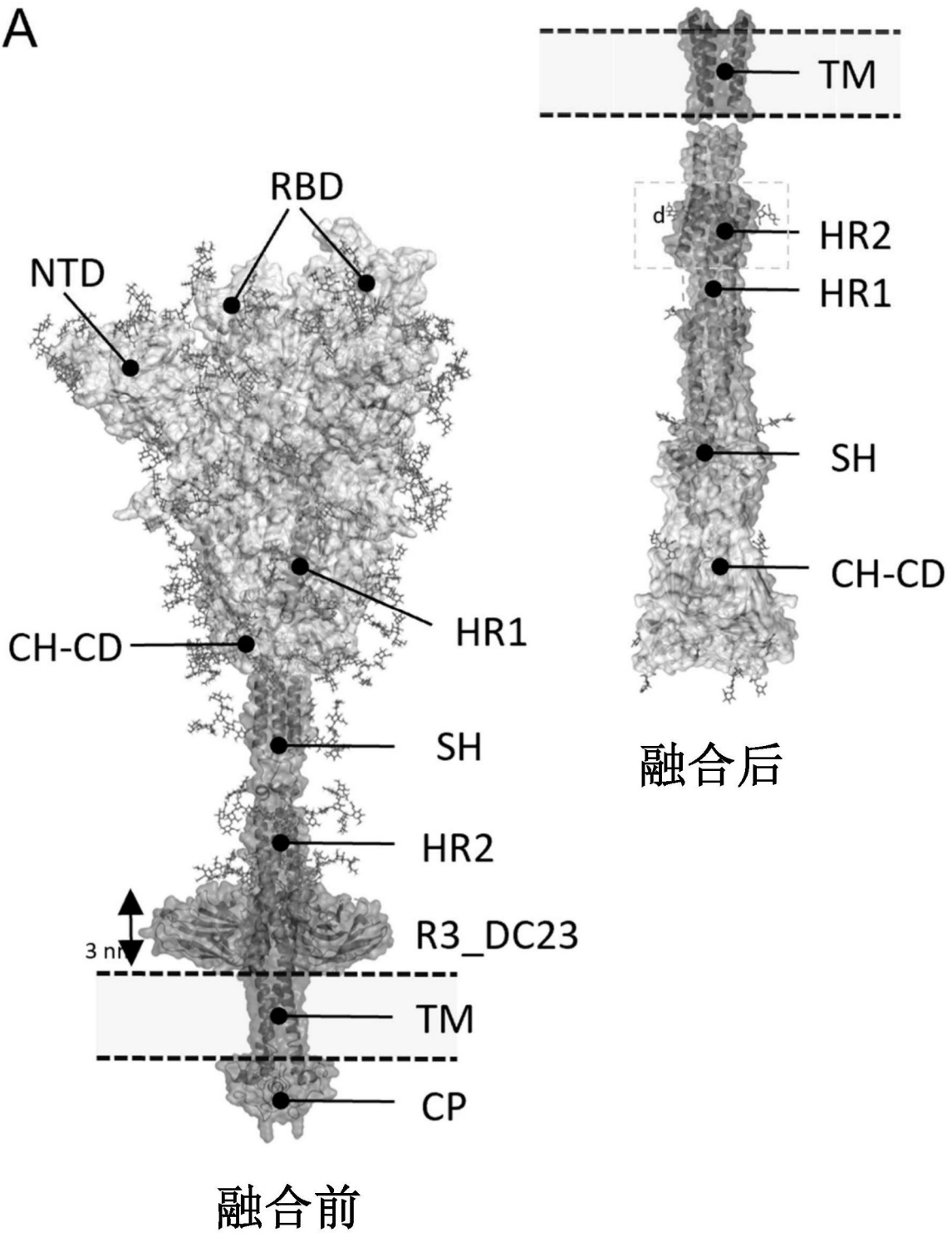

A
RBD
NTD
CH-CD
HR1
SH
HR2
3 nm
R3_DC23
TM
CP
融合前
TM
d
HR2
HR1
SH
CH-CD
融合后

图28

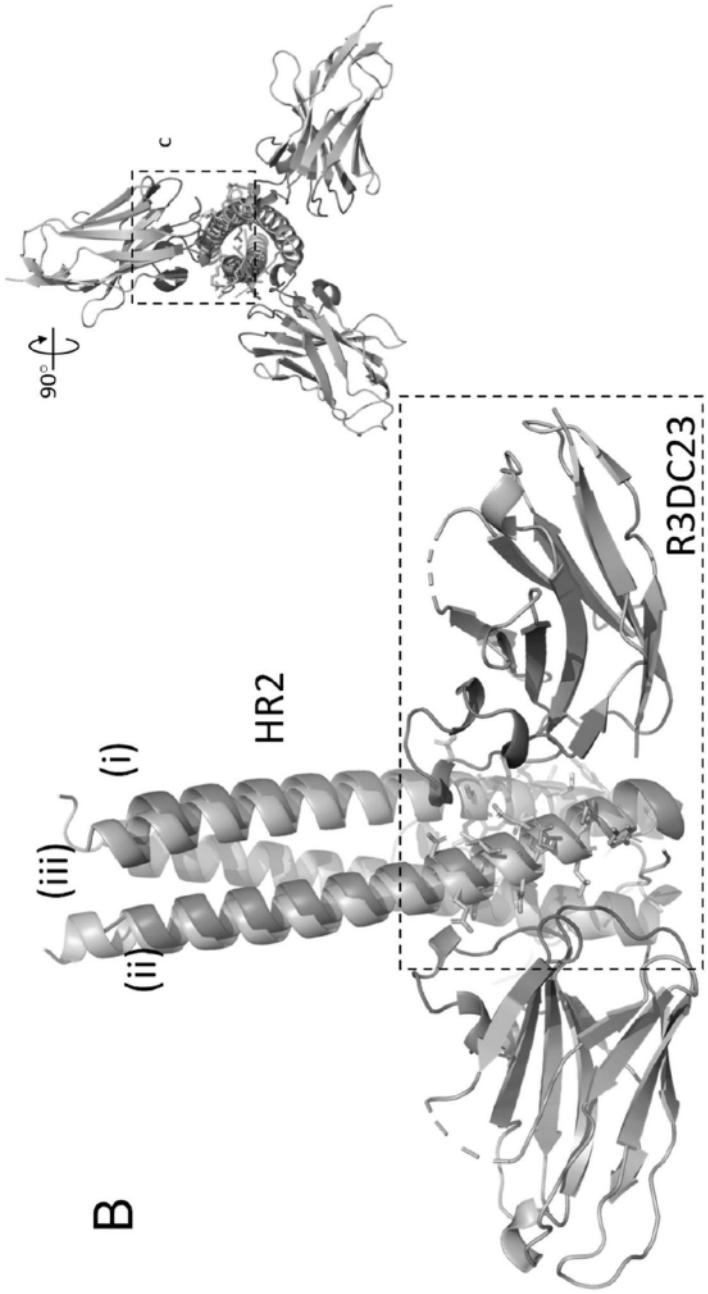


图28(续)

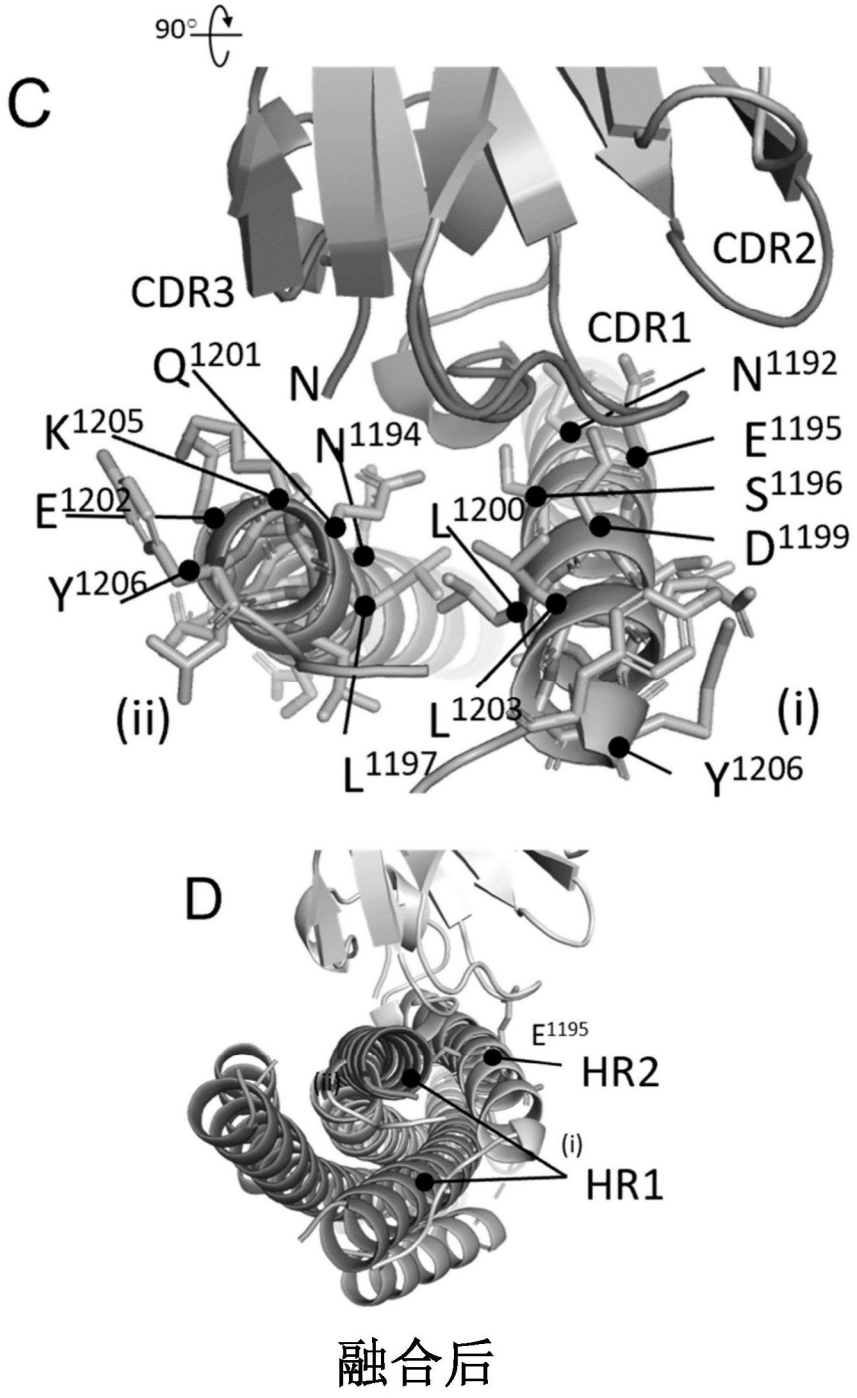

90°
C
CDR3
CDR2
CDR1
Q1201
N
N1192
K1205
N1194
E1195
E1202
S1196
L1200
D1199
Y1206
(ii)
L1203
(i)
L1197
Y1206
D
E1195
HR2
(ii)
(i)
HR1
融合后

图28(续)

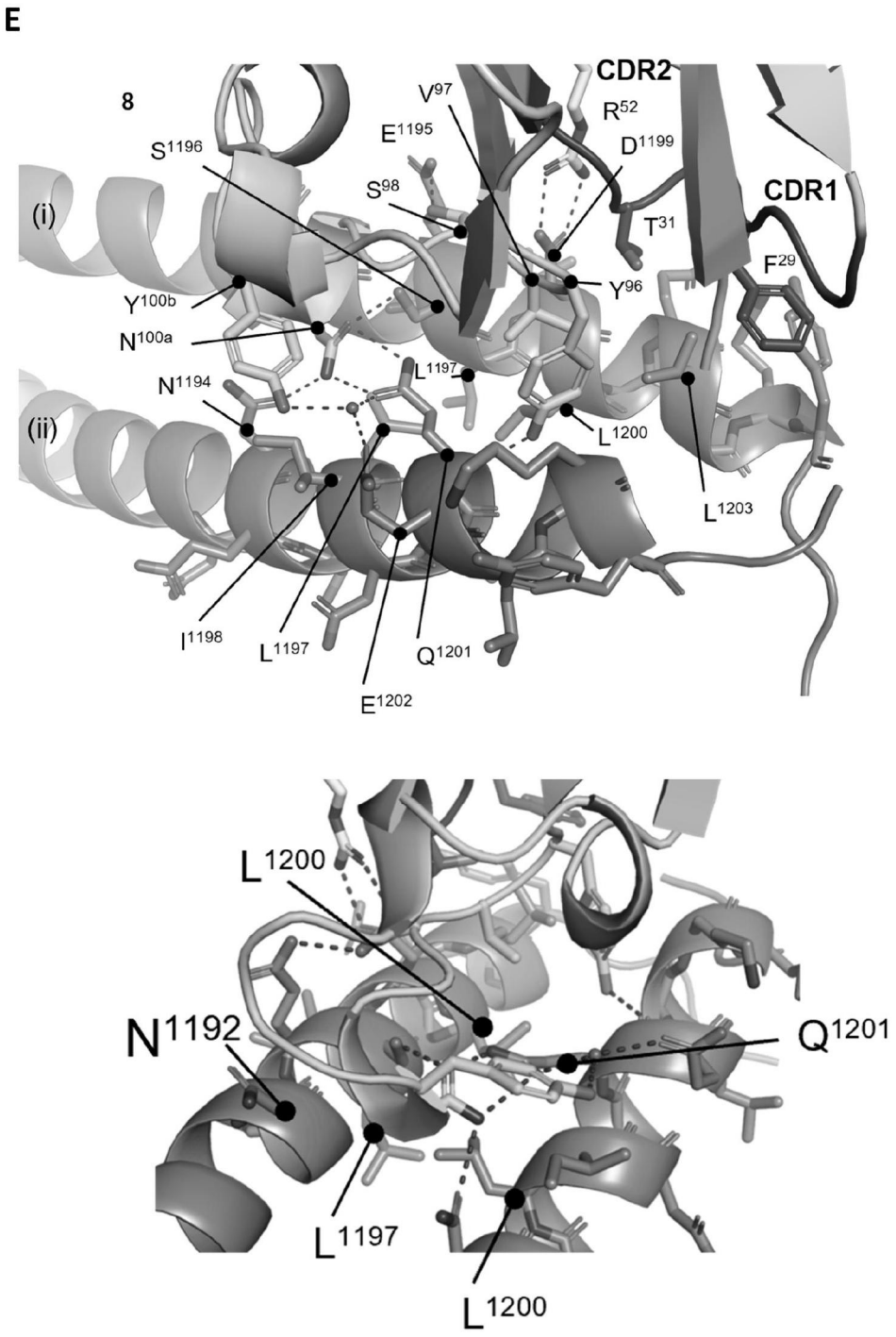
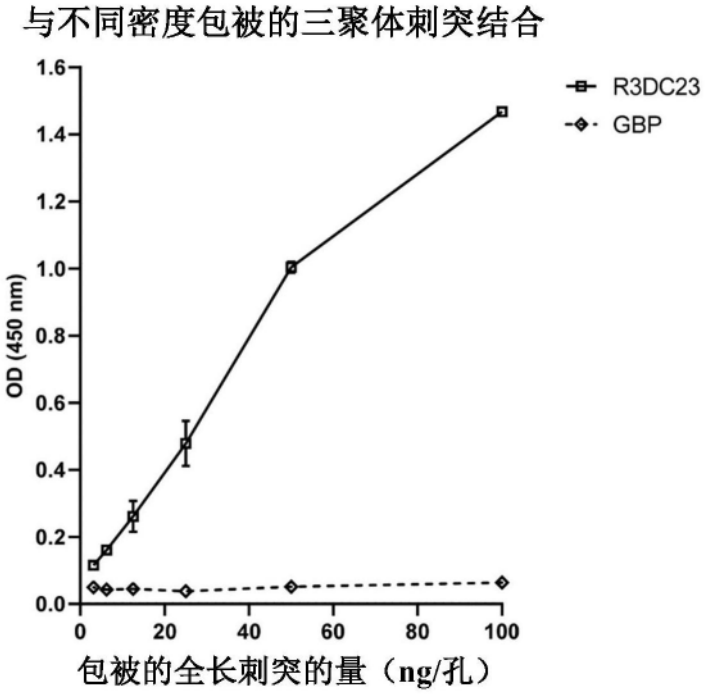

E
8
CDR2
CDR1
(i)
(ii)
V97
R52
E1195
D1199
S1196
S98
T31
F29
Y96
Y100b
N100a
L1197
N1194
L1200
L1203
I1198
L1197
Q1201
E1202
L1200
N1192
Q1201
L1197
L1200

图28(续)

A


与不同密度包被的三聚体刺突结合
R3DC23
GBP
OD (450 nm)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
20
40
60
80
100
包被的全长刺突的量（ng/孔）

B

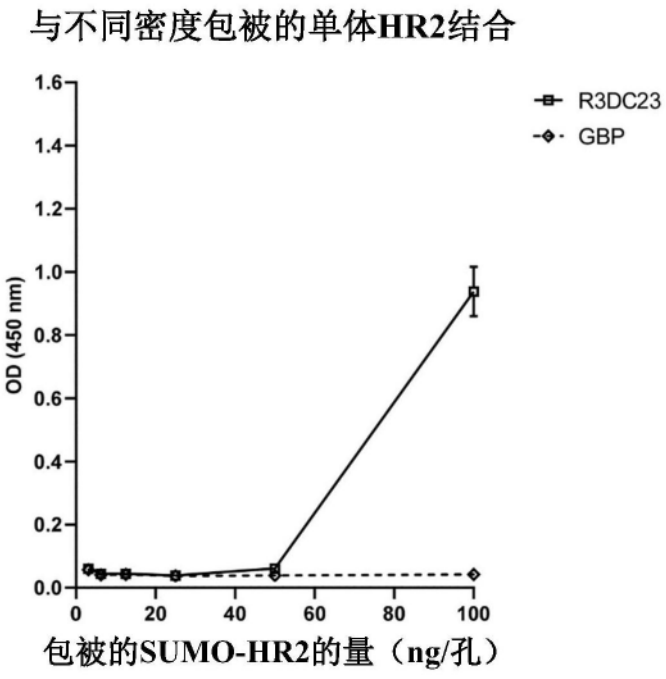

与不同密度包被的单体HR2结合
R3DC23
GBP
OD (450 nm)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
20
40
60
80
100
包被的SUMO-HR2的量（ng/孔）

图29

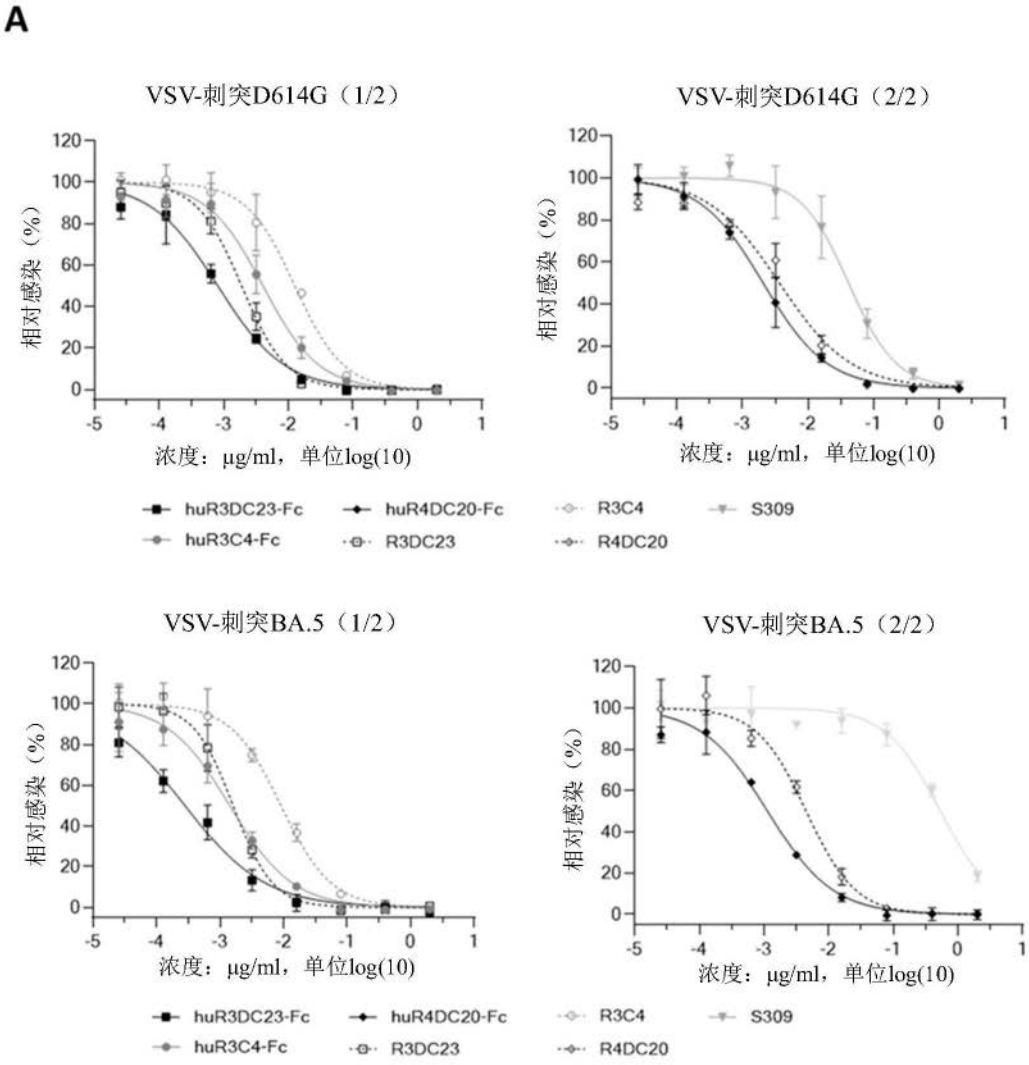

A
VSV-刺突D614G（1/2）
VSV-刺突D614G（2/2）
相对感染（%）
浓度：μg/ml，单位log(10)
huR3DC23-Fc
huR4DC20-Fc
R3C4
S309
huR3C4-Fc
R3DC23
R4DC20
VSV-刺突BA.5（1/2）
VSV-刺突BA.5（2/2）
B
VSVdelG S（D614G）
R3DC23-Fc
huR3DC23-Fc

图30

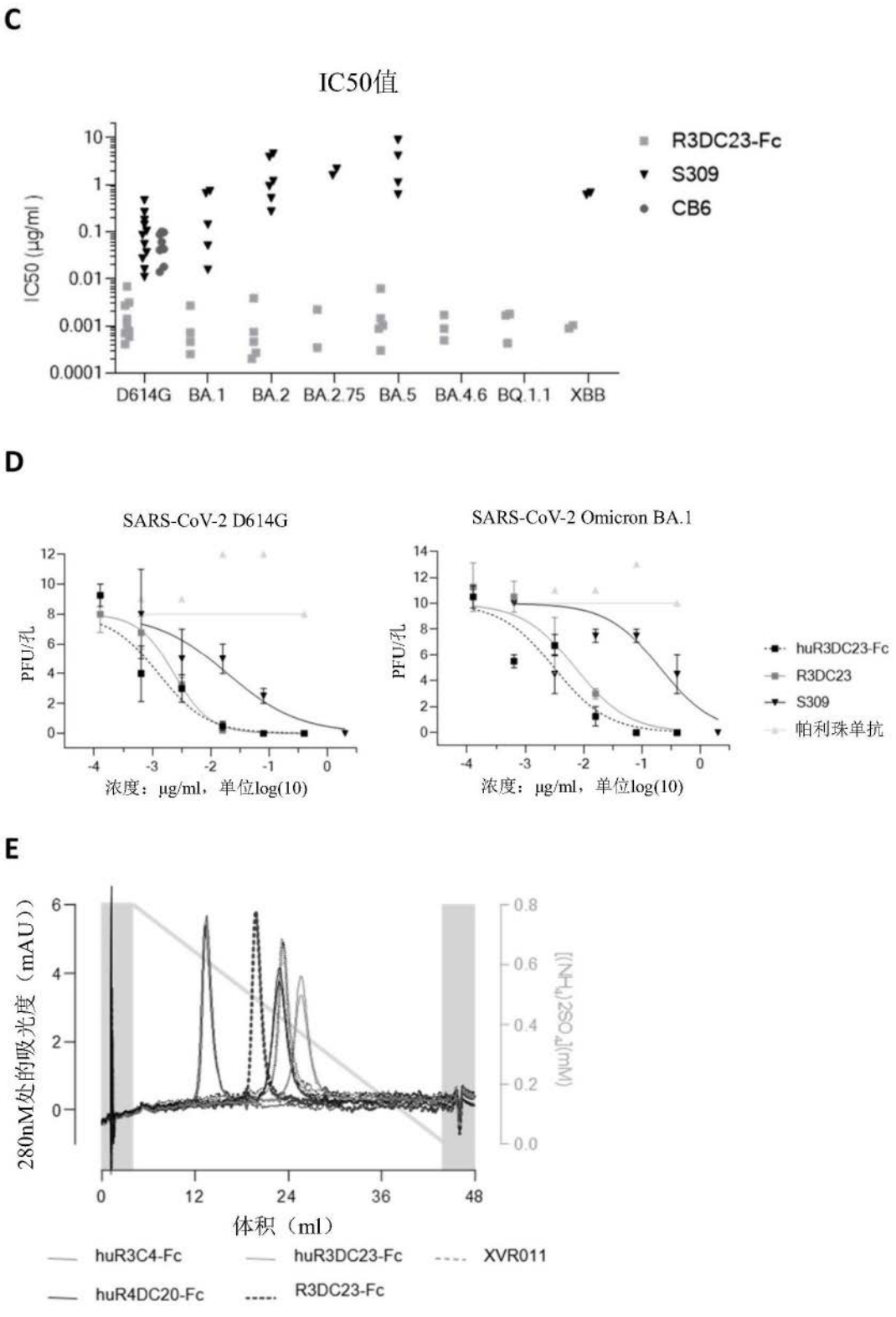

C
IC50值
IC50 (μg/ml)
R3DC23-Fc
S309
CB6
D614G
BA.1
BA.2
BA.2.75
BA.5
BA.4.6
BQ.1.1
XBB
D
SARS-CoV-2 D614G
SARS-CoV-2 Omicron BA.1
PFU/孔
浓度：μg/ml，单位log(10)
huR3DC23-Fc
R3DC23
S309
帕利珠单抗
E
280nM处的吸光度（mAU））
[(NH4)2SO4](mM)
体积（ml）
huR3C4-Fc
huR3DC23-Fc
XVR011
huR4DC20-Fc
R3DC23-Fc

图30(续)

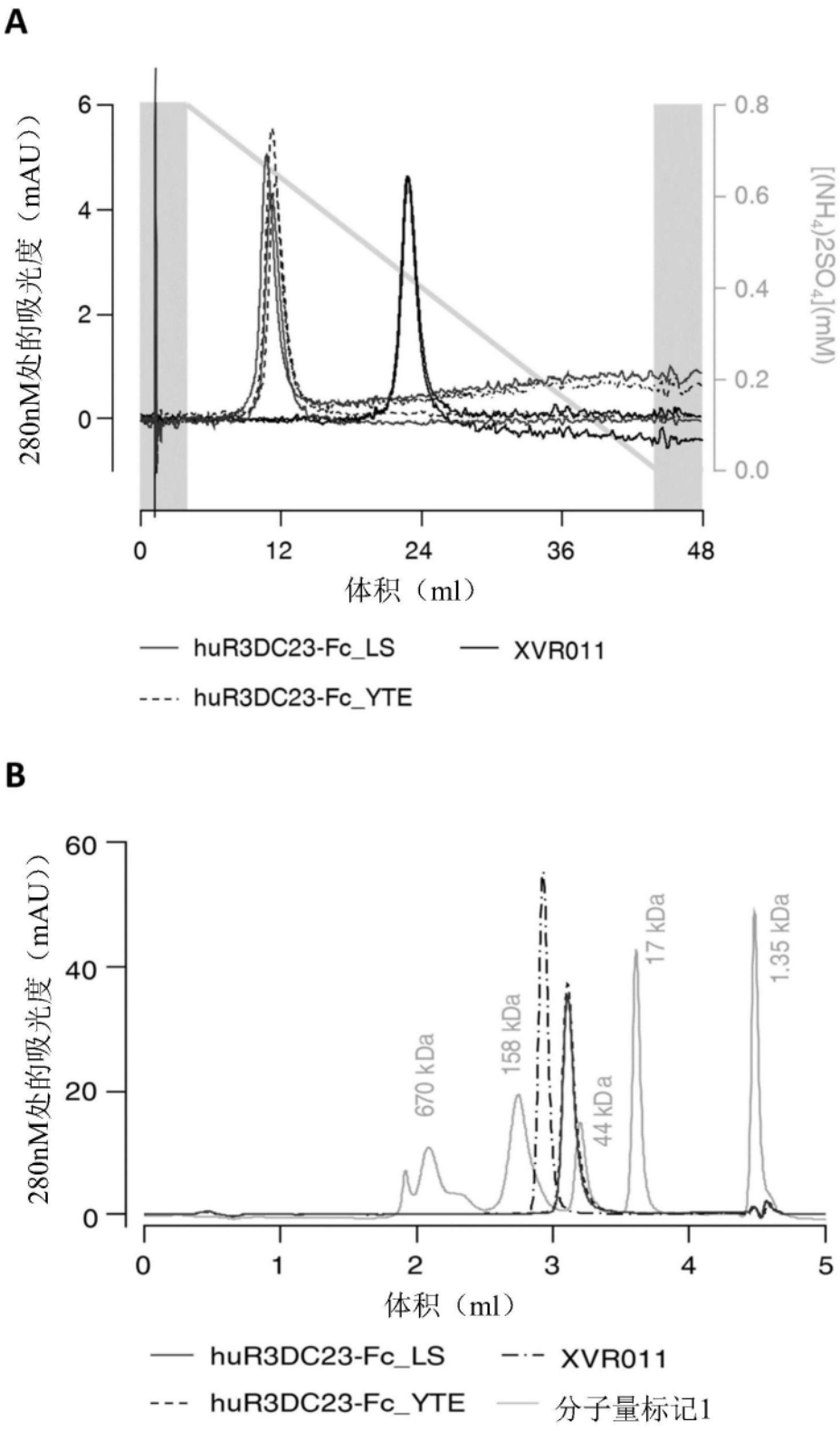
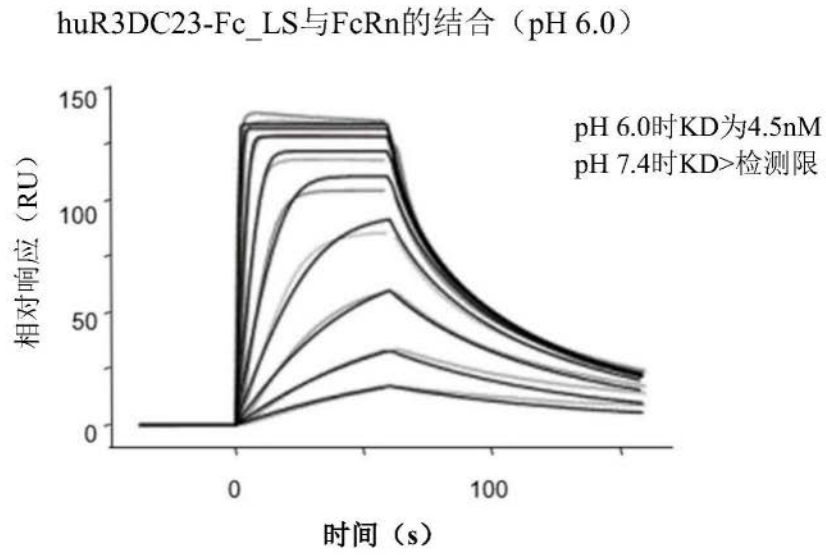

A
280nM处的吸光度（mAU））
[(NH4)2SO4](mM)
体积（ml）
huR3DC23-Fc_LS
XVR011
huR3DC23-Fc_YTE
B
280nM处的吸光度（mAU））
670 kDa
158 kDa
44 kDa
17 kDa
1.35 kDa
体积（ml）
huR3DC23-Fc_LS
XVR011
huR3DC23-Fc_YTE
分子量标记1

图31

C


huR3DC23-Fc_LS与FcRn的结合（pH 6.0）
pH 6.0时KD为4.5nM
pH 7.4时KD>检测限
相对响应（RU）
150
100
50
0
0
100
时间（s）

D

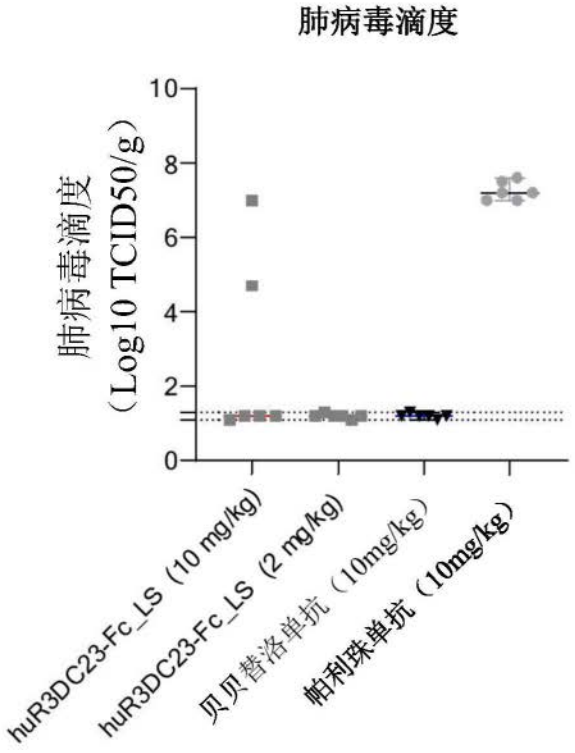

肺病毒滴度
肺病毒滴度
（Log10 TCID50/g）
10
8
6
4
2
0
huR3DC23-Fc_LS（10 mg/kg）
huR3DC23-Fc_LS（2 mg/kg）
贝贝替洛单抗（10mg/kg）
帕利珠单抗（10mg/kg）

图31(续)

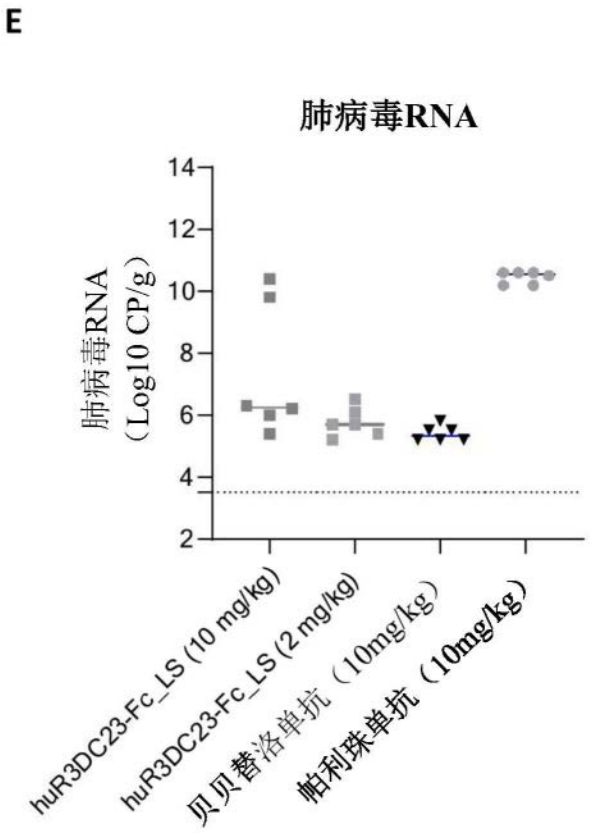

E
肺病毒RNA
肺病毒RNA（Log10 CP/g）
14
12
10
8
6
4
2
huR3DC23-Fc_LS (10 mg/kg)
huR3DC23-Fc_LS (2 mg/kg)
贝贝替洛单抗（10mg/kg）
帕利珠单抗（10mg/kg）

图31(续)

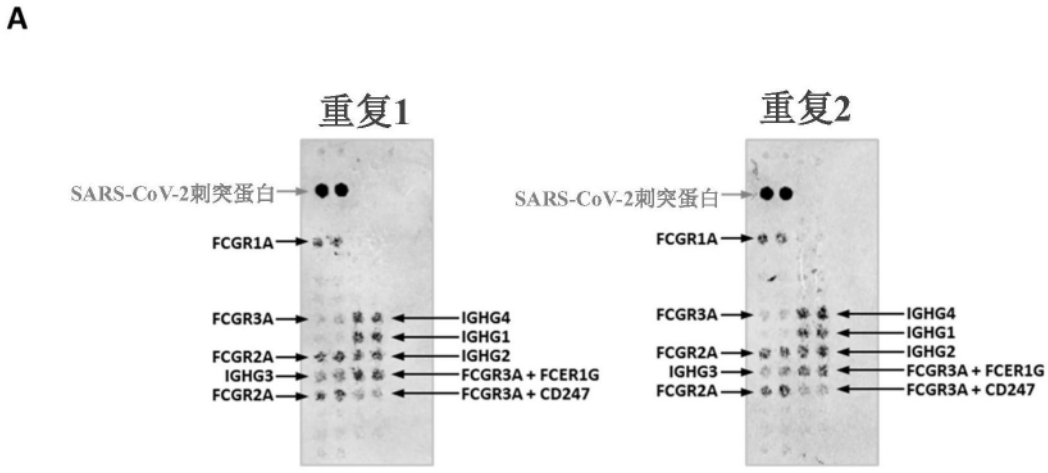

A
重复1
重复2
SARS-CoV-2刺突蛋白
FCGR1A
FCGR3A
FCGR2A
IGHG3
FCGR2A
IGHG4
IGHG1
IGHG2
FCGR3A + FCER1G
FCGR3A + CD247

图32

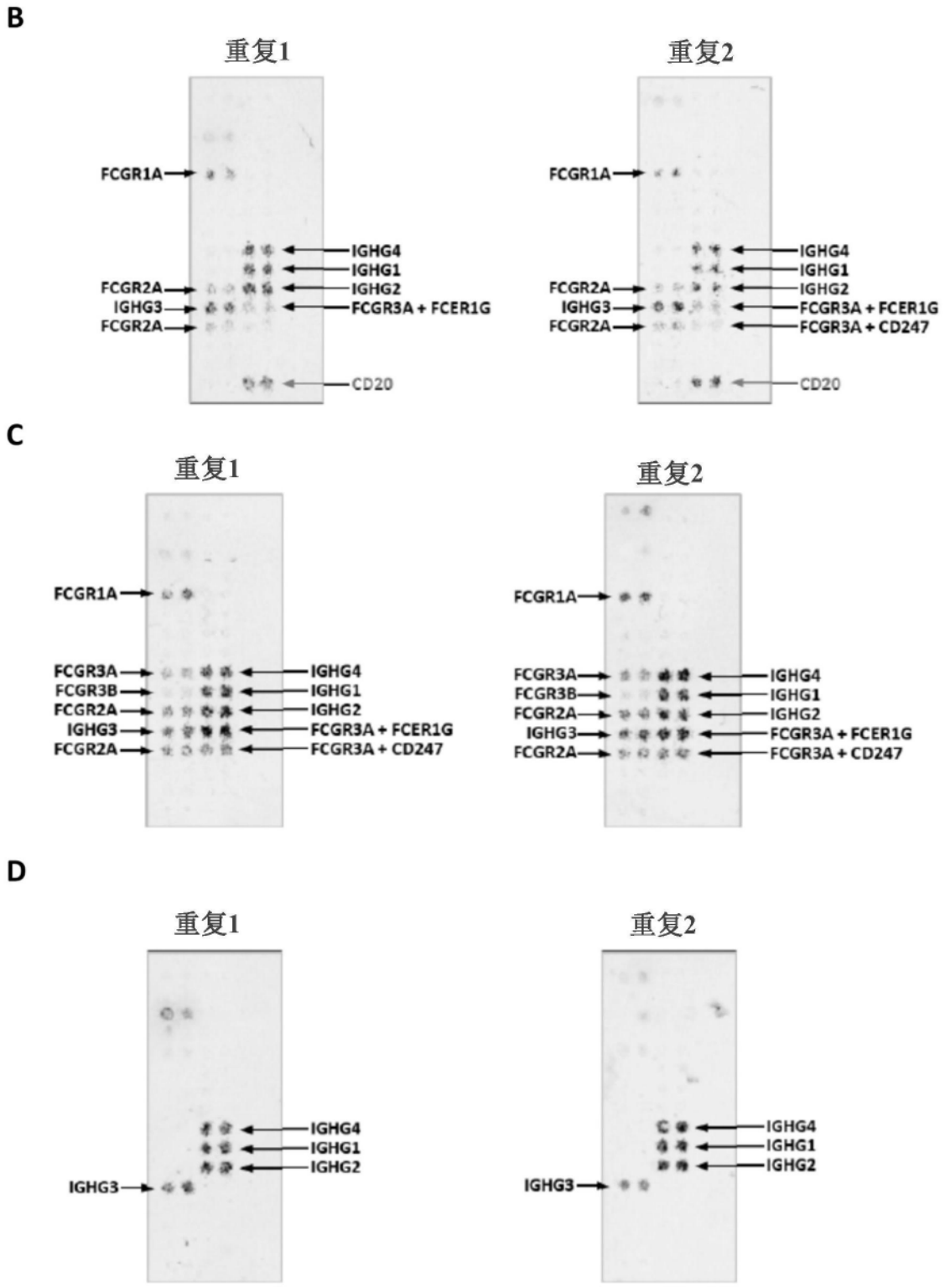

B
重复1
FCGR1A
IGHG4
IGHG1
FCGR2A
IGHG2
IGHG3
FCGR3A + FCER1G
FCGR2A
CD20
重复2
FCGR1A
IGHG4
IGHG1
FCGR2A
IGHG2
IGHG3
FCGR3A + FCER1G
FCGR2A
FCGR3A + CD247
CD20
C
重复1
FCGR1A
FCGR3A
IGHG4
FCGR3B
IGHG1
FCGR2A
IGHG2
IGHG3
FCGR3A + FCER1G
FCGR2A
FCGR3A + CD247
重复2
FCGR1A
FCGR3A
IGHG4
FCGR3B
IGHG1
FCGR2A
IGHG2
IGHG3
FCGR3A + FCER1G
FCGR2A
FCGR3A + CD247
D
重复1
IGHG4
IGHG1
IGHG2
IGHG3
重复2
IGHG4
IGHG1
IGHG2
IGHG3

图32(续)

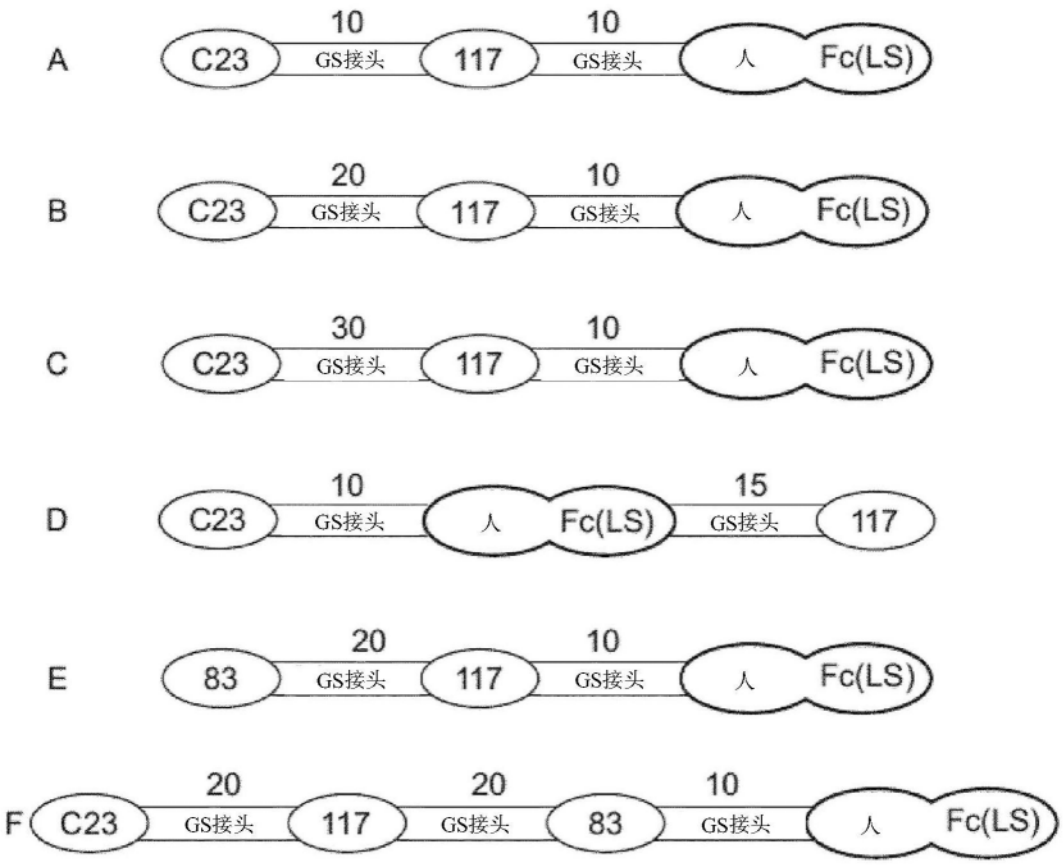

A
C23
10
GS接头
117
10
GS接头
人
Fc(LS)
B
C23
20
GS接头
117
10
GS接头
人
Fc(LS)
C
C23
30
GS接头
117
10
GS接头
人
Fc(LS)
D
C23
10
GS接头
人
Fc(LS)
15
GS接头
117
E
83
20
GS接头
117
10
GS接头
人
Fc(LS)
F
C23
20
GS接头
117
20
GS接头
83
10
GS接头
人
Fc(LS)

图33

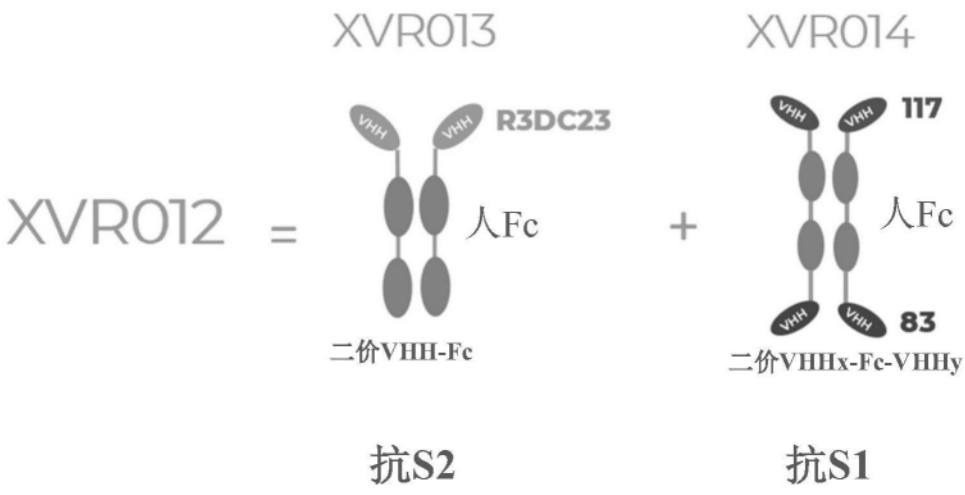
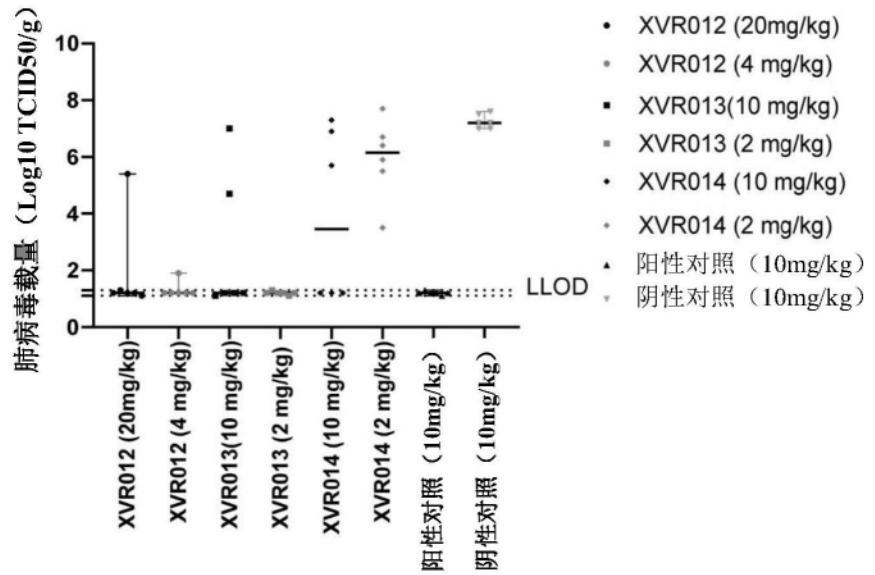

XVR013
XVR014
XVR012
=
VHH
VHH
R3DC23
人Fc
二价VHH-Fc
+
VHH
VHH
117
人Fc
VHH
VHH
83
二价VHHx-Fc-VHHy
抗S2
抗S1

图34

A


肺病毒载量（Log10 TCID50/g）
10
8
6
4
2
0
LLOD
XVR012 (20mg/kg)
XVR012 (4 mg/kg)
XVR013(10 mg/kg)
XVR013 (2 mg/kg)
XVR014 (10 mg/kg)
XVR014 (2 mg/kg)
阳性对照（10mg/kg）
阴性对照（10mg/kg）

B

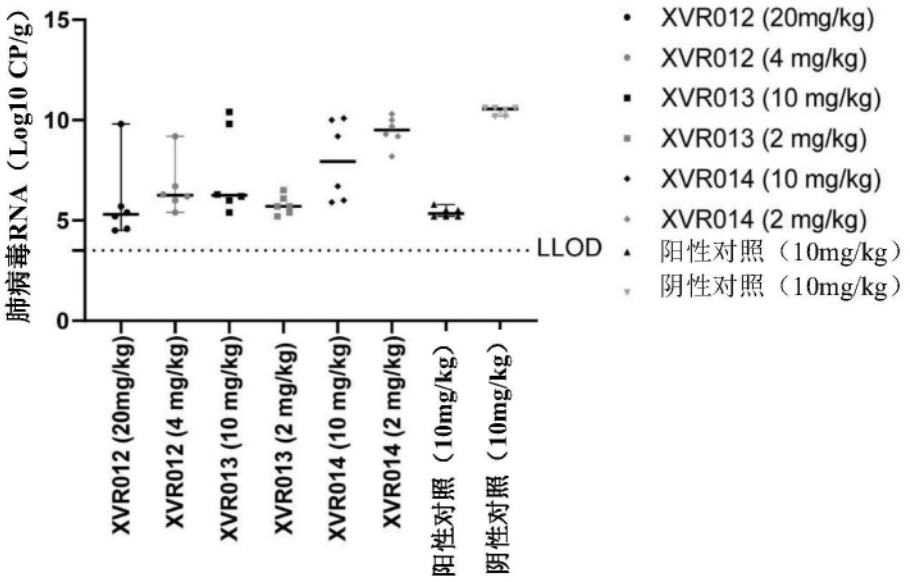

肺病毒RNA（Log10 CP/g）
15
10
5
0
LLOD
XVR012 (20mg/kg)
XVR012 (4 mg/kg)
XVR013 (10 mg/kg)
XVR013 (2 mg/kg)
XVR014 (10 mg/kg)
XVR014 (2 mg/kg)
阳性对照（10mg/kg）
阴性对照（10mg/kg）

图35

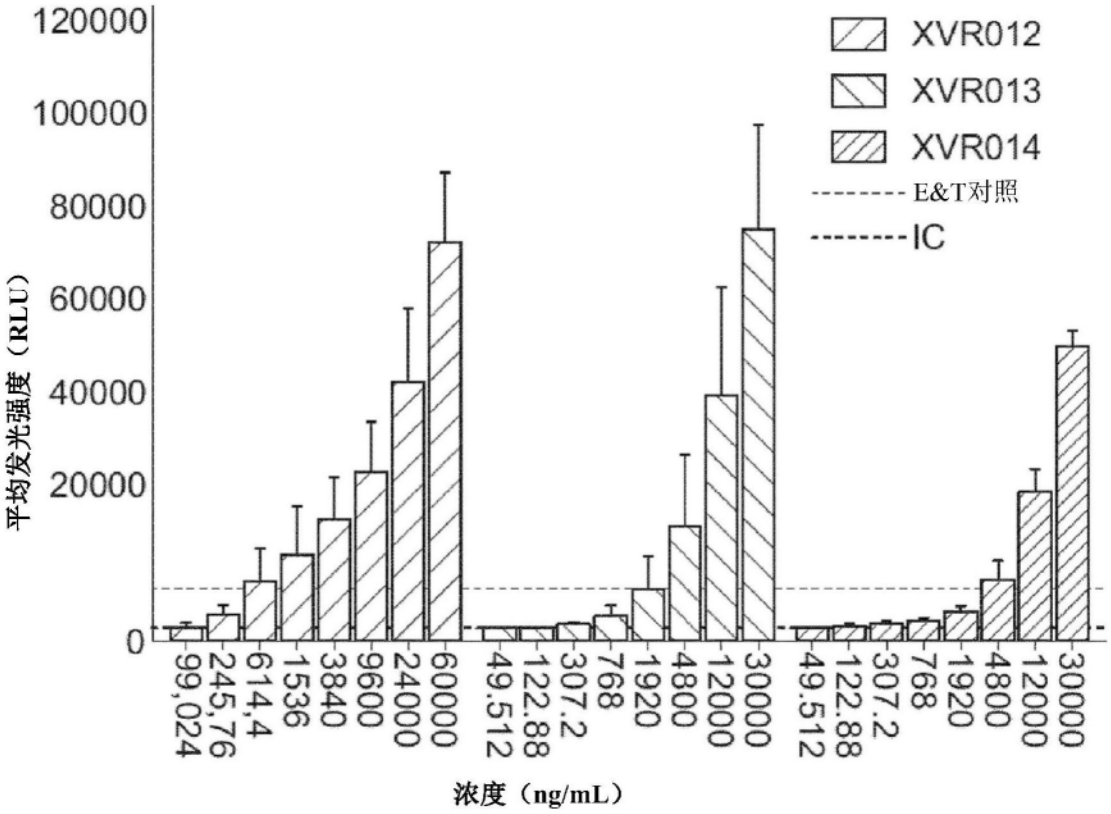

120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
平均发光强度（RLU）
XVR012
XVR013
XVR014
E&T对照
IC
99,024
245,76
614,4
1536
3840
9600
24000
60000
49.512
122.88
307.2
768
1920
4800
12000
30000
49.512
122.88
307.2
768
1920
4800
12000
30000
浓度（ng/mL）

图36

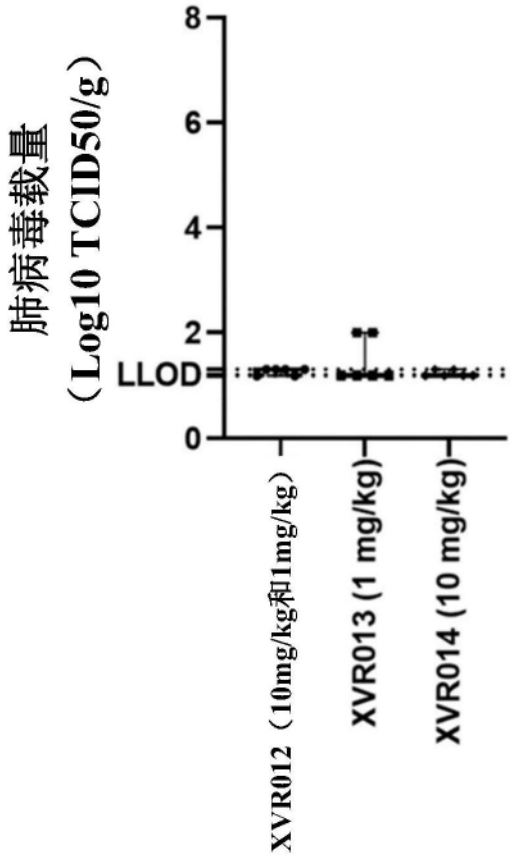

肺病毒载量
（Log10 TCID50/g）
8
6
4
2
LLOD
0
XVR012（10mg/kg和1mg/kg）
XVR013 (1 mg/kg)
XVR014 (10 mg/kg)

图37

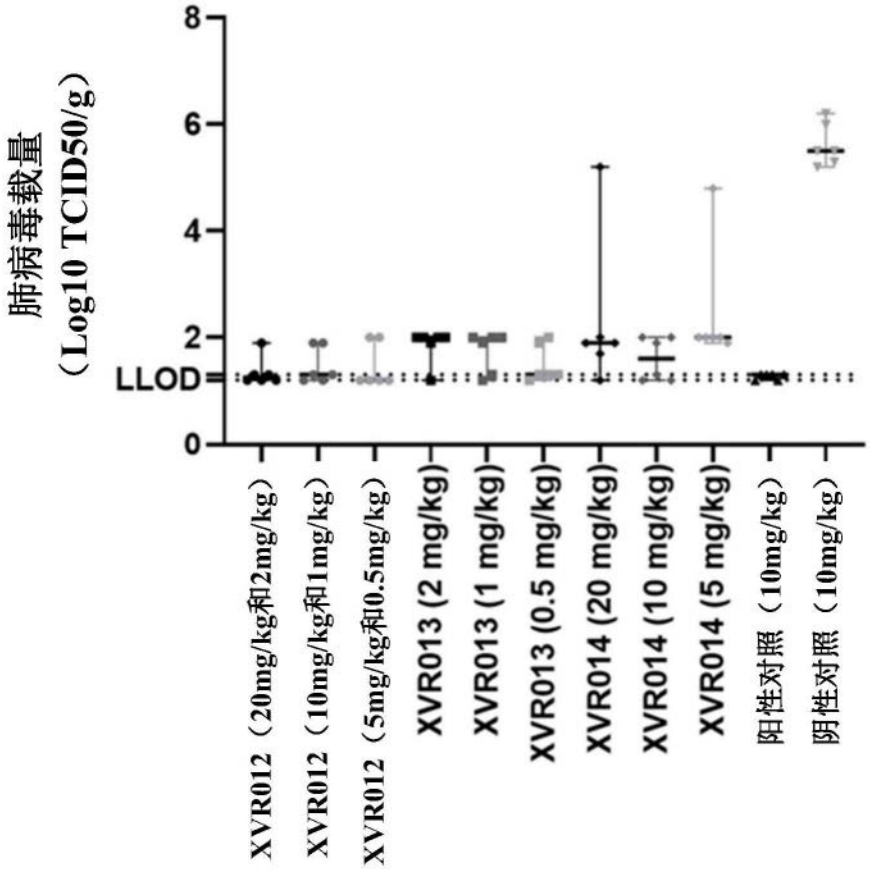

肺病毒载量
（Log10 TCID50/g）
8
6
4
2
LLOD
0
XVR012（20mg/kg和2mg/kg）
XVR012（10mg/kg和1mg/kg）
XVR012（5mg/kg和0.5mg/kg）
XVR013 (2 mg/kg)
XVR013 (1 mg/kg)
XVR013 (0.5 mg/kg)
XVR014 (20 mg/kg)
XVR014 (10 mg/kg)
XVR014 (5 mg/kg)
阳性对照（10mg/kg）
阴性对照（10mg/kg）

图38

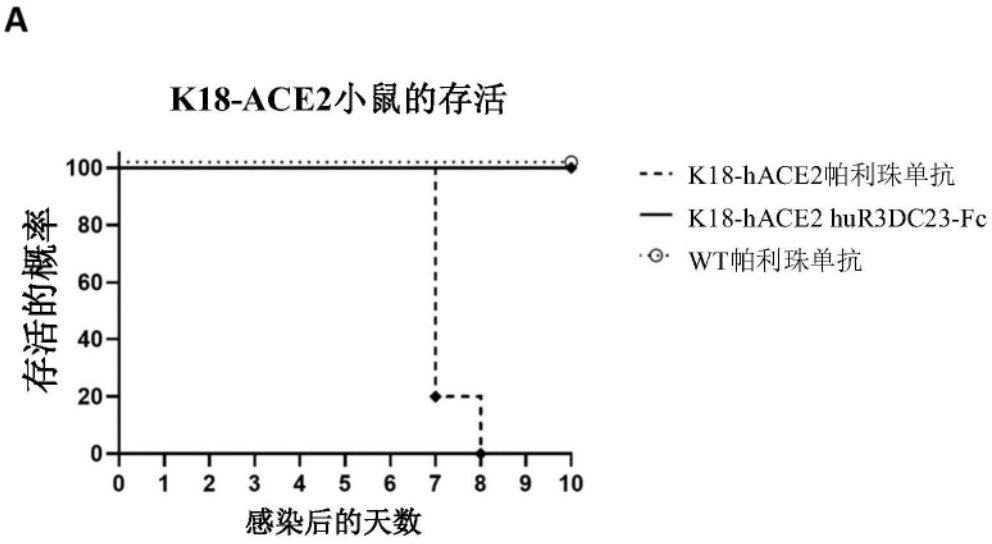

A
K18-ACE2小鼠的存活
存活的概率
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
感染后的天数
K18-hACE2帕利珠单抗
K18-hACE2 huR3DC23-Fc
WT帕利珠单抗

图39

B

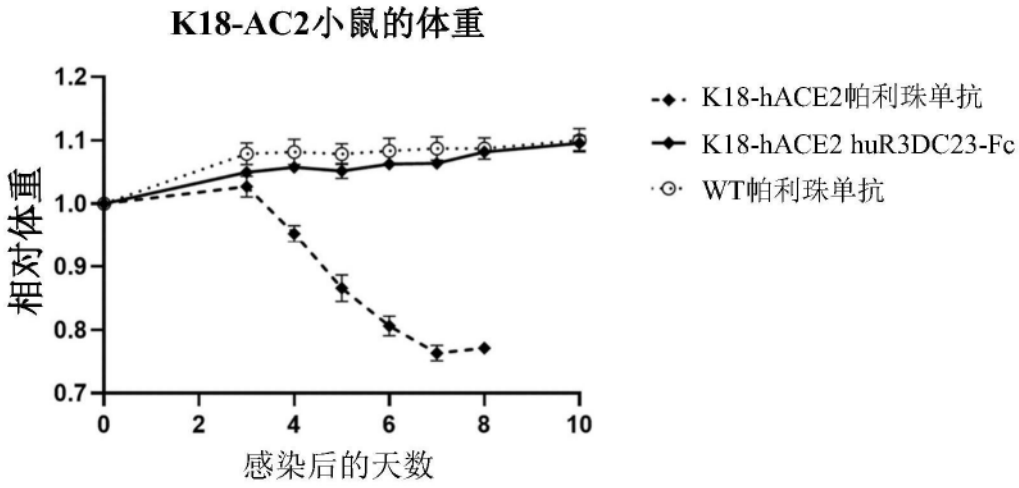

K18-AC2小鼠的体重
相对体重
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0
2
4
6
8
10
感染后的天数
K18-hACE2帕利珠单抗
K18-hACE2 huR3DC23-Fc
WT帕利珠单抗

图39(续)

A

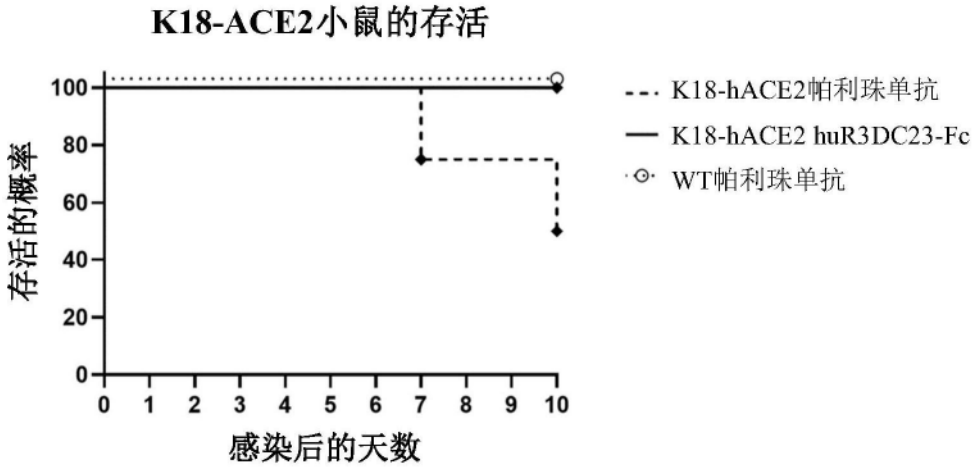
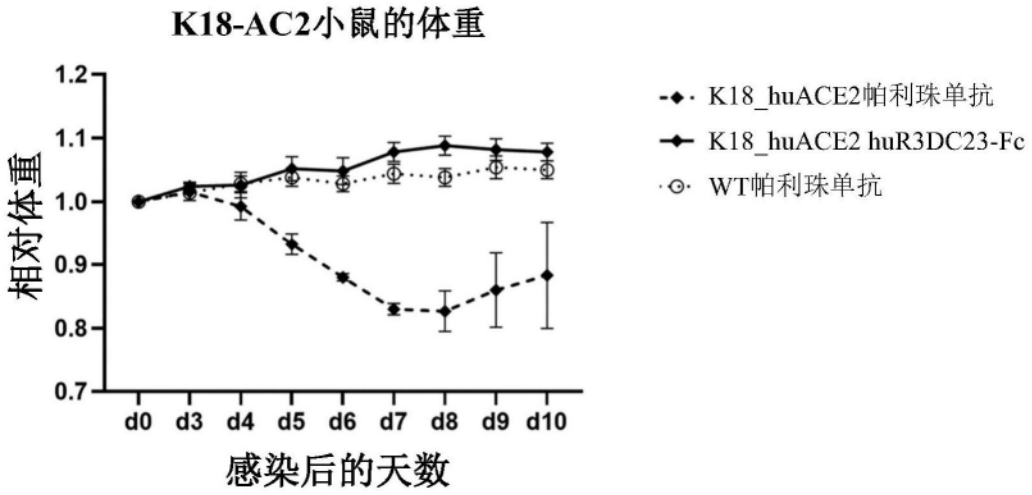

K18-ACE2小鼠的存活
存活的概率
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
感染后的天数
K18-hACE2帕利珠单抗
K18-hACE2 huR3DC23-Fc
WT帕利珠单抗

图40

B


K18-AC2小鼠的体重
相对体重
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
d0 d3 d4 d5 d6 d7 d8 d9 d10
感染后的天数
K18_huACE2帕利珠单抗
K18_huACE2 huR3DC23-Fc
WT帕利珠单抗

C

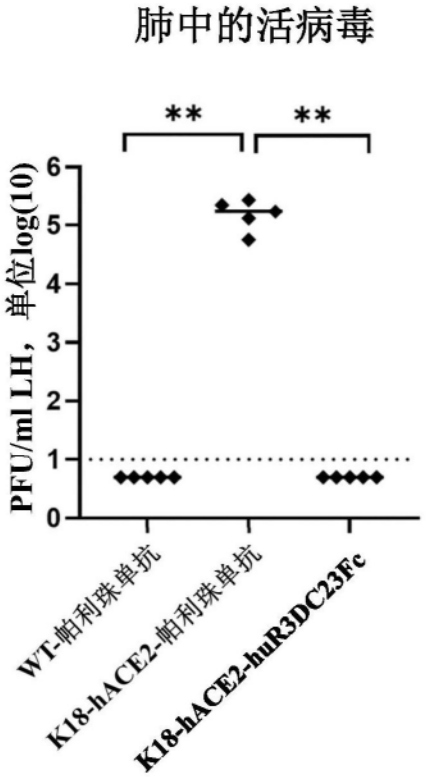

肺中的活病毒
**
**
PFU/ml LH，单位log(10)
6
5
4
3
2
1
0
WT-帕利珠单抗
K18-hACE2-帕利珠单抗
K18-hACE2-huR3DC23Fc

图40(续)

D

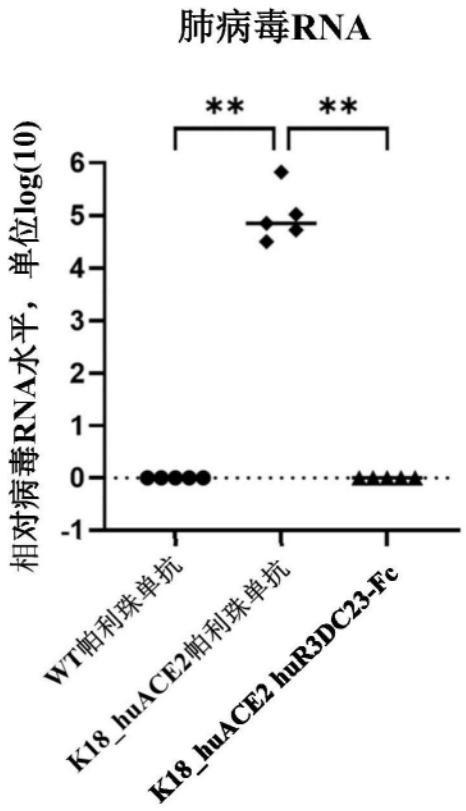

肺病毒RNA
**
**
相对病毒RNA水平，单位log(10)
6
5
4
3
2
1
0
-1
WT帕利珠单抗
K18_huACE2帕利珠单抗
K18_huACE2 huR3DC23-Fc

图40(续)

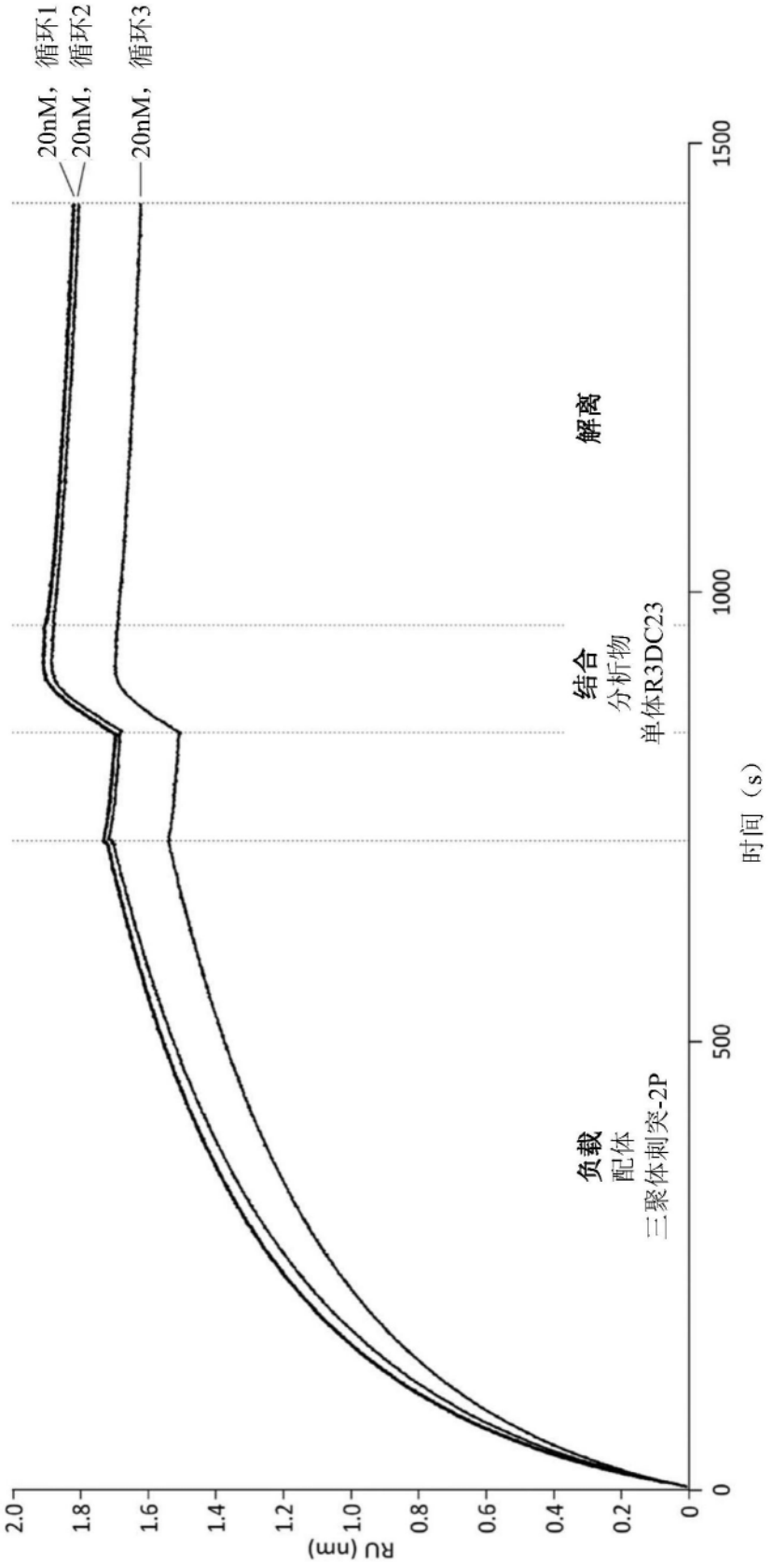

20nM，循环1
20nM，循环2
20nM，循环3
负载
配体
三聚体刺突-2P
结合
分析物
单体R3DC23
解离
RU (nm)
时间（s）
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
500
1000
1500

图41