

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-544211
(P2023-544211A)

(43)公表日 令和5年10月20日(2023.10.20)

(51)国際特許分類

C 12 N	15/13 (2006.01)	F I	C 12 N	15/13
C 07 K	19/00 (2006.01)		C 07 K	19/00
C 07 K	16/10 (2006.01)		C 07 K	16/10
C 07 K	14/47 (2006.01)		C 07 K	14/47
C 07 K	16/46 (2006.01)		C 07 K	16/46

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全123頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-521536(P2023-521536)
(86)(22)出願日	令和3年10月8日(2021.10.8)
(85)翻訳文提出日	令和5年6月6日(2023.6.6)
(86)国際出願番号	PCT/CA2021/051426
(87)国際公開番号	WO2022/073138
(87)国際公開日	令和4年4月14日(2022.4.14)
(31)優先権主張番号	63/089,782
(32)優先日	令和2年10月9日(2020.10.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関	
	米国(US)
(31)優先権主張番号	63/197,236
(32)優先日	令和3年6月4日(2021.6.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関	
	米国(US)
(31)優先権主張番号	63/220,929

最終頁に続く

(71)出願人	501181075 ザ・ホスピタル・フォー・シック・チル ドレン THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN カナダ、エム5ジー・1エックス8、オ ンタリオ、トロント、ユニバーシティ・ アベニュー555番
(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人	100181641

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 SARS-CoV-2を標的とするポリペプチドならびに関連する組成物および方法

(57)【要約】

本明細書には、SARS-CoV-2結合部分に連結されたナノケージモノマーを含む融合タンパク質であって、複数の前記融合タンパク質が自己組織化してナノケージを形成する、融合タンパク質が提供される。SARS-CoV-2を標的とする三重特異性抗体コンストラクトも提供される。また、(1)(2)ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結された断片結晶化可能な(Fc)領域を含む融合ポリペプチドであって、前記Fc領域がI253A突然変異を含み、番号付けがEUIインデックスに従う、融合ポリペプチドも提供される。

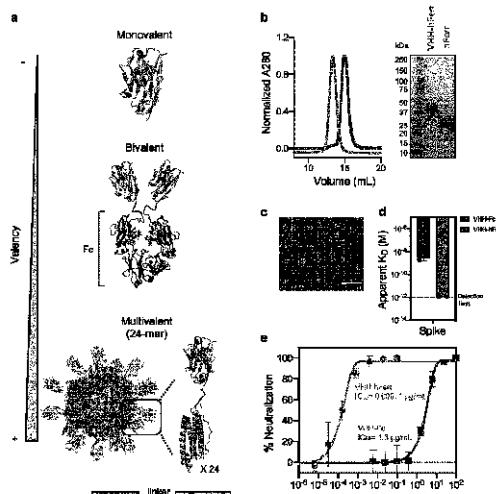


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

SARS-CoV-2 結合部分に連結されたナノケージモノマーを含む融合タンパク質であって、複数の前記融合タンパク質が自己組織化してナノケージを形成する、融合タンパク質。

【請求項 2】

前記 SARS-CoV-2 結合部分が、前記 SARS-CoV-2 S 糖タンパク質を標的とする、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

前記 SARS-CoV-2 結合部分が、前記組織化されたナノケージの内面および / または外面、好ましくは外面を装飾する、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。 10

【請求項 4】

前記 SARS-CoV-2 結合部分が、抗体またはその断片を含む、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記抗体またはその断片が、F_ab 断片を含む、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記抗体またはその断片が、s_cF_ab 断片、s_cF_v 断片、s_dA_b 断片、VHH ドメインまたはそれらの組み合わせを含む、請求項 4 に記載の融合タンパク質。 20

【請求項 7】

前記抗体またはその断片が、F_ab 断片の重鎖および / または軽鎖を含む、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

前記 SARS-CoV-2 結合部分が、一本鎖可変ドメイン VHH - 72、BD23 および / または 4A8 を含む、請求項 4 から 7 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。 30

【請求項 9】

前記 SARS-CoV-2 結合部分が、表 4 に記載される mAb を含む、請求項 4 から 8 までのいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

前記 SARS-CoV-2 結合部分が、表 4 の mAb 298、324、46、80、52、82、もしくは 236、またはそのバリアントを含む、請求項 9 に記載の融合タンパク質。 30

【請求項 10】

請求項 10 a。前記 SARS-CoV-2 結合部分が、表 4 からの mAb 298、80、および 52、またはそれらのバリアントを含む、請求項 10 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

前記 SARS-CoV-2 結合部分が、前記ナノケージモノマーの N 末端もしくは C 末端に連結されているか、または前記ナノケージモノマーの N 末端に連結された第 1 の SARS-CoV-2 結合部分および C 末端に連結された第 2 の SARS-CoV-2 結合部分が存在し、前記第 1 および第 2 の SARS-CoV-2 結合部分が、同じもしくは異なる、請求項 1 から 10 までのいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。 40

【請求項 12】

前記ナノケージモノマーが、前記 SARS-CoV-2 結合部分に連結された第 1 のナノケージモノマーサブユニットを含み、前記第 1 のナノケージモノマーサブユニットが第 2 のナノケージモノマーサブユニットと自己組織化して前記ナノケージモノマーを形成する、請求項 1 から 11 までのいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

前記 SARS-CoV-2 結合部分が前記第 1 のナノケージモノマーの N 末端もしくは C 末端に連結されているか、または前記第 1 のナノケージモノマーサブユニットの N 末端

に連結された第1のSARS-CoV-2結合部分およびC末端に連結された第2のSARS-CoV-2結合部分が存在し、前記第1および第2のSARS-CoV-2結合部分が、同じもしくは異なる、請求項12に記載の融合タンパク質。

【請求項14】

前記第2のナノケージモノマーサブユニットと組み合わさった、請求項12または13に記載の融合タンパク質。

【請求項15】

前記第2のナノケージモノマーサブユニットが生物活性部分に連結されている、請求項12から14までのいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項16】

前記生物活性部分が、Fc断片を含む、請求項15に記載の融合タンパク質。

10

【請求項17】

前記Fc断片が、IgG1Fc断片である、請求項16に記載の融合タンパク質。

【請求項18】

前記Fc断片が、前記融合タンパク質の半減期を、例えば、数分または数時間から数日、数週間または数ヶ月まで調節する、LS、YTE、LALA、I253Aおよび/またはLALAPなどの1つもしくはそれを超える突然変異を含む、請求項15または16に記載の融合タンパク質。

【請求項19】

前記Fc断片が、scFc断片である、請求項15から18までのいずれか1項に記載の融合タンパク質。

20

【請求項20】

約3～約100個のナノケージモノマー、例えば24、32、もしくは60個のモノマー、または約4～約200個のナノケージモノマーサブユニット、例えば4、6、8、10、12、14、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、もしくはそれを超えるモノマーサブユニットが、必要に応じて1つもしくは複数のナノケージ全体モノマーと組み合わさって、自己組織化してナノケージを形成する、請求項1から19までのいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項21】

前記ナノケージモノマーが、フェリチン、アポフェリチン、エンカプセリン、SOR、ルマジンシスター、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、カルボキシソーム、ウォールトタンパク質、GroEL、熱ショックタンパク質、E2P、MS2コートタンパク質、それらの断片、およびそれらのバリエントから選択される、請求項1から20までのいずれか1項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項22】

前記ナノケージモノマーが、アポフェリチン、必要に応じてヒトアポフェリチンである、請求項21に記載の融合タンパク質。

【請求項23】

前記第1および第2のナノケージモノマーサブユニットが、交換可能にアポフェリチンの「N」および「C」領域を含む、請求項22に記載の融合タンパク質。

40

【請求項24】

前記アポフェリチンの「N」領域が、以下：

【化28】

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLQLQASYTYLSGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKKREG
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW

と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる、請求項23に記載の融合タンパク質。

50

項に記載の融合タンパク質を含む、請求項 3 2 または 3 3 に記載のナノケージ。

【請求項 3 5】

少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の異なる S A R S - C o V - 2 結合部分、例えば 3 個の異なる S A R S - C o V - 2 結合部分を含む、請求項 3 2 から 3 4 までのいずれか 1 項に記載のナノケージ。

【請求項 3 6】

前記ナノケージが、多価および / または多重特異性である、請求項 3 2 から 3 5 までのいずれか 1 項に記載のナノケージ。

【請求項 3 7】

表 4 からの 1 つまたはそれを超える m A b を含む、請求項 3 2 から 3 6 までのいずれか 1 項に記載のナノケージ。 10

【請求項 3 8】

表 4 からの 3 つの m A b を含む、請求項 3 7 に記載のナノケージ。

【請求項 3 9】

表 4 からの m A b 298、324、46、52、80、82 および / または 236 を含む、請求項 3 7 または 3 8 に記載のナノケージ。

【請求項 4 0】

4 : 2 : 1 : 1 の比の s c F a b 1 - ヒトアポフェリチン : s c F c - ヒト N - フェリチン : s c F a b 2 - C - フェリチン : s c F a b 3 - C - フェリチンを含む、請求項 3 2 から 3 9 までのいずれか 1 項に記載のナノケージ。 20

【請求項 4 1】

医薬品、診断薬、および / または造影剤などのカーゴ分子を担持する、請求項 3 2 から 4 0 までのいずれか 1 項に記載のナノケージ。

【請求項 4 2】

前記カーゴ分子が前記融合タンパク質に融合されておらず、前記ナノケージの内部に含まれている、請求項 4 1 に記載のナノケージ。

【請求項 4 3】

前記カーゴ分子がタンパク質であり、前記カーゴ分子が前記ナノケージの内部に含まれるように前記融合タンパク質に融合されている、請求項 4 2 に記載のナノケージ。

【請求項 4 4】

前記カーゴ分子が、G F P、E G F P、アメトリシンなどの蛍光タンパク質、および / または i L O V などの L O V タンパク質などのフラビンベースの蛍光タンパク質である、請求項 4 1 から 4 3 までのいずれか 1 項に記載のナノケージ。 30

【請求項 4 5】

S A R S - C o V - 2 を標的とする三重特異性抗体コンストラクト。

【請求項 4 6】

請求項 3 2 から 4 4 までのいずれか 1 項に記載のナノケージまたは請求項 4 5 に記載の抗体を含む S A R S - C o V - 2 治療用または予防用組成物。

【請求項 4 7】

請求項 1 から 3 1 までのいずれか 1 項に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載のベクターを含み、請求項 1 から 3 1 までのいずれか 1 項に記載の融合タンパク質を産生する宿主細胞。

【請求項 5 0】

S A R S - C o V - 2 を処置および / または予防する方法であって、前記方法が、請求項 3 2 から 3 3 までのいずれか 1 項に記載のナノケージまたは請求項 4 5 に記載の抗体、または請求項 4 6 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 5 1】

50

S A R S - C o V - 2 を処置および / または予防するための、請求項 3 2 から 3 3 までのいずれか 1 項に記載のナノケージまたは請求項 4 5 に記載の抗体、または請求項 4 6 に記載の組成物の使用。

【請求項 5 2】

S A R S - C o V - 2 の処置および / または予防に使用するための、請求項 3 2 から 3 3 までのいずれか 1 項に記載のナノケージまたは請求項 4 5 に記載の抗体、または請求項 4 6 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

以下の表に記載される任意の配列と少なくとも 70 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド：

【表 18 - 1】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDIGPID YWGGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISSYLA QQKPGKAPKLLIYDASNLSQGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPSTFGQQGTKEIK R
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVSGISSAGSITNYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGNHAGTT VTSEYFQHWGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYDTSNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPWTFGQQGTREIK R
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYHM HWVRQAPGQGLEWMGWINPNSSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDI SSWYEITKFDPWGQGTLLTVSS	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSGTYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGT EFTLTISLQSEDFAVYYCLQTHSYPPTFGQQGTKEIK R
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSRYAIH WVRQAPGQGLEWMGNPISGNTDYAPNFQGR TMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKDGSQ AYLVEYFQHWGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQVITNNLAWY QQKPGKAPKLLIYDASTLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYTFPYTFGQQGTKEIK R
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFHYYM HWVRQAPGQGLEWMGIINPSSSSASYSQKFQGR TMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGRY SGSYFPDYWGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQNI SRYLNWY QQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPPTFGQQGTKEIK R
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGHDM HWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTS YAQKFQGR TMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARANSLR YYYGMDVWGGQGTMTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSVSSWLAWY YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQGYTTPYTFGQQGTKEIK R
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS YAI WVRQAPGQGLEWMGAIMP MFGTANYAQKFQGR TITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSSG YY YGWGQGTLLTVSS	DIVMTQSPLSLPVTPGE PASISCRSSQSLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQ LIIYLGNSRASGV PDRFSGSG SGTDF TLK ISR VEA EDVG VYYC MQAL QT PAT FGPG TK VDI KR
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS YAI WVRQAPGQGLEWMGWINPN SSGG ANYAQKFQGR TITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC STYYD SS GY STDYWGQGTLLTVSS	DIVMTQSPLSLPVTPGE PASISCRSSQSLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQ LIIYAA ASSLQSGV PDRFSGSG SGTDF TLK ISR VEA EDVG VYYC MQAL QT PYTF GQG TK LEI KR
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGY YM HWVRQAPGQGLEWMGWINPL NGTN FAPKFQGR VTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC ARD PGG SYS NDA FDI WGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQ SISRYLNWY QQKPGKAPKLLIYD ASN LESGV PSRF SGSG GTDF TL TISS LQ PEDF ATYYC QQANS FPLT FGGG TK VDI KR
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYAM HWVRQAPGQGLEWMGRISPRSGGT KYAQRFQGR VTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AREAVAG THP QAGDF DLWGR GTLLTVSS	DIVMTQSPLSLPVTPGE PASISCRSSQSLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQ LIIYAA ASSLQSGV PDRFSGSG SGTDF TLK ISR VEA EDVG VYYC QYYSS PYTF GQG TK LEI KR
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSSAMH WVRQAPGKGLEWV SAIGTGG DTYYADSV KGRFT IS RDNS KNTLYL QMNSL RAEDT AVYYC AREGD GYN F YFDYWGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQ GISSYLA QQKPGKAPKLLIYD ASSLQ IGV PSRF SGSG GTDF LT TISS LQ PEDF ATYYC LQSY STPP WTFG QQGT KEIK R

10

20

30

40

50

【表 1 8 - 2】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIN WVRQAPGQGLEWMGMIDPSGGSTSYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAKDFGGG TRYDYWYFDLWGRGTLVTVSS	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGT EFTLTISLQSEDFAVYYCQQYTTPRTFGQGTRLE IKR
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSQHGM HWVRQAPGKGLEWVSAIDRSGSYIYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTYGGK VTYFDYWGGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISSHAWY QQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISLQPEDFATYYCQQTYSTPWTFGQGTRKEIK R
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSTYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISPNSGGTDLAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCASDPRDD IAGGYWGQGTLVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRRESGVPDFRSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYTPPTFG QGTKEIKR
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGFSTS YWWVRQAPGKGLEWMGWINPYTGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSRAL YGSYSYFDYWGGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQVISNYLAWY QQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISLQPEDFATYYCQQSFSPPTFGQGTRLEIK R
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSTIYSGGSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSRDAF DIWGQGTMVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF FTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK R
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFNNYGIS WVRQAPGQGLEWMGWMPNSGNTGYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARVGDY GDYIVSPFDLWGRGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSITTYLNWY QQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTRKEIK R
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGFTSYGIN WVRQAPGQGLEWMGWMPNSGNTGYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCASRGQL LPRGMDVWGGQGTTVTVSS	DIVMTQSPSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQLLIYLSNRASGVPDFRSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTTPPTFGQG TRLEIKR
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGGIIPMFOTTNYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCARDRGDTID YWGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNNLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDF FTLTISLQPEDFATYYCQQNGFPLTFGPGTKVDI KR
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNRYAF SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVT ITADESTSTAYMESSLRSEDTAVYYCARSTRELPE VWDWYFDLWGRGTLVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRRESGVPDFRSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSAPLTFG GGTKVEIKR

またはその機能的断片。

【請求項 5 4】

前記記載された配列と少なくとも 7 5 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を含む、請求項 5 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 5】

前記記載された配列と少なくとも 7 5 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性からなる、請求項 5 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 6】

請求項 5 3 から 5 5 までのいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含む抗体またはその断片。

【請求項 5 7】

(1) (2) ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結された断片結晶化可能 (F c) 領域を含む融合ポリペプチドであって、前記 F c 領域が I 2 5 3 A 突然変異を含み、番号付けが E U インデックスに従う、融合ポリペプチド。

【請求項 5 8】

前記 F c 領域が、 L A L A P (L 2 3 4 A / L 2 3 5 A / P 3 2 9 G) 突然変異をさらに含み、番号付けが E U インデックスに従う、請求項 5 7 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5 9】

前記 F c 領域が、 I g G 1 F c 領域である、請求項 5 7 または 5 8 に記載の融合ポリ

10

20

30

40

50

ペプチド。

【請求項 6 0】

前記ナノケージモノマーが、フェリチンモノマーである、請求項 5 7 から 5 9 までのいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6 1】

前記フェリチンモノマーが、フェリチン軽鎖である、請求項 6 0 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6 2】

前記フェリチン軽鎖が、ヒトフェリチン軽鎖である、請求項 6 1 に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 6 3】

前記 F c 領域が、アミノ酸リンカーを介して前記ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結されている、請求項 5 7 から 6 2 までのいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6 4】

前記 F c 領域が、前記ナノケージモノマーまたはそのサブユニットの N 末端に連結されている、請求項 5 7 から 6 3 までのいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項 6 5】

前記 F c 領域が、単鎖 F c (s c F c) である、請求項 5 7 から 6 4 までのいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6 6】

前記 F c 領域が、F c モノマーである、請求項 5 7 から 6 5 までのいずれか 1 項に記載の融合ポリペプチド。

30

【請求項 6 7】

自己組織化ポリペプチド複合体であって、

(a) 複数の第 1 の融合ポリペプチドであって、各第 1 の融合ポリペプチドが、(1) (2) ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結された F c 領域と、

(b) 複数の第 2 の融合ポリペプチドであって、各第 2 の融合ポリペプチドが、(2) ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結された (1) S A R S - C o V - 2 結合抗体断片を含む、複数の第 2 の融合ポリペプチドと

を含む、自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 6 8】

前記ナノケージモノマーが、フェリチンモノマーである、請求項 6 7 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 6 9】

前記ナノケージモノマーが、フェリチン軽鎖である、請求項 6 8 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 7 0】

フェリチン重鎖またはフェリチン重鎖のサブユニットを全く含まない、請求項 6 9 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

40

【請求項 7 1】

前記ナノケージモノマーが、ヒトフェリチン軽鎖である、請求項 6 8 または 6 9 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 7 2】

前記 S A R - C o V - 2 結合抗体断片が、S A R S - C o V - 2 の受容体結合ドメインまたはスパイクタンパク質に結合する、請求項 6 7 から 7 1 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 7 3】

前記 S A R - C o V - 2 結合抗体断片が、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む、請求項 6 7 から 7 2 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

50

【請求項 7 4】

前記 S A R - C o V - 2 結合抗体断片が、S A R S - C o V - 2 に結合することができる抗体の F a b を含む、請求項 6 7 から 7 3 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 7 5】

前記 S A R S - C o V - 2 結合抗体断片が、V_K ドメインおよびV_H ドメインを含む、請求項 7 3 または 7 4 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 7 6】

前記自己組織化ポリペプチド複合体が、第 1 の融合ポリペプチドと第 2 の融合ポリペプチドとの 1 : 1 の比を特徴とする、請求項 6 7 から 7 5 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。 10

【請求項 7 7】

前記 F c 領域が、I g G 1 F c 領域である、請求項 6 7 から 7 6 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 7 8】

前記 F c 領域が、アミノ酸リンカーを介して前記ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結されている、請求項 6 7 から 7 7 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 7 9】

前記 F c 領域が、前記ナノケージモノマーまたはそのサブユニットの N 末端に連結されている、請求項 6 7 から 7 8 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。 20

【請求項 8 0】

合計で少なくとも 2 4 個の融合ポリペプチドを含む、請求項 6 7 から 7 9 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 8 1】

合計で少なくとも 3 2 個の融合ポリペプチドを含む、請求項 8 0 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 8 2】

合計で約 3 2 個の融合ポリペプチドを有する、請求項 8 1 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。 30

【請求項 8 3】

自己組織化ポリペプチド複合体であって、

(a) 複数の第 1 の融合ポリペプチドであって、各第 1 の融合ポリペプチドが、(1)ヒトフェリチンモノマーまたはそのサブユニットに連結された I g G 1 F c 領域を含み、前記 I g G 1 F c 領域が、L A L A P (L 2 3 4 A / L 2 3 5 A / P 3 2 9 G) および I 2 5 3 A 突然変異を含み、番号付けが E U インデックスに従う、複数の第 1 の融合ポリペプチドと、

(b) 複数の第 2 の融合ポリペプチドであって、各第 2 の融合ポリペプチドが、(1) S A R S - C o V - 2 タンパク質に結合することができる抗体の F a b 断片を含み、前記 F a b 断片が、(2) ヒトフェリチンモノマーまたはそのサブユニットに連結されている、複数の第 2 の融合ポリペプチドと 40

を含む、自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 8 4】

請求項 8 3 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体であって、

(1) 各第 1 の融合ポリペプチドが、C - ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含み、各第 2 の融合ポリペプチドは、N - ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含むか、または

(2) 各第 1 の融合ポリペプチドが、N - ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含み、各第 2 の融合ポリペプチドは、C - ハーフフェリチンであるフェリ 50

チノモノマーサブユニットを含む、自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 8 5】

前記自己組織化ポリペプチド複合体が、第1の融合ポリペプチドと第2の融合ポリペプチドとの1:1の比を特徴とする、請求項83または84に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 8 6】

各第1の融合ポリペプチドが、C-ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含む、請求項83から85までのいずれか1項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 8 7】

前記IgG1Fc領域が、アミノ酸リンカーを介して前記C-ハーフフェリチンに連結されている、請求項86に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 8 8】

前記IgG1Fc領域が、前記C-ハーフフェリチンのN末端を介して前記C-ハーフフェリチンに連結されている、請求項86または87に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 8 9】

各第2の融合ポリペプチドが、N-ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含む、請求項83から88までのいずれか1項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 9 0】

前記Fab断片が、アミノ酸リンカーを介して前記N-ハーフフェリチンに連結されている、請求項89に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 9 1】

前記Fab断片が、前記N-ハーフフェリチンのN末端を介して前記N-ハーフフェリチンに連結されている、請求項89または90に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 9 2】

複数の第3の融合ポリペプチドをさらに含み、各第3の融合ポリペプチドが、(1)(2)SARS-CoV-2タンパク質に結合することができる抗体のFab断片に連結されたヒトフェリチンモノマーを含む、請求項83から91までのいずれか1項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 9 3】

前記自己組織化ポリペプチド複合体が、第1の融合ポリペプチドと第2の融合ポリペプチドと第3の融合ポリペプチドとの1:1:2の比を特徴とする、請求項92に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 9 4】

合計で少なくとも24個の融合ポリペプチドを含む、請求項83から93までのいずれか1項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 9 5】

合計で少なくとも32個の融合ポリペプチドを含む、請求項94に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 9 6】

合計で32個の融合ポリペプチドを有する、請求項95に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 9 7】

前記Fab断片が、VKドメインおよびVHドメインを含み、

(1) VKドメインは配列番号11のアミノ酸配列を有し、VHドメインは配列番号12のアミノ酸配列を有する；

(2) VKドメインは配列番号17のアミノ酸配列を有し、VHドメインは配列番号18のアミノ酸配列を有する；

10

20

30

40

50

(3) V_K ドメインは配列番号 25 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 26 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(4) V_K ドメインは配列番号 27 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 28 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(5) V_K ドメインは配列番号 29 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 30 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(6) V_K ドメインは配列番号 31 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 32 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(7) V_K ドメインは配列番号 33 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 34 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(8) V_K ドメインは配列番号 35 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 36 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(9) V_K ドメインは配列番号 37 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 38 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(10) V_K ドメインは配列番号 39 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 40 内の V_H のアミノ酸配列を有する、(11) V_K ドメインは配列番号 41 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 42 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(12) V_K ドメインは配列番号 43 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 44 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(13) V_K ドメインは配列番号 45 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 46 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(14) V_K ドメインは配列番号 47 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 48 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(15) V_K ドメインは配列番号 49 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 50 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(16) V_K ドメインは配列番号 51 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 52 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(17) V_K ドメインは配列番号 53 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 54 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(18) V_K ドメインは配列番号 55 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 56 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(19) V_K ドメインは配列番号 57 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 58 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(20) V_K ドメインは配列番号 59 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 60 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(21) V_K ドメインは、配列番号 61 または配列番号 62 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは、配列番号 63 内の V_H のアミノ酸配列を有する；または

(22) V_K ドメインは配列番号 64 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 65 内の V_H のアミノ酸配列を有する、請求項 74 または 83 から 93 までのいずれか 1 項に記載に自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 98】

前記ヒトフェリチンモノマーが、ヒトフェリチン軽鎖である、請求項 83 から 97 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 99】

フェリチン重鎖またはフェリチン重鎖のサブユニットを全く含まない、請求項 98 に記載の自己組織化ポリペプチド複合体。

【請求項 100】

SARS-CoV-2 関連症状を処置、改善、または予防する方法であつて、前記方法が、請求項 67 から 99 までのいずれか 1 項に記載の自己組織化ポリペプチド複合体を含

10

20

30

40

50

む組成物を対象に投与することを含む、方法。

【請求項 101】

前記対象が、哺乳動物である、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記対象が、ヒトである、請求項 101 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本発明は、ポリペプチドに関する。特に、本発明は、SAR-CoV-2 特異的ポリペプチドならびに関連するコンストラクト、組成物および方法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

背景

ナノ粒子は、様々な分野の進歩に寄与してきた。それらの使用は、標的送達を付与する可能性を有し、触媒プロセスのための規則的なマイクロアレイ、徐放およびケージ化されたマイクロ環境の操作を可能にする。

【0003】

感受性および準安定性タンパク質を含有するナノ粒子の作製のために、タンパク質自己組織化は魅力的な方法である。実際、自己組織化したナノ粒子は、非共有結合相互作用を介して生理学的条件下で形成し、均一でしばしば対称的なナノカプセルまたはナノケージを確実に生じる。 20

【0004】

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、コロナウイルス疾患 2019 (COVID-19)、COVID-19 パンデミックの原因である呼吸器疾患を引き起こすコロナウイルスの株である。

【0005】

SARS-CoV-2 を処置および / または予防するための改善された組成物および方法が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

発明の要旨

ある態様によれば、SARS-CoV-2 結合部分に連結されたナノケージモノマーを含む融合タンパク質であって、複数の融合タンパク質が自己組織化してナノケージを形成する、融合タンパク質が提供される。

【0007】

ある態様では、SARS-CoV-2 結合部分は、SARS-CoV-2 S 糖タンパク質を標的とする。

【0008】

ある態様では、SARS-CoV-2 結合部分は、組織化されたナノケージの内面および / または外面、好ましくは外面を装飾する。 40

【0009】

ある態様では、SARS-CoV-2 結合部分は、抗体またはその断片を含む。

【0010】

ある態様では、抗体またはその断片は、Fab 断片を含む。

【0011】

ある態様では、抗体またはその断片は、scFab 断片、scFv 断片、sdAb 断片、VHH ドメインまたはそれらの組み合わせを含む。

【0012】

20

30

40

50

ある態様では、抗体またはその断片は、F_ab断片の重鎖および／または軽鎖を含む。

【0013】

ある態様では、SARS-CoV-2結合部分は、一本鎖可変ドメインVHH-72、BD23および／または4A8を含む。

【0014】

ある態様では、SARS-CoV-2結合部分は、表4に記載されるmAbを含む。

【0015】

ある態様では、SARS-CoV-2結合部分は、表4のmAb 298、324、46、80、52、82、もしくは236を含む。

【0016】

ある態様では、SARS-CoV-2結合部分は、ナノケージモノマーのN末端もしくはC末端に連結されているか、またはナノケージモノマーのN末端に連結された第1のSARS-CoV-2結合部分およびC末端に連結された第2のSARS-CoV-2結合部分が存在し、第1および第2のSARS-CoV-2結合部分が、同じもしくは異なる。

【0017】

ある態様では、ナノケージモノマーは、SARS-CoV-2結合部分に連結された第1のナノケージモノマーサブユニットを含み、第1のナノケージモノマーサブユニットが第2のナノケージモノマーサブユニットと自己組織化してナノケージモノマーを形成する。

【0018】

ある態様では、SARS-CoV-2結合部分は第1のナノケージモノマーのN末端もしくはC末端に連結されているか、または第1のナノケージモノマーサブユニットのN末端に連結された第1のSARS-CoV-2結合部分およびC末端に連結された第2のSARS-CoV-2結合部分が存在し、第1および第2のSARS-CoV-2結合部分が、同じもしくは異なる。

【0019】

ある態様では、第2のナノケージモノマーサブユニットと組み合わさった融合タンパク質が提供される。

【0020】

ある態様では、第2のナノケージモノマーサブユニットは生物活性部分に連結されている。

【0021】

ある態様では、生物活性部分は、Fc断片を含む。

【0022】

ある態様では、Fc断片は、IgG1 Fc断片である。

【0023】

ある態様では、Fc断片は、融合タンパク質の半減期を、例えば、数分または数時間から数日、数週間または数ヶ月まで調節する、LS、YTE、LALA、I253Aおよび／またはLALAPなどの1つもしくはそれを超える突然変異を含む。

【0024】

ある態様では、Fc断片は、scFc断片である。

【0025】

ある態様では、約3～約100個のナノケージモノマー、例えば24、32、もしくは60個のモノマー、または約4～約200個のナノケージモノマーサブユニット、例えば4、6、8、10、12、14、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、もしくはそれを超えるモノマーサブユニットが、必要に応じて1つもしくは複数のナノケージ全体モノマーと組み合わさって、自己組織化してナノケージを形成する。

【0026】

10

20

30

40

50

ある態様では、ナノケージモノマーは、フェリチン、アポフェリチン、エンカプセリン、S O R、ルマジンシンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、カルボキシソーム、ウォールタンパク質、G r o E L、熱ショックタンパク質、E 2 P、M S 2 コートタンパク質、それらの断片、およびそれらのバリエントから選択される。

【0027】

ある態様では、ナノケージモノマーは、アポフェリチン、必要に応じてヒトアポフェリチンである。

【0028】

ある態様では、第1および第2のナノケージモノマーサブユニットは、交換可能にアポフェリチンの「N」および「C」領域を含む。

10

【0029】

ある態様では、アポフェリチンの「N」領域は、以下：

【化1】

```
MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLQLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREG  
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW
```

と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる。

【0030】

20

ある態様では、アポフェリチンの「C」領域は、以下：

【化2】

```
GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNL  
HRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD
```

または

```
GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNL  
HRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD
```

の配列と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる。

30

【0031】

ある態様では、融合タンパク質は、ナノケージモノマーサブユニットと生物活性部分との間にリンカーをさらに含む。

【0032】

ある態様では、リンカーは可撓性または剛性であり、約1～約30個のアミノ酸残基、例えば約8～約16個のアミノ酸残基を含む。

【0033】

ある態様では、リンカーは、G G Sリピート、例えば1、2、3、4個またはそれを超えるG G Sリピートを含む。

40

【0034】

ある態様では、リンカーは、以下：

【化3】

```
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGG
```

と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる。

45

【0035】

ある態様では、融合タンパク質は、C末端リンカーをさらに含む。

【0036】

ある態様では、C末端リンカーは、以下：

【化4】

GGSGGSGGSGGSGGGSGGSGGSGGGSG

と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる。

【0037】

ある態様によれば、本明細書に記載される少なくとも1つの融合タンパク質と、融合タンパク質と自己組織化してナノケージモノマーを形成する少なくとも1つの第2のナノケージモノマーサブユニットとを含む、ナノケージが提供される。

【0038】

ある態様では、各ナノケージモノマーは、本明細書に記載の融合タンパク質を含む。

【0039】

ある態様では、ナノケージモノマーの約20%～約80%は、本明細書に記載の融合タンパク質を含む。

【0040】

ある態様では、ナノケージは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の異なるSARS-CoV-2結合部分、例えば3個の異なるSARS-CoV-2結合部分を含む。

【0041】

ある態様では、ナノケージは、多価および/または多重特異性である。

【0042】

ある態様では、ナノケージは、表4からの1つまたはそれを超えるmAbを含む。

【0043】

ある態様では、ナノケージは、表4からの3つのmAbを含む。

【0044】

ある態様では、ナノケージは、表4からのmAb 298、324、46、52、80、82および/または236を含む。

【0045】

ある態様では、ナノケージは、4：2：1：1の比のscFab1-ヒトアポフェリチン：scFc-ヒトN-フェリチン：scFab2-C-フェリチン：scFab3-C-フェリチンを含む。

【0046】

ある態様では、ナノケージは、医薬品、診断薬、および/または造影剤などのカーゴ分子を担持する。

【0047】

ある態様では、カーゴ分子は融合タンパク質に融合されておらず、ナノケージの内部に含まれている。

【0048】

ある態様では、カーゴ分子はタンパク質であり、カーゴ分子がナノケージの内部に含まれるように融合タンパク質に融合されている。

【0049】

ある態様では、カーゴ分子は、GFP、EGFP、アメトリシンなどの蛍光タンパク質、および/またはiLOVなどのLOVタンパク質などのフラビンベースの蛍光タンパク質である。

【0050】

ある態様によれば、SARS-CoV-2を標的とする三重特異性抗体コンストラクト

10

20

30

40

50

が提供される。

【0051】

ある態様によれば、本明細書に記載のナノケージまたは抗体を含むSARS-CoV-2治療用または予防用組成物が提供される。

【0052】

ある態様によれば、本明細書に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子が提供される。

【0053】

ある態様によれば、本明細書に記載の核酸分子を含むベクターが提供される。

【0054】

ある態様によれば、本明細書に記載のベクターを含み、本明細書に記載の融合タンパク質を産生する宿主細胞が提供される。 10

【0055】

ある態様によれば、SARS-CoV-2を処置および／または予防する方法であって、方法が、本明細書に記載のナノケージまたは抗体または組成物を投与することを含む、方法が提供される。

【0056】

ある態様によれば、SARS-CoV-2を処置および／または予防するための、本明細書に記載のナノケージまたは抗体または組成物の使用が提供される。

【0057】

ある態様によれば、SARS-CoV-2の処置および／または予防に使用するための、本明細書に記載のナノケージまたは抗体または組成物が提供される。 20

【0058】

ある態様によれば、以下の表に記載される任意の配列と少なくとも70%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド：

20

30

40

50

【表 17 - 1】

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRV TMTRDTSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARDIGPID YWQQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLA QQKPGKAPKLLIYDASNLSQGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPSTFGQQGTKEIK R
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWMGVISSAGSITNYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGNHAGTT VTSEYFQHWQQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYDTSNLETGVPSRFSGSGSGTDF FTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPWTFGQQGTREIK KR
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYHM HWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARDI SS WYEITKFDPWGQGTLTVSS	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSGTYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDF EFTLTISLQSEDFAVYYCLQTHSYPPTFGQQGTKEIK KR
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFSRYAIH WVRQAPGQGLEWMGWMNPISGNTDYAPNFQGRV TMTRDTSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCAKDGSQ L AYLVEYFQHWQQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVITNNLAWY QQKPGKAPKLLIYDASTLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYTFPYTFGQQGTKEIK R
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTTHYM HWVRQAPGQGLEWMGIINPSSSASYSQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARDGRY G SGSYPFDYWQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIISRYLNWY QQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPPTFGQQGTKEIK R
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTGHDM HWVRQAPGQGLEWMGAIIMPFGTANYAQKFQGRV TITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARANSLR YYYGMDWQGQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSWLAW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF FTLTISLQPEDFATYYCQQGYTTPYTFGQQGTKEIK KR
QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGANYAQKFQGRV TITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSSGYY YGWQQGTLTVSS	DIVMTQSPSLPVPTEPASISCRSSQSLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQLIYLGSNRASGVPDFRSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPATFGPG TKVDIKR
QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI WVRQAPGQGLEWMGWINPLNGTNFAPKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARDPG SYSNDAFDIWQGQGTLTVSS	DIVMTQSPSLPVPTEPASISCRSSQSLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQLIYAASSLQSGVPDFRSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQG TKLEIKR
QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAM HWVRQAPGQGLEWMGRISPRSGGTKYAQRFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAVAG THPQAGDFDLWGRGTLTVSS	DIVMTQSPSLPVPTEPASISCRSSQSLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQLIYAASSLQSGVPDFRSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYSSPYTFGQG TKLEIKR
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMH WVRQAPGKGLEWVSAIGTGGDTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDGYNF YFDYWQGQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLA QQKPGKAPKLLIYDASSLQIGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPWTFGQQGTKEIK R
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIN WVRQAPGQGLEWMGMIDPSGGSTSQAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCAKDFGG TRYDYWYFDLWGRGTLTVSS	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSSRYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDF EFTLTISLQSEDFAVYYCQQYYTTPRTFGQQGTREIK KR

10

20

30

40

50

【表 17 - 2】

EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSQHGM HWVRQAPGKGLEWVSAIDRSGYIYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTYGGK VTYFDYWGQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSHAWY QQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQTYSTPWTFGQGKVEIKR
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFSTYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISPNSGGTDLAQKFQGRV TMTRDTSVYMELESSLRSEDTAVYYCASPRDD IAGGYWGQGTLTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVPDFRSG SGSGTDFLTTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPPTFG QGTKEIKR
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGSFSTS YWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSVYMELESSLRSEDTAVYYCARSRAL YGGSYFDYWGQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVISNYLAWY QQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSFSPPTFGQGTRLEIKR
EVQLLESGGLVQPGRSRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSTIYSGGSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSRDAF DIWGQGTMVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF FTLTTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKR
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFNNYGIS WVRQAPGQGLEWMGWMPNNSGNTGYAQKFQGR VTMTRDTSVYMELESSLRSEDTAVYYCARVDY GDYIVSPFDLWGRGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITTYLNWY QQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGKVEIKR
QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGFTSYGIN WVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTTNYAQKFQGRVT VTMTRDTSVYMELESSLRSEDTAVYYCARSGIQL LPRGMDVWGQGTTTVSS	DIVMTQSPSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYN YLDWYLQKPGQSPQPLLIYLGSNRASGVPDFRSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQALQTPTFGQG TRLEIKR
QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTTNYAQKFQGRVT ITADKSTSTAYMELESSLRSEDTAVYYCARDRGDTID YWQGQGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDF FTLTTLTISSLQPEDFATYYCQQNGFPLTFGPGTKVDIKR
QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFNRYAF SWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVT ITADESTSTAYMELESSLRSEDTAVYYCARSTRELPE VWDWYFDLWGRGTLTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPKLLIYWASTRESGVPDFRSG SGSGTDFLTTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYAPLTFG GGTKVEIKR

またはその機能的断片が提供される。

【0059】

ある態様では、ポリペプチドは、記載された配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を含む。

【0060】

ある態様では、ポリペプチドは、記載された配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性からなる。

【0061】

ある態様によれば、本明細書に記載のポリペプチドを含む抗体またはその断片が提供される。

【0062】

ある態様によれば、(1)(2)ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結された断片結晶化可能(Fc)領域を含む融合ポリペプチドであって、Fc領域がI253A突然変異を含み、番号付けがEUインデックスに従う、融合ポリペプチドが提供される。

【0063】

ある態様では、Fc領域は、LALAP(L234A/L235A/P329G)突然変異をさらに含み、番号付けがEUインデックスに従う。

【0064】

ある態様では、Fc領域は、IgG1Fc領域である。

【0065】

ある態様では、ナノケージモノマーは、フェリチンモノマーである。

10

20

30

40

50

【0066】

ある態様では、フェリチンモノマーは、フェリチン軽鎖である。

【0067】

ある態様では、フェリチン軽鎖は、ヒトフェリチン軽鎖である。

【0068】

ある態様では、Fc領域は、アミノ酸リンカーを介してナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結されている。

【0069】

ある態様では、Fc領域は、ナノケージモノマーまたはそのサブユニットのN末端に連結されている。

10

【0070】

ある態様では、Fc領域は、単鎖Fc(scfc)である。

【0071】

ある態様では、Fc領域は、Fcモノマーである。

【0072】

ある態様によれば、自己組織化ポリペプチド複合体であって、

(a) 複数の第1の融合ポリペプチドであって、各第1の融合ポリペプチドが、(1)ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結されたFc領域と、

(b) 複数の第2の融合ポリペプチドであって、各第2の融合ポリペプチドが、(2)ナノケージモノマーまたはそのサブユニットに連結された(1)SARS-CoV-2結合抗体断片を含む、複数の第2の融合ポリペプチドと

20

を含む、自己組織化ポリペプチド複合体が提供される。

【0073】

ある態様では、ナノケージモノマーは、フェリチンモノマーである。

【0074】

ある態様では、ナノケージモノマーは、フェリチン軽鎖である。

【0075】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、フェリチン重鎖またはフェリチン重鎖のサブユニットを全く含まない。

【0076】

30

ある態様では、ナノケージモノマーは、ヒトフェリチン軽鎖である。

【0077】

ある態様では、SAR-CoV-2結合抗体断片は、SARS-CoV-2の受容体結合ドメインまたはスパイクタンパク質に結合する。

【0078】

ある態様では、SAR-CoV-2結合抗体断片は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む。

【0079】

ある態様では、SAR-CoV-2結合抗体断片は、SARS-CoV-2に結合することができる抗体のFabを含む。

40

【0080】

ある態様では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、V_KドメインおよびV_Hドメインを含む。

【0081】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、第1の融合ポリペプチドと第2の融合ポリペプチドとの1:1の比を特徴とする。

【0082】

ある態様では、Fc領域は、IgG1Fc領域である。

【0083】

ある態様では、Fc領域は、アミノ酸リンカーを介してナノケージモノマーまたはその

50

サブユニットに連結されている。

【0084】

ある態様では、F_c領域は、ナノケージモノマーまたはそのサブユニットのN末端に連結されている。

【0085】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、合計で少なくとも24個の融合ポリペプチドを含む。

【0086】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、合計で少なくとも32個の融合ポリペプチドを含む。

【0087】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、合計で約32個の融合ポリペプチドを有する。

【0088】

ある態様によれば、自己組織化ポリペプチド複合体であって、

(a) 複数の第1の融合ポリペプチドであって、各第1の融合ポリペプチドが、(1)ヒトフェリチンモノマーまたはそのサブユニットに連結されたIgG1 F_c領域を含み、IgG1 F_c領域が、LALAP(L234A/L235A/P329G)およびI253A突然変異を含み、番号付けがEUインデックスに従う、複数の第1の融合ポリペプチドと、

(b) 複数の第2の融合ポリペプチドであって、各第2の融合ポリペプチドが、(1)SARS-CoV-2タンパク質に結合することができる抗体のFab断片を含み、Fab断片が、(2)ヒトフェリチンモノマーまたはそのサブユニットに連結されている、複数の第2の融合ポリペプチドと

を含む、自己組織化ポリペプチド複合体が提供される。

【0089】

ある態様では、

(1) 各第1の融合ポリペプチドは、C-ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含み、各第2の融合ポリペプチドは、N-ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含むか、または

(2) 各第1の融合ポリペプチドは、N-ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含み、各第2の融合ポリペプチドは、C-ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含む。

【0090】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、第1の融合ポリペプチドと第2の融合ポリペプチドとの1:1の比を特徴とする。

【0091】

ある態様では、各第1の融合ポリペプチドは、C-ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含む。

【0092】

ある態様では、IgG1 F_c領域は、アミノ酸リンカーを介してC-ハーフフェリチンに連結されている。

【0093】

ある態様では、IgG1 F_c領域は、C-ハーフフェリチンのN末端を介してC-ハーフフェリチンに連結されている。

【0094】

ある態様では、各第2の融合ポリペプチドは、N-ハーフフェリチンであるフェリチンモノマーサブユニットを含む。

【0095】

ある態様では、Fab断片は、アミノ酸リンカーを介してN-ハーフフェリチンに連結

10

20

30

40

50

されている。

【 0 0 9 6 】

ある態様では、F_ab断片は、N-ハーフフェリチンのN末端を介してN-ハーフフェリチンに連結されている。

【 0 0 9 7 】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、複数の第3の融合ポリペプチドをさらに含み、各第3の融合ポリペプチドは、(1)(2)SARS-CoV-2タンパク質に結合することができる抗体のF_ab断片に連結されたヒトフェリチンモノマーを含む。

【 0 0 9 8 】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、第1の融合ポリペプチドと第2の融合ポリペプチドと第3の融合ポリペプチドとの1:1:2の比を特徴とする。 10

【 0 0 9 9 】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、合計で少なくとも24個の融合ポリペプチドを含む。

【 0 1 0 0 】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、合計で少なくとも32個の融合ポリペプチドを含む。

【 0 1 0 1 】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、合計で32個の融合ポリペプチドを有する。 20

【 0 1 0 2 】

ある態様では、F_ab断片は、V_KドメインおよびV_Hドメインを含み、

(1)V_Kドメインは配列番号11のアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号12のアミノ酸配列を有する；

(2)V_Kドメインは配列番号17のアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号18のアミノ酸配列を有する；

(3)V_Kドメインは配列番号25内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号26内のV_Hのアミノ酸配列を有する；

(4)V_Kドメインは配列番号27内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号28内のV_Hのアミノ酸配列を有する； 30

(5)V_Kドメインは配列番号29内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号30内のV_Hのアミノ酸配列を有する；

(6)V_Kドメインは配列番号31内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号32内のV_Hのアミノ酸配列を有する；

(7)V_Kドメインは配列番号33内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号34内のV_Hのアミノ酸配列を有する；

(8)V_Kドメインは配列番号35内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号36内のV_Hのアミノ酸配列を有する；

(9)V_Kドメインは配列番号37内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号38内のV_Hのアミノ酸配列を有する；

(10)V_Kドメインは配列番号39内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号40内のV_Hのアミノ酸配列を有する、(11)V_Kドメインは配列番号41内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号42内のV_Hのアミノ酸配列を有する； 40

(12)V_Kドメインは配列番号43内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号44内のV_Hのアミノ酸配列を有する；

(13)V_Kドメインは配列番号45内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号46内のV_Hのアミノ酸配列を有する；

(14)V_Kドメインは配列番号47内のV_Kのアミノ酸配列を有し、V_Hドメインは配列番号48内のV_Hのアミノ酸配列を有する； 50

(15) V_K ドメインは配列番号 49 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 50 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(16) V_K ドメインは配列番号 51 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 52 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(17) V_K ドメインは配列番号 53 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 54 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(18) V_K ドメインは配列番号 55 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 56 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(19) V_K ドメインは配列番号 57 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 58 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(20) V_K ドメインは配列番号 59 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 60 内の V_H のアミノ酸配列を有する；

(21) V_K ドメインは、配列番号 61 または配列番号 62 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは、配列番号 63 内の V_H のアミノ酸配列を有する；または

(22) V_K ドメインは配列番号 64 内の V_K のアミノ酸配列を有し、 V_H ドメインは配列番号 65 内の V_H のアミノ酸配列を有する。

【0103】

ある態様では、ヒトフェリチンモノマーは、ヒトフェリチン軽鎖である。

【0104】

ある態様では、自己組織化ポリペプチド複合体は、フェリチン重鎖またはフェリチン重鎖のサブユニットを全く含まない。

【0105】

ある態様によれば、SARS-CoV-2 関連症状を処置、改善、または予防する方法であって、方法が、本明細書に記載の自己組織化ポリペプチド複合体を含む組成物を対象に投与することを含む、方法が提供される。

【0106】

ある態様では、対象は、哺乳動物である。

【0107】

ある態様では、対象は、ヒトである。

【0108】

本発明の新規な特徴は、本発明の以下の詳細な説明を検討することによって当業者に明らかになるであろう。しかしながら、本発明の詳細な説明および提示された特定の実施例は、本発明の特定の態様を示しているが、例示目的でのみ提供されることを理解されたい。なぜなら、本発明の精神および範囲内の様々な変更および修正が、本発明の詳細な説明および以下の特許請求の範囲から当業者に明らかになるからである。

【図面の簡単な説明】

【0109】

本発明は、図面を参照して以下の説明からさらに理解されるであろう。

【図1】アビディティは、SARS-CoV-2 に対する V_{HH} の結合および中和を増強する。a. モノマー V_{HH} ドメインおよび従来の Fc (暗赤色) スカフォールドまたはヒトアポフェリチン (灰色) を使用したその多量体化の概略図。b. アポフェリチン単独 (灰色) および V_{HH} -72 アポフェリチン粒子 (金) のサイズ排除クロマトグラフィーおよび SDS-PAGE。c. V_{HH} -72 アポフェリチン粒子のネガティブ染色電子顕微鏡法。(スケールバー 50 nm、2つの独立した実験を表す)。d. 二価 (暗赤色) または 24 量体 (金) フォーマットで表示した場合の V_{HH} -72 の SARS-CoV-2 S タンパク質への結合アビディティ (見かけの K_D) の比較。バーは、 $n = 2$ の生物学的に独立した実験の平均値を示す。 $10^{-12} M$ (破線) 未満の見かけの K_D は機器検出限界を超えている。e. SARS-CoV-2 PsV に対する中和力価 (色分けは (d) の通りである)。同様の結果を有する 2 つの生物学的に独立した反復実験のうち、代表的な 1 つを示す。2 回の技術的反復実験の平均値 $\pm SD$ をプロットに示す。2 つの生物学的

10

20

30

40

50

に独立した反復実験の I C₅₀ 中央値を示す。

【0 1 1 0】

【図 2 a】Fab 52 および 298 と RBD との結合界面。Fab 298 (a) および 52 (b) と RBD (コア領域および RBM 領域についてそれぞれ明緑色および暗緑色) との相互作用は、重鎖 (H) 1 (黄色)、H 2 (橙色)、H 3 (赤色)、軽鎖 (K) 1 (淡青色) および K 3 (紫色) の相補性決定領域 (CDR) によって媒介される。重要な結合残基を棒 (挿入図) として示す。H 結合および塩橋を黒い破線として描写する。Fab の L鎖およびH鎖をそれぞれ黄褐色および白色で示す。c) RBD に結合した ACE 2 (左) および Fab 298 (右) の底面図および側面図。ACE 2 - RBD および Fab 298 - RBD 複合体の結合界面の一部である RBD 側鎖をピンク色で示し、所与の界面に固有の RBD 側鎖を黄色で示す。ACE 2 の表面、Fab 298 HC および Fab 298 KC の可変領域をそれぞれ白色、灰色およびタン色で示す。RBD は、(a) と同様に着色されている。d) Fab 46 (明るいピンク色) および Fab 52 (濃いピンク色) を RBD (緑色) に結合させたときの重ね合わせは、2つの mAb について明確な接近角を明らかにする。e) 298 - RBD および f) 52 - RBD の界面で 1.3 シグマでコンターしたコンポジットオミットマップ電子密度の立体画像。

【図 2 b】Fab 52 および 298 と RBD との結合界面。Fab 298 (a) および 52 (b) と RBD (コア領域および RBM 領域についてそれぞれ明緑色および暗緑色) との相互作用は、重鎖 (H) 1 (黄色)、H 2 (橙色)、H 3 (赤色)、軽鎖 (K) 1 (淡青色) および K 3 (紫色) の相補性決定領域 (CDR) によって媒介される。重要な結合残基を棒 (挿入図) として示す。H 結合および塩橋を黒い破線として描写する。Fab の L鎖およびH鎖をそれぞれ黄褐色および白色で示す。c) RBD に結合した ACE 2 (左) および Fab 298 (右) の底面図および側面図。ACE 2 - RBD および Fab 298 - RBD 複合体の結合界面の一部である RBD 側鎖をピンク色で示し、所与の界面に固有の RBD 側鎖を黄色で示す。ACE 2 の表面、Fab 298 HC および Fab 298 KC の可変領域をそれぞれ白色、灰色およびタン色で示す。RBD は、(a) と同様に着色されている。d) Fab 46 (明るいピンク色) および Fab 52 (濃いピンク色) を RBD (緑色) に結合させたときの重ね合わせは、2つの mAb について明確な接近角を明らかにする。e) 298 - RBD および f) 52 - RBD の界面で 1.3 シグマでコンターしたコンポジットオミットマップ電子密度の立体画像。

【図 2 c - 2 d】Fab 52 および 298 と RBD との結合界面。Fab 298 (a) および 52 (b) と RBD (コア領域および RBM 領域についてそれぞれ明緑色および暗緑色) との相互作用は、重鎖 (H) 1 (黄色)、H 2 (橙色)、H 3 (赤色)、軽鎖 (K) 1 (淡青色) および K 3 (紫色) の相補性決定領域 (CDR) によって媒介される。重要な結合残基を棒 (挿入図) として示す。H 結合および塩橋を黒い破線として描写する。Fab の L鎖およびH鎖をそれぞれ黄褐色および白色で示す。c) RBD に結合した ACE 2 (左) および Fab 298 (右) の底面図および側面図。ACE 2 - RBD および Fab 298 - RBD 複合体の結合界面の一部である RBD 側鎖をピンク色で示し、所与の界面に固有の RBD 側鎖を黄色で示す。ACE 2 の表面、Fab 298 HC および Fab 298 KC の可変領域をそれぞれ白色、灰色およびタン色で示す。RBD は、(a) と同様に着色されている。d) Fab 46 (明るいピンク色) および Fab 52 (濃いピンク色) を RBD (緑色) に結合させたときの重ね合わせは、2つの mAb について明確な接近角を明らかにする。e) 298 - RBD および f) 52 - RBD の界面で 1.3 シグマでコンターしたコンポジットオミットマップ電子密度の立体画像。

【図 2 e】Fab 52 および 298 と RBD との結合界面。Fab 298 (a) および 52 (b) と RBD (コア領域および RBM 領域についてそれぞれ明緑色および暗緑色) との相互作用は、重鎖 (H) 1 (黄色)、H 2 (橙色)、H 3 (赤色)、軽鎖 (K) 1 (淡青色) および K 3 (紫色) の相補性決定領域 (CDR) によって媒介される。重要な結合残基を棒 (挿入図) として示す。H 結合および塩橋を黒い破線として描写する。Fab の L鎖およびH鎖をそれぞれ黄褐色および白色で示す。c) RBD に結合した ACE

10

20

30

40

50

2(左)およびFab 298(右)の底面図および側面図。ACE2-RBDおよびFab 298-RBD複合体の結合界面の一部であるRBD側鎖をピンク色で示し、所との界面に固有のRBD側鎖を黄色で示す。ACE2の表面、Fab 298 HCおよびFab 298 KCの可変領域をそれぞれ白色、灰色およびタン色で示す。RBDは、(a)と同様に着色されている。d) Fab 46(明るいピンク色)およびFab 52(濃いピンク色)をRBD(緑色)に結合させたときの重ね合わせは、2つのmAbについて明確な接近角を明らかにする。e) 298-RBDおよびf) 52-RBDの界面で1.3シグマでコンターしたコンポジットオミットマップ電子密度の立体画像。

【図2f】Fab 52および298とRBDとの結合界面。Fab 298(a)および52(b)とRBD(コア領域およびRBM領域についてそれぞれ明緑色および暗緑色)との相互作用は、重鎖(H)1(黄色)、H2(橙色)、H3(赤色)、軽鎖(K)1(淡青色)およびK3(紫色)の相補性決定領域(CDR)によって媒介される。重要な結合残基を棒(挿入図)として示す。H結合および塩橋を黒い破線として描写する。FabのL鎖およびH鎖をそれぞれ黄褐色および白色で示す。c) RBDに結合したACE2(左)およびFab 298(右)の底面図および側面図。ACE2-RBDおよびFab 298-RBD複合体の結合界面の一部であるRBD側鎖をピンク色で示し、所との界面に固有のRBD側鎖を黄色で示す。ACE2の表面、Fab 298 HCおよびFab 298 KCの可変領域をそれぞれ白色、灰色およびタン色で示す。RBDは、(a)と同様に着色されている。d) Fab 46(明るいピンク色)およびFab 52(濃いピンク色)をRBD(緑色)に結合させたときの重ね合わせは、2つのmAbについて明確な接近角を明らかにする。e) 298-RBDおよびf) 52-RBDの界面で1.3シグマでコンターしたコンポジットオミットマップ電子密度の立体画像。

【0111】

【図3】マウスサロゲートMulltobodyのバイオアベイラビリティー、免疫原性、および免疫原性。a. 親IgGと比較したエンドソーム(中央)および生理学的(右)pHでのマウスFc RI(左)およびマウスFcRnに対する野生型およびFc改変型(LALAP突然変異)MBの結合動態。100~3nM(IgG)および10~0.3nM(MB)の二倍希釈系列を使用した。赤色の線は生データを表す; 黒色の線はグローバルフィットを表す。b. 1群当たり5匹の雄C57BL/6マウスを使用して、5mg/kgの皮下投与後のサロゲートマウスMB、Fc改変MB(LALAP突然変異)、ならびに親マウスIgG(IgG1およびIgG2aサブタイプ)の血清濃度を評価した。c. MBおよびIgG2a試料をAlexa-647で標識して、非侵襲的2D全身ライブイメージングによる3匹の雄BALB/cマウス/群への皮下注射後の生体内分布を可視化した。Mulltobodyと同様のRh値を有する15nmの蛍光標識金ナノ粒子(GNP)を比較対象として示す。d. 1群当たり5匹の雄C57BL/6マウスを使用して、親IgGおよびピロリ菌フェリチン(HpFerr)に融合した種ミスマッチマラリアPfCSPペプチドと比較して、マウスサロゲートMulltobodyによって誘導される任意の抗薬物抗体応答を評価した。n=5マウスの平均値±SDを、(b)および(d)に示す。

【0112】

【図4】サロゲートマウスMulltobodyの3D生体内分布は、その親IgGに匹敵する。Alexa-647で標識した15nm金ナノ粒子(GNP)、MBおよびIgG試料の体内分布を、非侵襲的3D全身ライブイメージングを介してBALB/cマウスへの皮下注射後に可視化した。a) PBS注入対照からのCTスキャンがオーバーレイされた代表的な3Dレンダリング蛍光画像。b) CTスキャンがオーバーレイされた主要なマウス器官の局在化の描写。c) 金ナノ粒子(上)、MB(中央の3つのパネル)またはIgG(下のパネル)の皮下注射の1時間後(1H)、2日後(D2)、8日後(D8)および11日後(D11)にCTスキャンがオーバーレイされた3Dレンダリング蛍光画像。各3D画像セットは、CTスキャン(右)、ならびにシグナル局在化に基づく選択された正面(左上)、中間(中央)、および横断(左下)面がオーバーレイされた背面図を示す。

10

20

30

40

50

して表示される。3D蛍光画像をレインボールックアップテーブル(LUT)にマッピングし、カラースケールの最小値をバックグラウンドに設定し、最大値を $50\text{ pmol M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (GNP)または $1000\text{ pmol M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (MBおよびIgG)に設定した。

【0113】

【図5】SARS-CoV-2に対してIgG様粒子を多量体化するためのタンパク質エンジニアリング。a.ヒトアポフェリチン分割設計の概略図。b.MBのネガティブ染色電子顕微鏡写真。(スケールバー 50 nm 、2つの独立した実験を表す)。c.MBの流体力学的半径(R_h)。d.4A8(紫色)およびBD23(灰色)のSARS-CoV-2スパイクへの結合(見かけの K_D)に及ぼすアビディティ効果。e.FcRI(上段)、エンドソームpHでのFcRn(中段)および生理学的pHでのFcRn(下段)に結合する異なるFc配列バリアントを有するBD23 IgGおよびMBのセンソグラム。赤色の線は生データを表し、一方で、黒色の線はグローバルフィットを表す。f.4A8およびBD23 IgGおよびMBによるSARS-CoV-2 PsVの中和。3つの生物学的に独立した試料の代表的なデータ。2回の技術的反復実験の平均値 \pm SDを各中和プロットに示す。3つの生物学的に独立した反復実験のIC₅₀中央値を示す。

【0114】

【図6】Multobodyは、ファージディスプレイからのヒトmAbの力価を増強する。a.MB技術を用いた強力な抗SAR-CoV-2中和剤の同定のためのワークフロー。Biorenderで作成。b.ファージディスプレイからの同じヒトFab配列を提示するIgG(シアン色)とMB(ピンク色)との間の中和力価の比較。c.IC₅₀値は多量体化時に上昇する。d.SARS-CoV-2 Sタンパク質に結合するためのMultobodyのIgG対応物(シアン色)と比較した、最も強力な中和MB(ピンク色)の見かけのアフィニティー(K_D)、会合(k_{on})および解離(k_{off})速度。3つの生物学的反復実験およびそれらの平均を(b)および(c)のIC₅₀値について示す。

【0115】

【図7a-1】SARS-CoV-2 RBDターゲティングMultabodiesおよびそれらの親IgGの中和。a)IgG(黒色)およびMB(暗赤色)として表示した場合の、SARS-CoV-2 PsVに対する20個の抗体の代表的な中和滴定曲線。3つの生物学的反復実験の平均IC₅₀値を比較のために表示する。2回の技術的反復実験の平均値 \pm SDを各中和プロットに示す。b)293T-ACE2(黒色)およびHeLa-ACE2(灰色)を標的とするSARS-CoV-2 PsVに対する選択されたIgGおよびMBの中和プロファイル。3回および2回の生物学的反復実験の平均IC₅₀値および個々のIC₅₀値を、293T-ACE2細胞およびHeLa-ACE2細胞についてそれぞれ示す。c)SARS-CoV-2/SB2-P4-PBの正統株に対する3つの生物学的反復実験(異なる濃淡の灰色)の中和滴定曲線。平均IC₅₀を示す。組換えmAbのREGN10933(赤色)およびREGN10987(青色)の中和効力を比較のためのベンチマークとして(a)および(c)に含める。

【図7a-2】SARS-CoV-2 RBDターゲティングMultabodiesおよびそれらの親IgGの中和。a)IgG(黒色)およびMB(暗赤色)として表示した場合の、SARS-CoV-2 PsVに対する20個の抗体の代表的な中和滴定曲線。3つの生物学的反復実験の平均IC₅₀値を比較のために表示する。2回の技術的反復実験の平均値 \pm SDを各中和プロットに示す。b)293T-ACE2(黒色)およびHeLa-ACE2(灰色)を標的とするSARS-CoV-2 PsVに対する選択されたIgGおよびMBの中和プロファイル。3回および2回の生物学的反復実験の平均IC₅₀値および個々のIC₅₀値を、293T-ACE2細胞およびHeLa-ACE2細胞についてそれぞれ示す。c)SARS-CoV-2/SB2-P4-PBの正統株に対する3つの生物学的反復実験(異なる濃淡の灰色)の中和滴定曲線。平均IC₅₀を示す。組換えmAbのREGN10933(赤色)およびREGN10987(青色)の中

10

20

30

40

50

和効力を比較のためのベンチマークとして(a)および(c)に含める。

【図 7 a - 3】SARS-CoV-2 RBDターゲティング Multabodies およびそれらの親 IgG の中和。 a) IgG (黒色) および MB (暗赤色) として表示した場合の、 SARS-CoV-2 PsV に対する 20 個の抗体の代表的な中和滴定曲線。 3 つの生物学的反復実験の平均 IC₅₀ 値を比較のために表示する。 2 回の技術的反復実験の平均値 ± SD を各中和プロットに示す。 b) 293T-ACE2 (黒色) および HeLa-ACE2 (灰色) を標的とする SARS-CoV-2 PsV に対する選択された IgG および MB の中和プロファイル。 3 回および 2 回の生物学的反復実験の平均 IC₅₀ 値および個々の IC₅₀ 値を、 293T-ACE2 細胞および HeLa-ACE2 細胞についてそれぞれ示す。 c) SARS-CoV-2 / SB2-P4-PB の正統株に対する 3 つの生物学的反復実験 (異なる濃淡の灰色) の中和滴定曲線。 平均 IC₅₀ を示す。 組換え mAb の REGN 10933 (赤色) および REGN 10987 (青色) の中和効力を比較のためのベンチマークとして(a)および(c)に含める。
10

【図 7 b】SARS-CoV-2 RBDターゲティング Multabodies およびそれらの親 IgG の中和。 a) IgG (黒色) および MB (暗赤色) として表示した場合の、 SARS-CoV-2 PsV に対する 20 個の抗体の代表的な中和滴定曲線。 3 つの生物学的反復実験の平均 IC₅₀ 値を比較のために表示する。 2 回の技術的反復実験の平均値 ± SD を各中和プロットに示す。 b) 293T-ACE2 (黒色) および HeLa-ACE2 (灰色) を標的とする SARS-CoV-2 PsV に対する選択された IgG および MB の中和プロファイル。 3 回および 2 回の生物学的反復実験の平均 IC₅₀ 値および個々の IC₅₀ 値を、 293T-ACE2 細胞および HeLa-ACE2 細胞についてそれぞれ示す。 c) SARS-CoV-2 / SB2-P4-PB の正統株に対する 3 つの生物学的反復実験 (異なる濃淡の灰色) の中和滴定曲線。 平均 IC₅₀ を示す。 組換え mAb の REGN 10933 (赤色) および REGN 10987 (青色) の中和効力を比較のためのベンチマークとして(a)および(c)に含める。
20

【図 7 c】SARS-CoV-2 RBDターゲティング Multabodies およびそれらの親 IgG の中和。 a) IgG (黒色) および MB (暗赤色) として表示した場合の、 SARS-CoV-2 PsV に対する 20 個の抗体の代表的な中和滴定曲線。 3 つの生物学的反復実験の平均 IC₅₀ 値を比較のために表示する。 2 回の技術的反復実験の平均値 ± SD を各中和プロットに示す。 b) 293T-ACE2 (黒色) および HeLa-ACE2 (灰色) を標的とする SARS-CoV-2 PsV に対する選択された IgG および MB の中和プロファイル。 3 回および 2 回の生物学的反復実験の平均 IC₅₀ 値および個々の IC₅₀ 値を、 293T-ACE2 細胞および HeLa-ACE2 細胞についてそれぞれ示す。 c) SARS-CoV-2 / SB2-P4-PB の正統株に対する 3 つの生物学的反復実験 (異なる濃淡の灰色) の中和滴定曲線。 平均 IC₅₀ を示す。 組換え mAb の REGN 10933 (赤色) および REGN 10987 (青色) の中和効力を比較のためのベンチマークとして(a)および(c)に含める。
30

【0116】

【図 8】SARS-CoV-2 RBDターゲティング Multabodies の発現収率および均一性。 a) 7 つの最も強力な IgG (白色) およびそれらのそれぞれの MB (暗赤色) の収量 (mg/L)。 2 つの生物学的に独立した試料についての平均値 ± SD。 b) (a) と同様の凝集温度 (T_{agg}) の比較。 実線は、 2 つの生物学的に独立した試料の平均 T_{agg} 値を示す。 c) 3 つの独立した発現および精製からの 298 IgG (上段、 黒色) および 298 MB (下段、 暗赤色) の SEC クロマトグラム。 SEC の前に、 両方の場合において、 試料をプロテイン A アフィニティーコロマトグラフィーを用いて精製した。 矢印は、 各バッヂから PsV 中和アッセイを実施するために使用されるピークを示す。 IC₅₀ 値 (μg/mL) を示す。 2 回の技術的反復実験の平均値 ± SD を各中和プロットに示す。
40

【0117】

【図 9 - 1】IgG および MB の結合プロファイル。 Ni - NTA バイオセンサ上に固定

10

20

30

40

50

化された SARS-CoV-2 の RBD (左) および S タンパク質 (右) に結合する IgG および MB のセンソグラム。125 ~ 4 nm (IgG)、および 16 ~ 0.5 nm (MB) の 2 倍希釈系列を使用した。赤色の線は生データを表し、一方で、黒色の線はグローバルフィットを表す。

【図 9 - 2】 IgG および MB の結合プロファイル。Ni-NTA バイオセンサ上に固定化された SARS-CoV-2 の RBD (左) および S タンパク質 (右) に結合する IgG および MB のセンソグラム。125 ~ 4 nm (IgG)、および 16 ~ 0.5 nm (MB) の 2 倍希釈系列を使用した。赤色の線は生データを表し、一方で、黒色の線はグローバルフィットを表す。

【0118】

10

【図 10】最も強力な mAb 特異性のエピトープ記述。RBD (コアについては明るい緑色、RBM については暗い緑色) および ACE2⁶⁶ (明るい褐色) 結合の表面およびコンピュータ画像表示。結合競合実験を示すヒートマップ。高シグナル応答 (赤色) は低競合を表し、一方で、低シグナル応答 (白色) は高競合に対応する。エピトープビンは、破線のボックスによって強調表示されている。b. Fab 80 (黄色)、298 (橙色)、および 324 (赤色) と複合体を形成したスパイク (灰色) の 15.0 濾過 cryo-EM 再構成。RBD および NTD は、それぞれ緑色および青色で示されている。c. Fab 46 (ピンク色) および RBD (緑色) 複合体の cryo-EM 再構成。RBD⁶ の二次構造のコンピュータ画像を、RBD について観察された部分密度に当てはめる。d. Fab 52 (紫色)、Fab 298 (橙色)、および RBD (緑色) によって形成された三元複合体の結晶構造。e. 利用可能な PDB または EMD エントリ 3, 4, 9, 10, 13, 15, 17, 67, 68, 69, 70, 71, 72 を有する、リガンドを持たない (PDB 6X4M) および抗体結合 SARS-CoV-2 スパイクの側面図および上面図を示す合成画像。挿入図：RBD 上の異なる抗原部位を標的とする抗体の拡大図。SARS-CoV-2 Psv に対する最も低い報告された IC₅₀ 値を有する mAb をビンの代表抗体として選択し (太字で強調表示)、類似の結合エピトープを有するそれらの抗体を以下に同じ色で列挙する ((b) のようなスパイク、NTD および RBD の色分け)。リガンドを持たないスパイクにおける個々のプロトマーを、白色、ピンク色、および紫色で示す。

20

【0119】

30

【図 11】エピトープビニング。バイオレイヤー干渉法 (BLI) によって測定した His タグ付き RBD に対する mAb 結合競合実験。50 μg / ml の mAb 1 を 3 分間インキュベートし、続いて 50 μg / ml の mAb 2 と 5 分間インキュベートした。

【0120】

40

【図 12 a】Fab - スパイクおよび Fab - RBD 複合体の cryo-EM 分析。Fab 80 - スパイク複合体 (a)、Fab 298 - スパイク複合体 (b)、Fab 324 - スパイク複合体 (c)、および Fab 46 - RBD 複合体 (d) について、代表的な cryo-EM 顕微鏡写真 (スケールバー 50 nm、左上)、選択された 2D クラス平均 (右上)、最後の 3D 不均一精密化からのフーリエシェル相関曲線 (左下) および cryo-EM マップの表面にプロットされた局所分解能 () (右下) を示す。

【図 12 b】Fab - スパイクおよび Fab - RBD 複合体の cryo-EM 分析。Fab 80 - スパイク複合体 (a)、Fab 298 - スパイク複合体 (b)、Fab 324 - スパイク複合体 (c)、および Fab 46 - RBD 複合体 (d) について、代表的な cryo-EM 顕微鏡写真 (スケールバー 50 nm、左上)、選択された 2D クラス平均 (右上)、最後の 3D 不均一精密化からのフーリエシェル相関曲線 (左下) および cryo-EM マップの表面にプロットされた局所分解能 () (右下) を示す。

【図 12 c】Fab - スパイクおよび Fab - RBD 複合体の cryo-EM 分析。Fab 80 - スパイク複合体 (a)、Fab 298 - スパイク複合体 (b)、Fab 324 - スパイク複合体 (c)、および Fab 46 - RBD 複合体 (d) について、代表的な cryo-EM 顕微鏡写真 (スケールバー 50 nm、左上)、選択された 2D クラス

50

平均（右上）、最後の3D不均一精密化からのフーリエシェル相関曲線（左下）およびCryo-EMマップの表面にプロットされた局所分解能（）（右下）を示す。

【図12d】Fab-スパイクおよびFab-RBD複合体のCryo-EM分析。Fab 80-スパイク複合体（a）、Fab 298-スパイク複合体（b）、Fab 324-スパイク複合体（c）、およびFab 46-RBD複合体（d）について、代表的なcryo-EM顕微鏡写真（スケールバー50nm、左上）、選択された2Dクラス平均（右上）、最後の3D不均一精密化からのフーリエシェル相関曲線（左下）およびCryo-EMマップの表面にプロットされた局所分解能（）（右下）を示す。

【0121】

【図13a-13c】MultabodiesはSARS-CoV-2配列多様性を克服する。a. 4つの天然に存在する突然変異を球体で示すRBDのコンピュータ画像表示。mAb 52（明るい桃色）および298（黄色）のエピトープは、各ビンの代表的なエピトープとして示されている。b. アフィニティーおよびc. 野生型および突然変異型RBDとPsVとの間のIC₅₀倍率変化の比較。d. 野生型PsVと比較した、SARS-CoV-2 PsVバリアントに対するIgG（灰色のバー）対MB（濃い赤色のバー）の中和力価。e. 野生型SARS-CoV-2 PsVおよびバリアントに対する2つのIgGカクテル（3つのIgG）、単一特異性MBカクテル（3つのMB）および三重特異性MBの中和力価の比較。1つまたはそれを超えるPsVバリアント（d）に感受性のmAbを選択して、カクテルおよび三重特異性MBを生成した。f. SARS-CoV-2 B.1.351 PsVバリアントに対する三重特異性298-80-52 MBの中和力価。g. PsV（y軸）および複製能を有するSARS-CoV-2ウイルス（SB2-P4-PB：x軸）におけるIC₅₀値は、広範囲のmAb特徴（青色および黒色）にわたって力を増強する三重特異性MB（赤色）の力を実証している。h. IC₅₀値は多量体化時に上昇する。3回の生物学的反復実験の平均を（b-h）に示す。

【図13d-13f】MultabodiesがSARS-CoV-2配列多様性を克服する。a. 4つの天然に存在する突然変異を球体で示すRBDのコンピュータ画像表示。mAb 52（明るい桃色）および298（黄色）のエピトープは、各ビンの代表的なエピトープとして示されている。b. アフィニティーおよびc. 野生型および突然変異型RBDとPsVとの間のIC₅₀倍率変化の比較。d. 野生型PsVと比較した、SARS-CoV-2 PsVバリアントに対するIgG（灰色のバー）対MB（濃い赤色のバー）の中和力価。e. 野生型SARS-CoV-2 PsVおよびバリアントに対する2つのIgGカクテル（3つのIgG）、単一特異性MBカクテル（3つのMB）および三重特異性MBの中和力価の比較。1つまたはそれを超えるPsVバリアント（d）に感受性のmAbを選択して、カクテルおよび三重特異性MBを生成した。f. SARS-CoV-2 B.1.351 PsVバリアントに対する三重特異性298-80-52 MBの中和力価。g. PsV（y軸）および複製能を有するSARS-CoV-2ウイルス（SB2-P4-PB：x軸）におけるIC₅₀値は、広範囲のmAb特徴（青色および黒色）にわたって力を増強する三重特異性MB（赤色）の力を実証している。h. IC₅₀値は多量体化時に上昇する。3回の生物学的反復実験の平均を（b-h）に示す。

【図13g-13h】MultabodiesがSARS-CoV-2配列多様性を克服する。a. 4つの天然に存在する突然変異を球体で示すRBDのコンピュータ画像表示。mAb 52（明るい桃色）および298（黄色）のエピトープは、各ビンの代表的なエピトープとして示されている。b. アフィニティーおよびc. 野生型および突然変異型RBDとPsVとの間のIC₅₀倍率変化の比較。d. 野生型PsVと比較した、SARS-CoV-2 PsVバリアントに対するIgG（灰色のバー）対MB（濃い赤色のバー）の中和力価。e. 野生型SARS-CoV-2 PsVおよびバリアントに対する2つのIgGカクテル（3つのIgG）、単一特異性MBカクテル（3つのMB）および三重特異性MBの中和力価の比較。1つまたはそれを超えるPsVバリアント（d）に感受性のmAbを選択して、カクテルおよび三重特異性MBを生成した。f. SARS-CoV-2 B.1.351 PsVバリアントに対する三重特異性298-80-52 MB

10

20

30

40

50

の中和力価。g . P s V (y 軸) および複製能を有する S A R S - C o V - 2 ウィルス (S B 2 - P 4 - P B : x 軸) における I C 5 0 値は、広範囲の m A b 特徴 (青色および黒色) にわたって力価を増強する三重特異性 M B (赤色) の能力を実証している。h . I C 5 0 値は多量体化時に上昇する。3 回の生物学的反復実験の平均を (b - h) に示す。

【0 1 2 2】

【図 14 a】M B は S A R S - C o V - 2 配列多様性を強力に克服する。a) 野生型 P s V (暗赤色) およびより感染性の D 6 1 4 G P s V (灰色) に対する選択された I g G および M B の中和力価の比較。b) M B 分割設計を使用して 3 つの F a b 特異性と F c 断片との組み合わせによって生成された三重特異性 M B の概略図。c) m A b 2 9 8 、 8 0 および 5 2 、または 2 9 8 、 3 2 4 および 4 6 の特異性を組み合わせるカクテルおよび三重特異性 M B を生成し、野生型 P s V に対して試験した。2 回の技術的反復実験の平均値 ± S D を各々の代表的中和プロットに表す。ソースデータは、ソースデータファイルとして提供される。d) 野生型 P s V と比較した、偽型 S A R S - C o V - 2 バリアントに対するカクテルおよび三重特異性 M B の中和力価変化。カクテル内の個々の抗体に感受性の P s V バリアントを選択した。点線内の面積は、I C 5 0 値の 3 倍の変化を表す。この閾値は、感度の増加 (アップバー) または抵抗の増加 (ダウンバー) のカットオフとして確立された。e) S A R S - C o V - 2 / S B 2 - P 4 - P B の正統株に対するカクテルおよび三重特異性 M B の 3 つの生物学的反復実験を示す中和滴定曲線。3 つの生物学的に独立した反復実験の平均 I C 5 0 値を示す。

【図 14 b】M B は S A R S - C o V - 2 配列多様性を強力に克服する。a) 野生型 P s V (暗赤色) およびより感染性の D 6 1 4 G P s V (灰色) に対する選択された I g G および M B の中和力価の比較。b) M B 分割設計を使用して 3 つの F a b 特異性と F c 断片との組み合わせによって生成された三重特異性 M B の概略図。c) m A b 2 9 8 、 8 0 および 5 2 、または 2 9 8 、 3 2 4 および 4 6 の特異性を組み合わせるカクテルおよび三重特異性 M B を生成し、野生型 P s V に対して試験した。2 回の技術的反復実験の平均値 ± S D を各々の代表的中和プロットに表す。ソースデータは、ソースデータファイルとして提供される。d) 野生型 P s V と比較した、偽型 S A R S - C o V - 2 バリアントに対するカクテルおよび三重特異性 M B の中和力価変化。カクテル内の個々の抗体に感受性の P s V バリアントを選択した。点線内の面積は、I C 5 0 値の 3 倍の変化を表す。この閾値は、感度の増加 (アップバー) または抵抗の増加 (ダウンバー) のカットオフとして確立された。e) S A R S - C o V - 2 / S B 2 - P 4 - P B の正統株に対するカクテルおよび三重特異性 M B の 3 つの生物学的反復実験を示す中和滴定曲線。3 つの生物学的に独立した反復実験の平均 I C 5 0 値を示す。

【図 14 c】M B は S A R S - C o V - 2 配列多様性を強力に克服する。a) 野生型 P s V (暗赤色) およびより感染性の D 6 1 4 G P s V (灰色) に対する選択された I g G および M B の中和力価の比較。b) M B 分割設計を使用して 3 つの F a b 特異性と F c 断片との組み合わせによって生成された三重特異性 M B の概略図。c) m A b 2 9 8 、 8 0 および 5 2 、または 2 9 8 、 3 2 4 および 4 6 の特異性を組み合わせるカクテルおよび三重特異性 M B を生成し、野生型 P s V に対して試験した。2 回の技術的反復実験の平均値 ± S D を各々の代表的中和プロットに表す。ソースデータは、ソースデータファイルとして提供される。d) 野生型 P s V と比較した、偽型 S A R S - C o V - 2 バリアントに対するカクテルおよび三重特異性 M B の中和力価変化。カクテル内の個々の抗体に感受性の P s V バリアントを選択した。点線内の面積は、I C 5 0 値の 3 倍の変化を表す。この閾値は、感度の増加 (アップバー) または抵抗の増加 (ダウンバー) のカットオフとして確立された。e) S A R S - C o V - 2 / S B 2 - P 4 - P B の正統株に対するカクテルおよび三重特異性 M B の 3 つの生物学的反復実験を示す中和滴定曲線。3 つの生物学的に独立した反復実験の平均 I C 5 0 値を示す。

【図 14 d】M B は S A R S - C o V - 2 配列多様性を強力に克服する。a) 野生型 P s V (暗赤色) およびより感染性の D 6 1 4 G P s V (灰色) に対する選択された I g G および M B の中和力価の比較。b) M B 分割設計を使用して 3 つの F a b 特異性と F c 断

10

20

30

40

50

片との組み合わせによって生成された三重特異性MBの概略図。c) mAb 298、80および52、または298、324および46の特異性を組み合わせるカクテルおよび三重特異性MBを生成し、野生型PsVに対して試験した。2回の技術的反復実験の平均値±SDを各々の代表的中和プロットに表す。ソースデータは、ソースデータファイルとして提供される。d) 野生型PsVと比較した、偽型SARS-CoV-2バリエントに対するカクテルおよび三重特異性MBの中和力価変化。カクテル内の個々の抗体に感受性のPsVバリエントを選択した。点線内の面積は、IC₅₀値の3倍の変化を表す。この閾値は、感度の増加（アップバー）または抵抗の増加（ダウンバー）のカットオフとして確立された。e) SARS-CoV-2/SB2-P4-PBの正統株に対するカクテルおよび三重特異性MBの3つの生物学的反復実験を示す中和滴定曲線。3つの生物学的に独立した反復実験の平均IC₅₀値を示す。

【図14e】MBはSARS-CoV-2配列多様性を強力に克服する。a) 野生型PsV（暗赤色）およびより感染性のD614G PsV（灰色）に対する選択されたIgGおよびMBの中和力価の比較。b) MB分割設計を使用して3つのFab特異性とFc断片との組み合わせによって生成された三重特異性MBの概略図。c) mAb 298、80および52、または298、324および46の特異性を組み合わせるカクテルおよび三重特異性MBを生成し、野生型PsVに対して試験した。2回の技術的反復実験の平均値±SDを各々の代表的中和プロットに表す。ソースデータは、ソースデータファイルとして提供される。d) 野生型PsVと比較した、偽型SARS-CoV-2バリエントに対するカクテルおよび三重特異性MBの中和力価変化。カクテル内の個々の抗体に感受性のPsVバリエントを選択した。点線内の面積は、IC₅₀値の3倍の変化を表す。この閾値は、感度の増加（アップバー）または抵抗の増加（ダウンバー）のカットオフとして確立された。e) SARS-CoV-2/SB2-P4-PBの正統株に対するカクテルおよび三重特異性MBの3つの生物学的反復実験を示す中和滴定曲線。3つの生物学的に独立した反復実験の平均IC₅₀値を示す。

【0123】

【図15】N92T突然変異は、IgGとしても、野生型シードウイルス中和アッセイにおける単一特異性MBとしても、力価に影響を及ぼさなかった。

【0124】

【図16】mAb 52のVL中にN92T突然変異を含む298-80-52三重特異性MBをP.1 PsV中和アッセイでスクリーニングし、その結果、親三重特異性MBと比較して、力価の喪失は観察されないことが確認された。

【0125】

【図17】例示的な三重特異性MB 298~80~52を、シードウイルス中和アッセイにおいて関心対象のバリエント（VOC）にわたる力価について評価した。

【発明を実施するための形態】

【0126】

特定の態様の詳細な説明

定義

別段の説明がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学における一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrewら(編)、The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびRobert A. Meyers(編)、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)

10

20

30

40

50

に見出すことができる。本明細書に記載の方法および材料と類似または同等の任意の方法および材料を、本発明の試験の実施に使用できるが、典型的な材料および方法を本明細書に記載する。本発明の説明および特許請求の範囲において、以下の用語が使用される。

【0127】

本明細書で使用される用語は、特定の態様を説明することのみを目的としており、限定することを意図していないことも理解されたい。本明細書では、記載された態様の理解を助けるために、多くの特許出願、特許、および刊行物が参照される。これらの参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0128】

本出願の範囲を理解する際に、冠詞「a」、「an」、「the」、および「said」10は、1つまたはそれを超える要素があることを意味することを意図している。さらに、本明細書で使用される「含む (comprising)」という用語およびその派生語は、記載された特徴、要素、構成要素、群、整数、および / またはステップの存在を指定するが、他の記載されていない特徴、要素、構成要素、群、整数、および / またはステップの存在を排除しないオープンエンドの用語であることを意図している。上記は、「含む (including)」、「有する (having)」という用語およびそれらの派生語などの同様の意味を有する単語にも適用される。

【0129】

特定の構成要素を「含む (comprising)」と記載される任意の態様はまた、「からなる (consist of)」または「から本質的になる (consist essentially of)」20であってもよく、「からなる (consisting of)」は、クローズドエンドまたは制限的な意味を有し、「から本質的になる (consisting essentially of)」は、指定された構成要素を含むが、不純物として存在する材料、構成要素を提供するために使用されるプロセスの結果として存在する不可避の材料、および本発明の技術的效果を達成すること以外の目的で追加される構成要素を除く他の構成要素を除外することを意味することが理解されるであろう。例えば、「から本質的になる」という語句を使用して定義される組成物は、任意の既知の許容され得る添加剤、賦形剤、希釈剤、担体などを包含する。典型的には、一組の成分から本質的になる組成物は、5%重量未満、典型的には3%重量未満、より典型的には1%重量未満、さらにより典型的には0.1%重量未満の特定されていない成分を含む。30

【0130】

本明細書に含まれると定義される任意の構成要素は、条件または否定的な限定によって特許請求される発明から明示的に除外され得ることが理解されるであろう。例えば、いくつかの態様では、本明細書に記載のナノケージおよび / または融合タンパク質は、フェリチン重鎖を除外してもよく、および / または鉄結合成分を除外してもよい。

【0131】

さらに、本明細書で与えられるすべての範囲は、明示的に述べられているか否かにかかわらず、範囲の端部および任意の中間範囲点も含む。

【0132】

本明細書で使用される「実質的に (substantially)」、「約 (about)」、および「およそ (approximately)」などの程度の用語は、最終結果が大きく変化しないように、修飾された用語の妥当な逸脱量を意味する。これらの程度の用語は、この逸脱量が、修飾する単語の意味を否定しない場合、修飾された用語の最大±5%の逸脱量を含むものとして解釈されるべきである。例えば、「約」という用語は、言及された値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満に含まれる値の範囲を包含し得る。40

【0133】

「e.g. (例えば)」とい略語は、ラテン語の exempli gratia に由来し、非限定的な例を示すために本明細書で使用される。したがって、「e.g.」という50

略語は、「例えば」または「など」という訳語と同義である。「または」という単語は、文脈上特に明記されていない限り、「および」を含むことを意図している。

【0134】

本明細書で使用される「対象」という用語は、動物界の任意のメンバー、典型的には哺乳動物を指す。「哺乳動物」という用語は、ヒト、他の高等靈長類、家畜および農場動物、ならびに動物園、スポーツ、またはペット動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなどを含む、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。典型的には、哺乳動物はヒトである。

【0135】

「タンパク質ナノ粒子」、「ナノケージ」、および「m u l t a b o d y」という用語は、本明細書では互換的に使用され、マルチサブユニット、タンパク質ベースの多面体形状の構造を指す。サブユニットまたはナノケージは、各々、タンパク質またはポリペプチド（例えば、グリコシリ化ポリペプチド）と、必要に応じて、核酸、補欠分子族、有機および無機化合物の单一または複数の特徴とで構成される。タンパク質ナノ粒子の非限定的な例としては、フェリチンナノ粒子（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Zhang, Y. Int. J. Mol. Sci., 12: 5406 - 5421, 2011を参考のこと）、エンカプスリンナノ粒子（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Sutterら、Nature Struct. and Mol. Biol., 15: 939 - 947, 2008を参考のこと）、硫黄オキシゲナーゼレダクターゼ（SOR）ナノ粒子（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Urichら、Science, 311: 996 - 1000, 2006を参考のこと）、ルマジンシンターゼナノ粒子（例えば、Zhangら、J. Mol. Biol., 306: 1099 - 1114, 2001）およびピルビン酸デヒドロゲナーゼナノ粒子（例えば、参照により本明細書に組み込まれるIzardら、PNAS 96: 1240 - 1245, 1999を参考のこと）が挙げられる。フェリチン、アポフェリチン、エンカプスリン、SOR、ルマジンシンターゼ、およびピルビン酸デヒドロゲナーゼは、場合によってはそれぞれ24、60、24、60、および60個のタンパク質サブユニットからなる球状タンパク質複合体へと自己組織化するモノマータンパク質である。フェリチンおよびアポフェリチンは、一般に、本明細書では互換的に言及され、両方とも本明細書に記載の融合タンパク質、ナノケージおよび方法での使用に適していると理解される。カルボキシソーム、ウォルトタンパク質、GroEL、熱ショックタンパク質、E2PおよびMS2コートタンパク質もまたナノケージを生成し、本明細書で使用することが企図される。さらに、完全または部分的に合成された自己組織化するモノマーも、本明細書での使用が企図される。

【0136】

各ナノケージモノマーは、官能性ナノケージモノマーに自己組織化する2つまたはそれを超えるサブユニットに分割され得ることが理解されるであろう。例えば、フェリチンまたはアポフェリチンは、N-サブユニットおよびC-サブユニット、例えば、全長フェリチンを実質的に半分に分割することによって得られるN-サブユニットおよびC-サブユニットに分割されてもよく、その結果、各サブユニットは、その後の自己組織化のために異なるSARS-CoV-2結合部分または生物活性部分に別々に結合してナノケージモノマーになり、次いでナノケージになり得る。各サブユニットは、いくつかの態様では、同じまたは異なる両方の末端でSARS-CoV-2結合部分および/または生物活性部分に結合し得る。「官能性ナノケージモノマー」とは、ナノケージモノマーが他のこのようなモノマーと自己組織化して本明細書に記載のナノケージになることができることを意図する。

【0137】

「フェリチン」および「アポフェリチン」という用語は、本明細書では互換的に使用され、一般に、典型的には24個のタンパク質サブユニットを含むフェリチン複合体に組織化することができるポリペプチド（例えば、フェリチン鎖）を指す。フェリチンは任意の種に由来し得ることが理解されるであろう。典型的には、フェリチンはヒトフェリチンで

10

20

30

40

50

ある。いくつかの実施形態では、フェリチンは野生型フェリチンである。例えば、フェリチンは、野生型ヒトフェリチンであってもよい。いくつかの実施形態では、フェリチン軽鎖がナノケージモノマーとして使用され、および／またはフェリチン軽鎖のサブユニットがナノケージモノマーサブユニットとして使用される。いくつかの実施形態では、組織化されたナノケージは、フェリチン重鎖、または鉄に結合することができる他のフェリチン成分を含まない。

【 0 1 3 8 】

本明細書で使用される「多重特異性」という用語は、少なくとも2つの異なる結合パートナー、例えば抗原または受容体（例えば、Fc受容体）が結合することができる少なくとも2つの結合部位を有する特徴を指す。例えば、少なくとも2つのFab断片を含み、2つのFab断片の各々が異なる抗原に結合するナノケージは、「多重特異性」である。更なる例として、Fc断片（Fc受容体に結合することができる）およびFab断片（抗原に結合することができる）を含むナノケージは、「多重特異性」である。

10

【 0 1 3 9 】

本明細書で使用される「多価」という用語は、結合パートナー、例えば抗原または受容体（例えば、Fc受容体）が結合することができる少なくとも2つの結合部位を有するという特徴を指す。少なくとも2つの結合部位に結合することができる結合パートナーは、同じであっても異なっていてもよい。

【 0 1 4 0 】

本明細書で使用される「免疫グロブリン」（Ig）とも当技術分野で呼ばれる「抗体」という用語は、対になったポリペプチド重鎖および軽鎖から構築されたタンパク質を指す：IgA、IgD、IgE、IgG、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、およびIgG₄、ならびにIgMを含む様々なIgアイソタイプが存在する。抗体は、ヒト、マウス、ラット、サル、ラマ、またはサメを含む任意の種に由来し得ることが理解されるであろう。抗体が正しく折り畳まれると、各鎖は、より線状のポリペプチド配列によって連結されたいくつかの異なる球状ドメインに折り畳まれる。例えば、IgGの場合、免疫グロブリン軽鎖は、可変（V_L）ドメインおよび定常（C_L）ドメインに折り畳まれ、重鎖は、可変（V_H）ドメインおよび3つの定常（C_H、C_H₂、C_H₃）ドメインに折り畳まれる。重鎖および軽鎖可変ドメイン（V_HおよびV_L）の相互作用は、抗原結合領域（Fab）の形成をもたらす。各ドメインは、当業者によく知られている十分に確立された構造を有する。

20

30

【 0 1 4 1 】

軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、標的抗原の結合に関与し、したがって、抗体間で有意な配列多様性を示すことができる。定常領域は、より少ない配列多様性を示し、重要な免疫学的イベントを誘発するためにいくつかの天然タンパク質に結合する役割を果たす。抗体の可変領域は、分子の抗原結合決定基を含み、したがって、その標的抗原に対する抗体の特異性を決定する。配列多様性の大部分は、6つの超可変領域（可変重鎖および可変軽鎖当たり各々3つ）で起こり、超可変領域が組み合わさって抗原結合部位を形成し、抗原決定基の結合および認識に寄与する。その抗原に対する抗体の特異性およびアフィニティーは、超可変領域の構造、ならびにそれらが抗原に提示する表面のサイズ、形状および化学特性によって決定される。

40

【 0 1 4 2 】

本明細書で言及される「抗体断片」は、当技術分野で公知の任意の適切な抗原結合抗体断片を含み得る。抗体断片は、天然に存在する抗体断片であってもよく、または天然に存在する抗体の操作によって、または組換え方法を使用することによって得られてもよい。例えば、抗体断片は、Fab、一本鎖Fab（scFab；ペプチドリンカーと結合したV_LおよびV_Hからなる分子）、Fc、一本鎖Fc、Fab、一本鎖Fab、F(ab')₂、單一ドメイン抗体（sdAb；單一のV_LまたはV_Hから構成される断片）、およびこれらのいずれかの多価提示を含み得るが、これらに限定されない。

【 0 1 4 3 】

50

本明細書で使用される「合成抗体」という用語は、組換えDNA技術を使用して生成される抗体を意味する。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成によって生成され、そのDNA分子が抗体タンパク質を発現する抗体、または抗体を特定するアミノ酸配列を意味すると解釈されるべきであり、DNAまたはアミノ酸配列は、利用可能でありかつ当技術分野で周知の合成DNAまたはアミノ酸配列技術を使用して得られたものである。

【0144】

「エピトープ」という用語は、抗原決定基を指す。エピトープは、抗原性である、すなわち特異的免疫応答を誘発する分子上の特定の化学基またはペプチド配列である。抗体は、例えばポリペプチド上の特定の抗原性エピトープに特異的に結合する。エピトープは、連続したアミノ酸から形成される場合と、タンパク質の三次折り畳みによって並置された非連続のアミノ酸から形成される場合の両方がある。隣接するアミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒への曝露時に保持されるが、三次折り畳みによって形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒での処理時に失われる。エピトープは、典型的には、固有の空間的立体構造で少なくとも3個、より一般的には少なくとも5個、約9個、約11個、または約8～約12個のアミノ酸を含む。エピトープの空間的立体構造を決定する方法には、例えば、X線結晶学および2次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、*Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)* を参照のこと。

10

20

30

【0145】

本明細書で使用される「抗原」という用語は、免疫応答を誘発する分子として定義される。この免疫応答は、抗体産生、または特定の免疫担当細胞の活性化、またはその両方を含み得る。当業者は、実質的にすべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として役立ち得ることを理解するであろう。さらに、抗原は、組換えDNAまたはゲノムDNAに由来し得る。したがって、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAは、その用語が本明細書で使用される場合、「抗原」をコードすることを当業者は理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要はないことを理解するであろう。本明細書に記載の態様は、2つ以上の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含むが、これらに限定されないこと、およびこれらのヌクレオチド配列を様々な組み合わせで配置して所望の免疫応答を誘発できることは容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要は全くないことを理解するであろう。抗原が合成され得るか、または生物学的試料に由来し得ることは容易に明らかである。そのような生物学的試料は、組織試料、細胞、または生物学的流体を含むことができるが、これらに限定されない。

40

【0146】

「コードする」とは、定義されたヌクレオチドの配列（例えば、rRNA、tRNAおよびmRNA）または定義されたアミノ酸の配列のいずれかを有する生物学的プロセスにおける他のポリマーおよび高分子の合成のためのテンプレートとして働く、遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性、ならびにそれから生じる生物学的特性を指す。したがって、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が細胞または他の生物系においてタンパク質を产生する場合、その遺伝子はタンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通常は配列表に提供されるコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のための鑄型として使用される非コード鎖との両方を、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードすると言うことができる。

50

【0147】

本明細書で使用される「発現」という用語は、そのプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳として定義される。

50

【 0 1 4 8 】

「単離された」は、天然状態から変更または除去されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然で存在する核酸またはペプチドは「単離された」ものではないが、その天然状態の共存物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離された」ものである。単離された核酸もしくはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在し得るか、または例えば宿主細胞などの非天然環境に存在し得る。

【 0 1 4 9 】

特に明記しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いに縮重バージョンであり、同じアミノ酸配列をコードするすべてのヌクレオチド配列を含む。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列があるバージョンではイントロンを含み得る程度にイントロンを含み得る。

10

【 0 1 5 0 】

本明細書で使用される「調節する」という用語は、処置または化合物の非存在下での対象における応答のレベルと比較して、および／または他の点では同一であるが未処置の対象における応答のレベルと比較して、対象における応答のレベルの検出可能な増加または減少を媒介することを意味する。この用語は、天然のシグナルまたは応答を搅乱および／または影響させ、それによって対照、典型的にはヒトにおいて有益な治療応答を媒介することを包含する。

20

【 0 1 5 1 】

「作動可能に連結された」という用語は、調節配列と異種核酸配列との間の機能的連結を指し、後者の発現をもたらす。例えば、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的関係にある場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列と動作可能に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列に動作可能に連結されている。一般に、作動可能に連結されたDNA配列は連続しており、2つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合、同じ読み枠内にある。

20

【 0 1 5 2 】

組成物の「非経口」投与には、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、または胸骨内注射もしくは注入技術が含まれる。吸入および鼻腔内投与も含まれる。

30

【 0 1 5 3 】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖として定義される。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で使用される核酸およびポリヌクレオチドは互換性がある。当業者は、核酸が、モノマー「ヌクレオチド」に加水分解され得るポリヌクレオチドであるという一般的な知識を有する。モノマーヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解され得る。本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチドには、限定するものではないが、組換え手段、すなわち、通常のクローニング技術およびPCRなどを使用した組換えライプラリまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングを含むがこれらに限定されない当技術分野で利用可能な任意の手段によって、および合成手段によって得られるすべての核酸配列が含まれる。

40

【 0 1 5 4 】

本明細書で使用される場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は互換的に使用され、ペプチド結合によって共有結合したアミノ酸残基から構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質またはペプチドの配列を含むことができるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、ペプチド結合によって互いに結合した2つもしくはそれを超えるアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を含む。本明細書で使用される場合、この用語は、例えば、当技術分野で一般にペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも呼ばれる短鎖と、当技術分野で一般にタンパク質と呼ばれる長鎖との両方を指し、それらには多くの種類が存在する。「ポリペプチド」には、例えば、とりわけ、生物

50

学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドのバリエント、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0155】

抗体に関して本明細書で使用される「特異的に結合する」という用語は、特定の抗原を認識するが、試料中の他の分子を実質的に認識または結合しない抗体を意味する。例えば、1つの種からの抗原に特異的に結合する抗体は、1つまたはそれを超える種からのその抗原にも結合し得る。しかしながら、そのような交差種反応性は、それ自体抗体の特異的な分類を変更しない。別の例では、抗原に特異的に結合する抗体は、抗原の異なる対立遺伝子型にも結合し得る。しかしながら、そのような交差反応性は、それ自体抗体の特異的な分類を変更しない。いくつかの例では、「特異的結合」または「特異的に」という用語は、抗体、タンパク質、またはペプチドと第2の化学種との相互作用に関して使用することができ、相互作用が化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味し、例えば、抗体は、一般にタンパク質ではなく特定のタンパク質構造を認識して結合する。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識された「A」および抗体を含有する反応において、エピトープAを含有する分子（または遊離の非標識A）の存在は、抗体に結合した標識されたAの量を減少させる。

10

【0156】

「治療有効量」、「有効量」または「十分な量」という用語は、哺乳動物、例えばヒトを含む対象に投与した場合、所望の結果を達成するのに十分な量、例えば防御免疫応答を引き起こすのに有効な量を意味する。本明細書に記載の有効量の化合物は、対象の分子、年齢、性別、種および体重などの要因によって異なり得る。当業者によって理解されるように、投与量または処置レジメンは、最適な治療応答を提供するように調整され得る。例えば、本明細書に記載の治療有効量の融合タンパク質の投与は、いくつかの態様では、COVID-19を処置および／または予防するのに十分である。

20

【0157】

さらに、治療有効量を用いた対象の処置レジメンは、単回投与からなるか、または代替的に一連の適用を含み得る。処置期間の頻度および長さは、分子、対象の年齢、薬剤の濃度、薬剤に対する患者の応答性、またはそれらの組み合わせなどの様々な要因に依存する。処置に使用される薬剤の有効投与量は、特定の処置レジメンの経過にわたって増加または減少し得ることも理解されるであろう。投与量の変化は、当技術分野で公知の標準的な診断アッセイによって生じ、明らかになり得る。本明細書に記載の融合タンパク質は、いくつかの態様では、問題となっている疾患または障害のための従来の治療による処置の前、間または後に投与されてもよい。例えば、本明細書に記載の融合タンパク質は、ウイルス感染症のための従来の処置と組み合わせて特定の用途を見出すことができる。

30

【0158】

本明細書で使用される「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸でトランスフェクト、形質転換または形質導入されたものである。細胞は、初代対象細胞およびその子孫を含む。

40

【0159】

「転写制御下」または「作動可能に連結される」という語句は、本明細書で使用される場合、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するために、ポリヌクレオチドに対して正しい位置および向きにあることを意味する。

【0160】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、単離された核酸を細胞の内部に送達するため使用することができる組成物である。線状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性

50

化合物に関するポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを含むがこれらに限定されない多数のベクターが当技術分野で公知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律複製プラスミドまたはウイルスを含む。この用語はまた、例えば、ポリリジン化合物、リポソームなどの、細胞への核酸の移入を促進する非プラスミドおよび非ウイルス化合物を含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例としては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0161】

1つまたはそれを超える更なる治療薬「と組み合わせた」投与には、任意の順序での同時（並行）および連続投与が含まれる。

10

【0162】

「薬学的に許容され得る」という用語は、化合物または化合物の組み合わせが医薬用途の製剤の残りの成分と適合性であり、米国食品医薬品局によって公布されたものを含む確立された政府基準に従ってヒトに投与するのが一般に安全であることを意味する。

【0163】

「薬学的に許容され得る担体」という用語は、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤および／または吸収遅延剤などを含むが、これらに限定されない。薬学的に許容され得る担体の使用は周知である。

【0164】

「バリアント」は、比較配列内の1つもしくはそれを超えるアミノ酸残基の挿入、欠失、修飾および／または置換によって比較配列とは異なるアミノ酸配列を有する生物学的に活性な融合タンパク質、抗体またはそれらの断片である。バリアントは、一般に、比較配列と100%未満の配列同一性を有する。しかしながら、通常、生物学的に活性なバリアントは、比較配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性、例えば少なくとも約71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するであろう。バリアントは、比較配列の生物学的活性のある程度のレベルを保持する少なくとも10個のアミノ酸のペプチド断片を含む。バリアントはまた、1つもしくはそれを超えるアミノ酸残基が比較配列のN末端もしくはC末端に、または比較配列内に付加されているポリペプチドを含む。バリアントはまた、多数のアミノ酸残基が欠失されている、および／または1つもしくはそれを超えるアミノ酸残基によって必要に応じて置換されているポリペプチドを含む。バリアントはまた、例えば天然に存在するアミノ酸以外の部分での置換によって、またはアミノ酸残基を修飾して非天然に存在するアミノ酸を産生することによって共有結合的に修飾され得る。

20

30

40

【0165】

「パーセントアミノ酸配列同一性」は、本明細書では、最大パーセント配列同一性を達成するために配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後、任意の保存的置換を配列同一性の一部として考慮せずに、本発明のポリペプチドなどの目的の配列中の残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。候補配列へのN末端、C末端、または内部伸長、欠失または挿入のいずれも、配列同一性または相同性に影響を及ぼすと解釈されるべきではない。アラインメントのための方法およびコンピュータプログラムは、「BLAST」など、当技術分野で周知である。

【0166】

本明細書の目的のための「活性な」または「活性」は、本明細書に記載の融合タンパク質の生物学的および／または免疫学的活性を指し、「生物学的」活性は、融合タンパク質によって引き起こされる生物学的機能（阻害性または刺激性のいずれか）を指す。

【0167】

本明細書に記載の融合タンパク質は、修飾を含み得る。そのような修飾としては、限定されないが、エフェクター分子へのコンジュゲーションが挙げられる。修飾にはさらに、

50

検出可能なレポーター部分へのコンジュゲーションが含まれるが、これに限定されない。半減期を延長する修飾（例えば、ペグ化）も含まれる。脱免疫化のための修飾も含まれる。タンパク質および非タンパク質剤は、当技術分野で公知の方法によって融合タンパク質にコンジュゲートされ得る。コンジュゲーション方法には、直接連結、共有結合したリンカーを介した連結、および特異的結合対メンバー（例えば、アビシン・ビオチン）が含まれる。そのような方法としては、例えば、Greenfieldら、Cancer Research 50, 6600 - 6607 (1990)（これは参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているもの、およびAmonら、Adv. Exp. Med. Biol. 303, 79 - 90 (1991) およびKiselevaら、Mol. Biol. (USSR) 25, 508 - 514 (1991)（いずれも参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

10

【0168】

2 融合タンパク質

融合タンパク質が本明細書に記載される。融合タンパク質は、SARS-CoV-2 結合部分に連結されたナノケージモノマーを含む。複数の融合タンパク質が自己組織化してナノケージを形成する。このようにして、SARS-CoV-2 結合部分は、組織化されたナノケージの内面、組織化されたナノケージの外側、またはその両方を装飾し得る。

【0169】

SARS-CoV-2 結合部分は、典型的には抗体またはその断片であり、SARS-CoV-2 ウィルスの任意の部分を標的とすることができるが、典型的には SARS-CoV-2 S 糖タンパク質を標的とする。SARS-CoV-2 結合部分は、抗体またはその断片である必要はなく、例えばウィルスまたはウィルス中の RBD ドメインに結合してこれを遮断するタンパク質などの分子であってもよいことが理解されるであろう。

20

【0170】

抗体またはその断片は、例えば、Fab 断片の重鎖および / または軽鎖を含み得ることが理解されるであろう。抗体またはその断片は、例えば、scFab 断片、scFv 断片、sdAb 断片、および / または VHH 領域を含み得る。本明細書に記載の融合タンパク質には、任意の抗体またはその断片が使用され得ることが理解されるであろう。

【0171】

一般に、本明細書に記載の融合タンパク質は、Fab 軽鎖および / または重鎖と会合しており、Fab 軽鎖および / または重鎖は、融合タンパク質とは別個にまたは隣接して產生され得る。

30

【0172】

例えば、SARS-CoV-2 結合部分は、一本鎖可変ドメイン VHH - 72、BD2 3 および / または 4A8 を含み得る。代替的に、または追加的に、SARS-CoV-2 結合部分は、本明細書中の表 4 に列挙される mAb のいずれか 1 つまたは組み合わせから選択され得る。例えば、SARS-CoV-2 結合部分は、表 4 からの mAb 298、324、46、80、52、82 および 236 のいずれか 1 つまたは組み合わせから選択され得る。

40

【0173】

特定の態様では、本明細書に記載のナノケージモノマーをサブユニットに分割して、より多くの SARS-CoV-2 結合部分または他の部分を様々な比でそれに結合させることができる。例えば、いくつかの態様では、ナノケージモノマーは、SARS-CoV-2 結合部分に連結された第 1 のナノケージモノマーサブユニットを含む。使用時に、第 1 のナノケージモノマーサブユニットは、第 2 のナノケージモノマーサブユニットと自己組織化してナノケージモノマーを形成する。上述のように、複数のナノケージモノマーは自己組織化してナノケージを形成する。ナノケージモノマーサブユニットは、単独でまたは組み合わせて提供されてもよく、それに融合された同じまたは異なる SARS-CoV-2 結合部分を有してもよい。

【0174】

50

本明細書に記載のナノケージモノマーおよび／またはナノケージモノマーサブユニットから作製されたナノケージは、1つもしくはそれを超えるSARS-CoV-2結合部分に加えて含まれる生物活性部分を有し得る。

【0175】

例えば、生物活性部分は、例えば、Fc断片の一方または両方の鎖を含み得る。Fc断片は、理解されるように任意のタイプの抗体に由来し得るが、典型的にはIgG1 Fc断片である。Fc断片は、融合タンパク質および／または融合タンパク質を含む得られた組織化されたナノケージの半減期および／またはエフェクター機能を調節する、LS、YTE、LALA、I253A、および／またはLALAPなどの1つもしくはそれを超える突然変異をさらに含み得る。例えば、半減期は、数分、数日、数週間、または数ヶ月のスケールであってもよい。

10

【0176】

さらに、Fc配列修飾および他の薬剤（例えば、ヒト血清アルブミンペプチド配列）の添加を含む、本明細書に記載の融合タンパク質およびナノケージにおける他の置換が企図され、これらはバイオアベイラビリティーの変化を可能にし、当業者によって理解されるであろう。さらに、本明細書に記載の融合タンパク質およびナノケージは、免疫原性および抗薬物応答を弱めるために、配列においてまたは他の薬剤の添加によって調節することができる（治療的に、例えば、宿主に配列を合わせる、または免疫抑制療法を加える〔例えば、関節リウマチの処置のためにインフリキシマブを投与する際のメトレキサートまたはFVIIICに対する阻害剤の発生率を低下させる際の主要な戦略である新生児面期寛容の誘導など（Di Michele DM, Hoots WK, Pipe SW, Rivard GE, Santagostino E. International workshop on immune tolerance induction: consensus recommendations. Haemophilia. 2007; 13: 1-22に概説されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる〕）。

20

【0177】

特定の実施形態では、断片結晶化可能（Fc）領域は、I253A突然変異を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、LALAP（L234A/L235A/P329G）突然変異をさらに含む。特に明記しない限り、本開示全体にわたる突然変異の番号付けは、EUインデックスに従う。

30

【0178】

いくつかの実施形態では、Fc領域はIgG1 Fc領域（例えば、ヒトIgG1 Fc領域）であり、すなわち、本明細書に記載の突然変異を除いて、Fc領域は、各々が野生型IgG1 Fc内の鎖のアミノ酸配列と実質的に同様のアミノ酸配列を有するFc鎖を含む。いくつかの実施形態では、野生型参照IgG1 FcはヒトIgG1 Fcであり、各Fc鎖は配列番号24のアミノ酸配列を有する。

【0179】

例えば、IgG1 Fc領域は、野生型IgG1 Fc内のFc鎖のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも87.5%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するFc鎖を含み得る。いくつかの実施形態では、IgG1 Fc領域は、そのIgG1 Fc領域について具体的に記載されるFc突然変異を含むFc鎖を含むが、そうでなければ野生型IgG1 Fc内のFc鎖と100%同一であるアミノ酸配列を有する。

40

【0180】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、共有結合性リンカーによって、例えばアミノ酸リンカーを介して互いに連結された2本のFc鎖を含む一本鎖Fc（scFc）である。いくつかの実施形態では、Fc領域は、単一のFc鎖を含むFcモノマーである。

【0181】

抗体またはその断片が2本の鎖、例えばFc断片の場合は第1および第2の鎖、または

50

重鎖および軽鎖を含む場合、2本の鎖はリンカーによって必要に応じて分離されてもよい。リンカーは、可撓性または剛性であり得るが、典型的には、鎖を適切に折り畳むことができるよう可撓性である。リンカーは、一般に、融合タンパク質にある程度の可撓性を付与するのに十分な長さであるが、リンカーの長さは、ナノケージモノマーおよび生物活性部分の配列ならびに融合タンパク質の三次元構造に応じて変化することが理解されるであろう。したがって、リンカーは、典型的には約1～約130アミノ酸残基、例えば約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、または125～約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125または130アミノ酸残基、例えば約50～約90アミノ酸残基、例えば70アミノ酸残基である。

〔 0 1 8 2 〕

リンカーは、任意のアミノ酸配列のものであり得、1つの典型的な例では、リンカーは、GGSリピートを含み、より典型的には、リンカーは、約2、3、4、5または6つのGGSリピート、例えば約4つのGGSリピートを含む。特定の様態では、リンカーは、以下と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる：

【化 5】

【 0 1 8 3 】

特定の実施形態では、リンカーは、融合ポリペプチド内および／または s c F c などの一本鎖分子内で使用される。いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸リンカーである。例えば、本明細書で使用されるリンカーは、約 1 ~ 約 1 0 0 アミノ酸残基、例えば約 1 ~ 約 7 0 、約 2 ~ 約 7 0 、約 1 ~ 約 3 0 、または約 2 ~ 約 3 0 アミノ酸残基を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも 2 、少なくとも 3 、少なくとも 4 、少なくとも 5 、少なくとも 6 、少なくとも 7 、少なくとも 8 、少なくとも 9 、または少なくとも 1 0 個のアミノ酸残基を含む。

【 0 1 8 4 】

特定の実施形態では、リンカーは、リンカー内に少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、または少なくとも 14 コピー存在するグリシン - セリン配列、例えば、(G_nS)_m配列（例えば、GGGS、GGGS または GGGGS 配列）を含む。

【 0 1 8 5 】

典型的な態様では、抗体またはその断片は、SARS-CoV-2に関連する抗原に特異的に結合する。典型的には、抗原はSARS-CoV-2と会合し、抗体またはその断片は、例えば表4からの結合ドメイン、例えば結合ドメイン298、52、46、80、82、236、324またはそれらの組み合わせを含む。

【 0 1 8 6 】

特定の実施形態では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、SARS-CoV-2の受容体結合ドメイン（RBD）に結合することができる。特定の実施形態では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質（タンパク質）に結合することができる。いくつかの実施形態では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、SARS-CoV-2のタンパク質のN末端ドメイン（NTD）に結合することができる。

【 0 1 8 7 】

いくつかの実施形態では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、重鎖可変領域（例えば、V_HまたはV_{HH}）を含む。特定の実施形態では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、重鎖可変ドメイン（例えば、V_H）および軽鎖可変ドメイン（例えば、V_LまたはV_K）を含む。特定の実施形態では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、重鎖可変ドメイン（例えば、V_H）および軽鎖可変ドメイン（例えば、V_LまたはV_K）を含むFabを含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、V_H重鎖可変ドメインおよびV_K軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、SARS-CoV-2結合抗体断片は、V_H重鎖可変ドメインおよびV_K軽鎖可変ドメインを含むFabを含む。
10

【0189】

特定の例では、抗体またはその断片は、以下の配列の1つもしくはそれを超えるものと少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる：

【化6】

Fc鎖1:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVLHEALHSYTQKSLSLSPGK;

20

Fc鎖2:

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVLHEALHSYTQKSLSLSPGK;

30

298 軽鎖
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ

30

40

50

【化7】

LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

298 Fab 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTTNY
LAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASFPRDDIAGGYWGQGTDTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

52 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYASSLESGVPSRF
SGSGSGTDFTLISSLQPEDFATYYCQQNGFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

10

52 Fab 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTTNY
AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRGTDIDYWGQGTDTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

20

46 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSWLAZYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF
SGSGSGTDFTLISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTGPGTKVDIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEV
HQGLSSPVTKSFNRGEC

46 Fab 重鎖

EVQLLESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIYSGGSTYYA
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSRDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

80 軽鎖

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGTDFTLISSLQAEDVAVYYCQQYYSAPLTGGGTKVEIKRTVAAPSVIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

80 Fab 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFNRYAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANY
AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTRELPEVVDWYFDLWGRGTLTVSSAST
KGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

40

82 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQVISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLISSLQPEDFATYYCQQSFSPPPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTAS

50

【化8】

VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

82 Fab 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGSFSTSAFYWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTN
YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEPLLSEDTAVYYCARSRALYGSGSYFDYWQGQTLTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10

236 軽鎖

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

236 Fab 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFTSYGINWVRQAPGQGLEWMGMNPNSGNT
GYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEPLLSEDTAVYYCASRGIQLLPRGMDVWGQGTTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

20

324 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSITTYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

324 Fab 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFNNYGISWVRQAPGQGLEWMGMNPNSGNT
GYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEPLLSEDTAVYYCARVGDYGDYIVSPFDLWGRGTLTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

30

またはそれらの組み合わせ。

【0190】

更なる態様では、抗体またはその断片は、検出可能部分（例えば、小分子、蛍光分子、放射性同位体、もしくは磁性粒子）、医薬品、診断薬、またはそれらの組み合わせなどの更なる部分にコンジュゲートまたは会合し、例えば抗体-薬物コンジュゲートを含み得る。

40

【0191】

生物活性部分が検出可能な部分である態様では、検出可能な部分は、GFP、EGFP、アメトリンなどの蛍光タンパク質、および/またはiLOVなどのLOVタンパク質などのフラビンベースの蛍光タンパク質を含み得る。

【0192】

生物活性部分が医薬品である態様では、医薬品は、例えば、小分子、ペプチド、脂質、炭水化物、または毒素を含み得る。

【0193】

典型的な態様では、本明細書に記載の融合タンパク質から構築されたナノケージは、約3~100ナノケージモノマー、例えば約3、4、5、6、7、8、9、10、12、1

50

4、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40
 、42、44、46、48、50、52、55、56、58、60、62、64、66、
 68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、9
 4、96、または98～約4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、2
 0、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46
 、48、50、52、55、56、58、60、62、64、66、68、70、72、
 74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、ま
 たは100ナノケージモノマー、例えば24、32、または60モノマーを含み得る。
 ナノケージモノマーは、任意の既知のナノケージモノマー、天然、合成、または部分的に
 合成であり得、いくつかの態様では、フェリチン、アポフェリチン、エンカプセリン、S
 O R、ルマジンシンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、カルボキシソーム、ウォール
 トタンパク質、G r o E L、熱ショックタンパク質、E 2 P、M S 2 コートタンパク質、
 それらの断片、およびそれらのバリエントから選択される。典型的には、ナノケージモノ
 マーは、フェリチンまたはアポフェリチンである。

【0194】

アポフェリチンがナノケージモノマーとして選択される場合、典型的には、第1および
 第2のナノケージモノマーサブユニットは、交換可能にアポフェリチンの「N」および「
 C」領域を含む。他のナノケージモノマーは、本明細書に記載のアポフェリチンとよく似
 た二成分サブユニットに分割することができ、その結果、サブユニットは自己組織化し、
 各々が生物活性部分と融合しやすいことが理解されるであろう。

【0195】

いくつかの実施形態では、ナノケージモノマーは、フェリチンモノマーである。「フェ
 リチンモノマー」という用語は、本明細書では、他のフェリチン鎖の存在下で、複数のフ
 ェリチン鎖を含むポリペプチド複合体に自己組織化することができるフェリチンの一本鎖
 を指すために使用される。いくつかの実施形態では、フェリチン鎖は、24個またはそれを超
 えるフェリチン鎖を含むポリペプチド複合体に自己組織化した。いくつかの実施形態
 では、フェリチンモノマーは、フェリチン軽鎖である。いくつかの実施形態では、フェリ
 チンモノマーは、フェリチン重鎖、または鉄に結合することができる他のフェリチン成分
 を含まない。

【0196】

いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体中の各融合ポリペプチドは、
 フェリチン軽鎖またはフェリチン軽鎖のサブユニットを含む。これらの実施形態では、自己
 組織化ポリペプチド複合体は、フェリチン重鎖またはフェリチン重鎖のサブユニットを
 含まない。

【0197】

いくつかの実施形態では、フェリチンモノマーは、ヒトフェリチン鎖、例えばヒトフェ
 リチン軽鎖、例えば配列番号1の少なくとも残基2～175の配列を有するヒトフェリチ
 ヌ軽鎖である。いくつかの実施形態では、フェリチンモノマーは、マウスフェリチン鎖で
 ある。

【0198】

フェリチンモノマーの「サブユニット」とは、フェリチンモノマーの別の異なるサブユ
 ニットと自発的に会合することができ、その結果、サブユニットが一緒にになってフェリチ
 ヌモノマーを形成することができるフェリチンモノマーの部分を指し、フェリチンモノマ
 ーはまた、他のフェリチンモノマーと自己組織化してポリペプチド複合体を形成するこ
 とができる。

【0199】

いくつかの実施形態では、フェリチンモノマーサブユニットは、フェリチンモノマーの
 約半分を含む。本明細書で使用される場合、「N - ハーフフェリチン (C - h a l f f
 e r r i t i n)」という用語は、フェリチン鎖の約半分を指し、半分はフェリチン鎖の
 N末端を含む。本明細書で使用される場合、「C - ハーフフェリチン」という用語は、フ

10

20

30

40

50

エリチン鎖の約半分を指し、半分はフェリチン鎖のC末端を含む。N-ハーフフェリチンとC-ハーフフェリチンとを形成するためにフェリチン鎖が分割され得る正確な点は、実施形態によって異なり得る。ヒトフェリチン軽鎖に基づくフェリチンモノマーサブユニットの文脈では、例えば、半分は、配列番号1の約75位～約100位の位置に対応する点で分割され得る。例えば、いくつかの実施形態では、ヒトフェリチン軽鎖に基づくN-ハーフフェリチンは、配列番号1の残基1～95（またはそのかなりの部分）に対応するアミノ酸配列を有し、ヒトフェリチン軽鎖に基づくC-ハーフフェリチンは、配列番号1の残基96～175（またはそのかなりの部分）に対応するアミノ酸配列を有する。

【0200】

いくつかの実施形態では、半分は、配列番号1の約85位～約92位の位置に対応する点で分割される。例えば、いくつかの実施形態では、ヒトフェリチン軽鎖に基づくN-ハーフフェリチンは、配列番号1の残基1～90（またはそのかなりの部分）に対応するアミノ酸配列を有し、ヒトフェリチン軽鎖に基づくC-ハーフフェリチンは、配列番号1の残基91～175（またはそのかなりの部分）に対応するアミノ酸配列を有する。

【0201】

典型的には、アポフェリチンの「N」領域は、以下と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる：

【化9】

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLQLQASYTYLSGFYFDRDDVALEGVSFFRELAEKREG
YERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW.

10

20

30

40

50

【0202】

典型的には、アポフェリチンの「C」領域は、以下と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる：

【化10】

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNL
HRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

または

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKKMGDHLTNL
HRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD.

【0203】

いくつかの態様では、本明細書に記載の融合タンパク質は、上記のリンカーとよく似て、ナノケージモノマーサブユニットと生物活性部分との間にリンカーをさらに含む。この場合も、リンカーは可撓性または剛性であり得るが、典型的には、生物活性部分が活性を保持することを可能にし、ナノケージモノマーサブユニットの対が自己組織化特性を保持することを可能にするために可撓性である。リンカーは、一般に、融合タンパク質にある程度の可撓性を付与するのに十分な長さであるが、リンカーの長さは、ナノケージモノマーおよび生物活性部分の配列ならびに融合タンパク質の三次元構造に応じて変化することが理解されるであろう。したがって、リンカーは、典型的には約1～約30アミノ酸残基、例えば約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29～約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30アミノ酸残基、例えば約8～約16アミノ酸残基、例えば8、10または12アミノ酸残基である。

【0204】

リンカーは、任意のアミノ酸配列のものであり得、1つの典型的な例では、リンカーは、GGSリピートを含み、より典型的には、リンカーは、約2、3、4、5または6つのGGSリピート、例えば約4つのGGSリピートを含む。特定の態様では、リンカーは、以下と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる：

【化11】

GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG

【0205】

同様に、融合タンパク質は、融合タンパク質の1つまたはそれを超える属性を改善するためのC末端リンカーをさらに含み得る。いくつかの態様では、リンカーは、GGSリピートを含み、より典型的には、リンカーは約2、3、4、5または6つのGGSリピート、例えば約4つのGGSリピートを含む。特定の態様では、C末端リンカーは、以下と少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一の配列を含むかまたはこれからなる：

【化12】

GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSG

【0206】

上記の融合タンパク質の対であって、自己組織化してナノケージモノマーを形成し、第1および第2のナノケージモノマーサブユニットが異なるSARS-CoV-2結合部分に融合している対も本明細書に記載される。これは、サブユニットの対から構築された単一のナノケージモノマーに多価性および/または多重特異性を提供する。

【0207】

実質的に同一の配列は、1つまたはそれを超える保存的アミノ酸突然変異を含み得る。参照配列に対する1つまたはそれを超える保存的アミノ酸突然変異が、参照配列と比較して生理学的、化学的または機能的特性に実質的な変化がない突然変異ペプチドをもたらし得ることは、当技術分野で公知である。そのような場合、参照配列および突然変異配列は「実質的に同一」ポリペプチドと見なされるであろう。保存的アミノ酸突然変異は、アミノ酸の付加、欠失または置換を含み得る。保存的アミノ酸置換は、本明細書では、類似の化学的特性（例えば、サイズ、電荷、または極性）を有する別のアミノ酸残基に対するアミノ酸残基の置換として定義される。

【0208】

非限定的な例では、保存的突然変異はアミノ酸置換であり得る。そのような保存的アミノ酸置換は、塩基性、中性、疎水性または酸性アミノ酸を同じ基の別のものと置換し得る。「塩基性アミノ酸」という用語は、7を超える側鎖pK値を有する親水性アミノ酸を意味し、これは典型的には生理学的pHで正に帯電している。塩基性アミノ酸には、ヒスチジン（HisまたはH）、アルギニン（ArgまたはR）、およびリジン（LysまたはK）が含まれる。「中性アミノ酸」（「極性アミノ酸」とも）という用語は、生理学的pHでは帯電していないが、2つの原子によって共通して共有される電子対が原子の1つによってより密接に保持される少なくとも1つの結合を有する側鎖を有する親水性アミノ酸を意味する。極性アミノ酸には、セリン（SerまたはS）、トレオニン（ThrまたはT）、システイン（CysまたはC）、チロシン（TyrまたはY）、アスパラギン（AsnまたはN）およびグルタミン（GlnまたはQ）が含まれる。「疎水性アミノ酸」（「非極性アミノ酸」とも）という用語は、Eisenberg (1984) の正規化コンセンサス疎水性スケールに従って0より大きい疎水性を示すアミノ酸を含むことを意味する。疎水性アミノ酸には、プロリン（ProまたはP）、イソロイシン（IleまたはI）、フェニルアラニン（PheまたはF）、バリン（ValまたはV）、ロイシン（LeuまたはL）、トリプトファン（TrpまたはW）、メチオニン（MetまたはM）、ア

10

20

30

40

50

ラニン (A 1 a または A) およびグリシン (G 1 y または G) が含まれる。

【0209】

「酸性アミノ酸」は、7未満の側鎖pK値を有する親水性アミノ酸を指し、これは典型的には生理学的pHで負に帯電している。酸性アミノ酸には、グルタミン酸 (GluまたはE) およびアスパラギン酸 (AspまたはD) が含まれる。

【0210】

配列同一性は、2つの配列の類似性を評価するために使用される。2つの配列が残基位置間の最大対応関係についてアライメントされたときに同じである残基のパーセントを計算することによって決定される。任意の既知の方法を使用して配列同一性を計算することができる。例えば、コンピュータソフトウェアが配列同一性を計算するために利用可能である。限定することを望むものではないが、配列同一性は、Swiss Institute of Bioinformaticsによって維持されるNCBI BLAST 2サービス（および、ca.expasy.org/tools/blast/に見られるような）、BLAST-P、blast-N、もしくはFASTA-Nなどのソフトウェア、または当技術分野で公知の任意の他の適切なソフトウェアによって計算することができる。

10

【0211】

本発明の実質的に同一の配列は、少なくとも85%同一であり得る。別の例では、実質的に同一の配列は、本明細書に記載の配列とアミノ酸レベルで少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98、99、または100%（もしくはその間の任意のパーセンテージ）同一であり得る。特定の態様では、実質的に同一の配列は、参照配列の活性および特異性を保持する。非限定的な実施形態では、配列同一性の差は、保存的アミノ酸突然変異に起因し得る。

20

【0212】

本発明のポリペプチドまたは融合タンパク質はまた、それらの発現、検出または精製を助けるための更なる配列を含み得る。当業者に公知の任意のそのような配列またはタグを使用することができる。例えば、限定することを望まないが、融合タンパク質は、ターティング配列もしくはシグナル配列（例えば、これに限定されないが、ompA）、検出タグ、Strepタグを含む例示的なタグカセット、またはそれらの任意のバリエント：例えば、米国特許第7,981,632号を参照のこと、Hisタグ、配列モチーフDYKD-DDDKを有するFlagタグ、Xpressタグ、Aviタグ、カルモジュリンタグ、ポリグルタメートタグ、HAタグ、Mycタグ、Nusタグ、Sタグ、SBPタグ、Softag 1、Softag 3、V5タグ、CREB結合タンパク質(CBP)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、チオレドキシンタグ、またはそれらの任意の組み合わせ；精製タグ（例えば、これに限定されないが、His5もしくはHis6）、またはそれらの組み合わせを含み得る。

30

【0213】

別の例では、追加の配列は、国際公開第95/04069号のCronanら、または国際公開第2004/076670号のVogesらによって記載されているようなビオチン認識部位であり得る。当業者にも知られているように、リンカー配列は、追加の配列またはタグと共に使用され得る。

40

【0214】

より具体的には、タグカセットは、高いアフィニティーまたはアビディティで抗体に特異的に結合することができる細胞外成分を含み得る。一本鎖融合タンパク質構造内では、タグカセットは、(a)コネクタ領域のすぐアミノ末端に、(b)リンカーモジュールの間に介在し、リンカーモジュールを接続して、(c)結合ドメインのすぐカルボキシ末端に、(d)結合ドメイン（例えば、scFvもしくはscFab）の間に介在し、エフェクタードメインに接続して、(e)結合ドメインのサブユニットの間に介在し、結合ドメインのサブユニットを接続して、または(f)一本鎖融合タンパク質のアミノ末端に配置

50

され得る。特定の実施形態では、1つまたはそれを超える接合アミノ酸は、タグカセットと疎水性部分との間に配置され、タグカセットと疎水性部分とを接続するか、タグカセットとコネクタ領域との間に配置され、タグカセットとコネクタ領域とを接続するか、タグカセットとリンカーモジュールとの間に配置され、タグカセットとリンカーモジュールとを接続するか、タグカセットと結合ドメインとの間に配置され、タグカセットと結合ドメインとを接続することができる。

【0215】

様々な方法論を使用して表面に固定化された単離もしくは精製融合タンパク質、ポリペプチド、またはそれらの断片も本明細書に包含される。例えば、限定することを望まないが、ポリペプチドは、His - タグカップリング、ビオチン結合、共有結合、吸着などを介して表面に連結またはカップリングされ得る。固体表面は、任意の適切な表面、例えば、限定されないが、マイクロタイタープレートのウェル表面、表面プラズモン共鳴(SPR)センサチップのチャネル、膜、ビーズ(例えば磁気ベースもしくはセファロースベースのビーズもしくは他のクロマトグラフィー樹脂)、ガラス、フィルム、または任意の他の有用な表面であり得る。

10

【0216】

他の態様では、融合タンパク質は、カーゴ分子に連結され得る。融合タンパク質は、カーゴ分子を所望の部位に送達し得、当技術分野で公知の任意の方法(組換え技術、化学的コンジュゲーション、キレート化など)を用いてカーゴ分子に連結され得る。カーゴ分子は、治療薬または診断薬などの任意のタイプの分子であり得る。

20

【0217】

いくつかの態様では、カーゴ分子はタンパク質であり、カーゴ分子がナノケージの内部に含まれるように融合タンパク質に融合される。他の態様では、カーゴ分子は融合タンパク質に融合されず、ナノケージの内部に含まれる。カーゴ分子は、典型的には、タンパク質、小分子、放射性同位体または磁性粒子である。

20

【0218】

本明細書に記載の融合タンパク質は、それらの標的に特異的に結合する。本明細書に記載の抗体または断片の、抗原の特定のエピトープに対する抗体の選択的認識を指す抗体特異性は、アフィニティーおよび/またはアビディティに基づいて決定することができる。アフィニティーは、抗原と抗体(K_D)との解離の平衡定数によって表され、抗原決定基(エピトープ)と抗体結合部位との間の結合強度を測定する。アビディティは、抗体とその抗原との結合の強さの尺度である。抗体は、典型的には、 $10^{-5} \sim 10^{-11}$ Mの K_D で結合する。 10^{-4} Mを超える任意の K_D は、一般に、非特異的結合を示すと見なされる。 K_D の値が小さいほど、抗原決定基と抗体結合部位との結合強度が強くなる。いくつかの態様では、本明細書に記載の抗体は、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、 10^{-14} M、または 10^{-15} M未満の K_D を有する。

30

【0219】

本明細書に記載の少なくとも1つの融合タンパク質と、融合タンパク質と自己組織化してナノケージモノマーを形成する少なくとも1つの第2のナノケージモノマーサブユニットとを含むナノケージも本明細書に記載される。さらに、融合タンパク質の対が本明細書に記載されており、この対は自己組織化してナノケージモノマーを形成し、第1および第2のナノケージモノマーサブユニットは異なる生物活性部分に融合されている。

40

【0220】

ナノケージは、複数の同一の融合タンパク質、複数の異なる融合タンパク質(したがって、多価および/または多重特異性である)、融合タンパク質と野生型タンパク質との組み合わせ、およびそれらの任意の組み合わせから自己組織化し得ることが理解されるであろう。例えば、ナノケージは、少なくとも1つの抗SAR-CoV-2抗体と組み合わせて、本明細書に記載の融合タンパク質の少なくとも1つで内部および/または外部で装飾され得る。典型的な態様では、ナノケージモノマーの約20%～約80%が、本明細書に

50

記載の融合タンパク質を含む。本明細書に記載のモジュール式ソリューションを考慮すると、ナノケージは、理論的には、各ナノケージモノマーが2つのサブユニットに分割され得、その各々が異なる生物活性部分に独立して結合することができるため、ナノケージ内にモノマーが存在する数の最大2倍の生物活性部分を含むことができる。このモジュール性を利用して、4つの異なる生物活性部分の4：2：1：1比に対する特定の例で本明細書に記載の生物活性部分の任意の所望の比を達成できることができることが理解されるであろう。例えば、本明細書に記載のナノケージは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の異なる生物活性部分を含み得る。このようにして、ナノケージは多価および/または多重特異性であり得、この程度は比較的容易に制御され得る。

【0221】

10

いくつかの態様では、本明細書に記載のナノケージは、ナノケージモノマーサブユニットに連結されているものとして本明細書に記載の生物活性部分と同じであっても異なっていてもよい生物活性部分に必要に応じて融合した少なくとも1つの全ナノケージモノマーをさらに含み得る。

【0222】

20

典型的な態様では、本明細書に記載のナノケージは、サブユニットまたはモノマーに対する第1、第2、および第3の融合タンパク質と、必要に応じて生物活性部分に融合された、必要に応じて少なくとも1つの全ナノケージモノマーとを含み、第1、第2、および第3の融合タンパク質の生物活性部分、ならびに全ナノケージモノマーの生物活性部分はすべて互いに異なる。

【0223】

30

より典型的には、第1、第2および第3の融合タンパク質は各々、N-ハーフまたはC-ハーフフェリチンに融合した抗体またはそのFc断片を含み、第1、第2および第3の融合タンパク質の少なくとも1つはN-ハーフフェリチンに融合し、第1、第2および第3の融合タンパク質の少なくとも1つはC-ハーフフェリチンに融合する。例えば、第1の融合タンパク質の抗体またはその断片は、典型的にはFc断片である。第2および第3の融合タンパク質は、典型的には各々、SARS-CoV-2などのウイルスの異なる抗原に特異的な抗体またはその断片を含み、全ナノケージモノマーは、SARS-CoV-2などの同じウイルスであってもよい別の異なる抗原に特異的な生物活性部分に融合される。

【0224】

いくつかの態様では、第2の融合タンパク質の抗体またはその断片は、46または52であり、第3の融合タンパク質の抗体またはその断片は、324または80である。典型的な態様では、本明細書に記載のナノケージは、必要に応じて4：2：1：1の比で、以下の4つの融合タンパク質を含む：

- a . 全長フェリチンに融合した298 (sc298であってもよい) ;
- b . N - フェリチンに融合したFc (scFcであってもよい) ;
- c . C - フェリチンに融合した46または52 (sc46またはsc52であってもよい) ; および
- d . C - フェリチンに融合した324または80 (sc324またはsc80であってもよい) 。

【0225】

40

いくつかの態様では、本明細書に記載のナノケージは、以下の配列の1つもしくはそれを超えるものと少なくとも70%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%）同一の配列を含むかまたはこれからなり、フェリチンサブユニットは太字であり、リンカーは下線であり、軽鎖はイタリック体であり、重鎖は小文字である：

50

【化13】

a. 298-hFerr:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFS
 TYGISWVRQAPGQGLEWMWISPNSSGTDLAQKFQGRVTMTRDTSTTVYMELSSLRSEDTAVYY
 CASDPRDDIAGGYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDD
VALEGVSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKK
LNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTL
RHD

10

または

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSQVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFS
 TYGISWVRQAPGQGLEWMWISPNSSGTDLAQKFQGRVTMTRDTSTTVYMELSSLRSEDTAVYY
 CASDPRDDIAGGYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
SSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDV

20

30

40

50

【化14】

ALEGVSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKL
NQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLR
HD

b. Fc-N-hFerr LALAP I253A

DKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKSKAKGQP
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
RWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSSGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGG
GGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGG
FPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKSKAKGQP
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
SLSPGKGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGG
MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYT
YSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEW

10

c1. 52-C-hFerr

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYASSLESGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNGFPLTFPGPTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGG
GGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGG
VRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTNTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTV
TIDYWQGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSSGGGGSSGG
GGGGSSGGGGSSGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL
IKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

20

c2. 46-C-hFerr

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSWLA
YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPTKV
DIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
VVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEHKVYACEV
HQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGG
GGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGRSRLSCAASGFTFSSYAMSW
RQAPGKGLEWVSTIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YCAR GDSRDA
FDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSSGGGGSSGG
GGGGSSGGGGSSGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKL
IKKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

30

d1. 324-C-hFerr

40

50

【化 1 5】

10

d2. 80-C-hFerr

20

【 0 2 2 6 】

一様では、本明細書に開示される複数の融合ポリペプチドを含む自己組織化ポリペプチド複合体が提供される。多くの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、(1)複数の第1の融合ポリペプチドであって、各第1の融合ポリペプチドは、本明細書に開示されるナノケージモノマー(例えばフェリチンモノマー、例えばヒトフェリチンモノマー、またはそのサブユニット)に連結されたFc領域を含む、複数の第1の融合ポリペプチドと、(2)複数の第2の融合ポリペプチドであって、各第2の融合ポリペプチドは、SARS-CoV-2結合抗体断片(例えば、SARS-CoV-2タンパク質(例えば、スパイクタンパク質または受容体結合ドメイン(RBD))に結合することができる抗体のFab断片)を含み、SARS-CoV-2結合抗体断片は、ナノケージモノマー(例えばフェリチンモノマー、例えばヒトフェリチンモノマー)またはそのサブユニットに連結されている、複数の第2の融合ポリペプチドと、を含む。いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、複数の第3の融合ポリペプチドをさらに含み、各第3の融合ポリペプチドは、第2の融合ポリペプチドとは異なり、各々が(1)(2)SARS-CoV-2結合抗体断片(例えば、SARS-CoV-2タンパク質に結合することができる抗体のFab断片)に連結されたナノケージモノマー(例えばフェリチンモノマー、例えばヒトフェリチンモノマー)を含む。

30

[0 2 2 7]

いくつかの実施形態では、融合ポリペプチドの1つ（例えば、第1の融合ポリペプチドまたは第2の融合ポリペプチド）は、N-ハーフナノケージモノマー（例えば、N-ハーフフェリチン）（全長ナノケージ（例えば、フェリチン）モノマーではない）を含み、他の融合ポリペプチドの1つは、C-ハーフナノケージモノマー（例えば、Cハーフフェリ

チソ）（全長ナノケージ（例えば、フェリチソ）モノマーではない）を含む。これらの実施形態の多くでは、自己組織化ポリペプチド複合体中のN-ハーフナノケージモノマー（例えば、N-ハーフフェリチソ）を含む融合ポリペプチドとC-ハーフナノケージモノマー（例えば、Cハーフフェリチソ）を含む融合ポリペプチドとの比は、約1：1である。

【0228】

いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、24の融合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、24を超える融合ポリペプチド、例えば、少なくとも26、少なくとも28、少なくとも30、少なくとも32の融合ポリペプチド、少なくとも34の融合ポリペプチド、少なくとも36の融合ポリペプチド、少なくとも38の融合ポリペプチド、少なくとも40の融合ポリペプチド、少なくとも42の融合ポリペプチド、少なくとも44の融合ポリペプチド、少なくとも46の融合ポリペプチド、または少なくとも48の融合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、32の融合ポリペプチドを含む。

10

【0229】

いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、または少なくとも8の第1の融合ポリペプチドを含む。

【0230】

いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、または少なくとも8の第2の融合ポリペプチドを含む。

20

【0231】

いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16の第3の融合ポリペプチドをさらに含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、約1：1、1：2、1：3または1：4の第1の融合ポリペプチド対他のすべての融合ポリペプチドの比を含む。

30

【0233】

いくつかの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体中の各融合ポリペプチドは、フェリチソ軽鎖またはフェリチソ軽鎖のサブユニットを含む。これらの実施形態では、自己組織化ポリペプチド複合体は、フェリチソ重鎖、フェリチソ重鎖のサブユニット、または鉄に結合することができる他のフェリチソ成分を含まない。

【0234】

治療用または予防用組成物などのナノケージを含む組成物も本明細書に記載される。COVID-19を処置および/または予防するための関連する方法および使用も記載され、この方法または使用は、処置および/または予防を必要とする対象に本明細書に記載のナノケージまたは組成物を投与することを含む。

40

【0235】

本明細書に記載の融合タンパク質およびポリペプチドをコードする核酸分子、ならびに核酸分子を含むベクターおよびベクターを含む宿主細胞も本明細書に記載される。

【0236】

本明細書に記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの核酸配列と実質的に同じ核酸配列を有するポリヌクレオチドを含む。「実質的に同じ」核酸配列は、本明細書では、2つの配列が（適切なヌクレオチド挿入または欠失を用いて）最適にアライメントされ、2つの配列間のヌクレオチドの正確な一致を決定するために比較される場合、別の核酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%の同一性を有する

50

配列として定義される。

【0237】

抗体の断片をコードするポリヌクレオチドの適切な供給源には、全長抗体を発現する任意の細胞、例えばハイブリドーマおよび脾臓細胞が含まれる。断片は、抗体等価物として単独で使用されてもよいし、上記のように等価物に再結合されてもよい。このセクションに記載されるDNAの欠失および組換えは、公知の方法、例えば、上記の「Functional Equivalents of Antibodies」と題されたセクションに列挙された公開特許出願に記載される方法、および/または他の標準的な組換えDNA技術、例えば、以下に記載されるものによって行われ得る。DNAの別の供給源は、当技術分野で公知のように、ファージディスプレイライブラリから產生される一本鎖抗体である。10

【0238】

さらに、発現配列、プロモーターおよびエンハンサー配列に作動可能に連結された前述のポリヌクレオチド配列を含有する発現ベクターが提供される。原核生物、例えば細菌および真核生物系（酵母および哺乳動物細胞培養系を含むがこれらに限定されない）における抗体ポリペプチドの効率的な合成のための様々な発現ベクターが開発されている。本発明のベクターは、染色体、非染色体および合成DNA配列のセグメントを含むことができる。

【0239】

任意の適切な発現ベクターを使用することができる。例えば、原核生物クローニングベクターには、*E. coli*（大腸菌）由来のプラスミド、例えば`c o l E 1`、`p C R 1`、`p B R 3 2 2`、`p M B 9`、`p U C`、`p K S M`および`R P 4`が含まれる。原核生物ベクターはまた、`M 1 3`および他の糸状一本鎖DNAファージなどのファージDNAの誘導体を含む。酵母において有用なベクターの例は、 2μ プラスミドである。哺乳動物細胞における発現のための適切なベクターには、`S V - 4 0`、アデノウイルス、レトロウイルス由来DNA配列の周知の誘導体、および機能性哺乳動物ベクター（例えば、上記のもの）と機能性プラスミドおよびファージDNAとの組み合わせに由来するシャトルベクターが含まれる。

【0240】

更なる真核生物発現ベクターは当技術分野で公知である（例えば、*P. J. S ou t h e r n & P. B e r g*, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 327-341 (1982) ; *S u b r a m a n i a l a, M o l. C e l l. B i o l.*, 1: 854-864 (1981) ; *K a u f i n a n n & S h a r p*, 「A m p l i f i c a t i o n A n d E x p r e s s i o n o f S e q u e n c e s C o t r a n s f e c t e d w i t h a M o d u l a r D i h y d r o f o l o a t e R e d u c t a s e C o m p l e m e n t a r y D N A G e n e」, *J. M o l. B i o l.*, 159: 601-621 (1982) ; *K a u f h i a n n & S h a r p*, *M o l. C e l l. B i o l.*, 159: 601-664 (1982) ; *S c a h i l l a l a, 「E x p r e s s i o n A n d C h a r a c t e r i z a t i o n O f T h e P r o d u c t O f A H u m a n I m m u n e I n t e r f e r o n D N A G e n e I n C h i n e s e H a m s t e r O v a r y C e l l s」, P r o c. N a t' l A c a d. S c i U S A*, 80: 4654-4659 (1983) ; *U r l a u b & C h a s i n*, *P r o c. N a t' l A c a d. S c i U S A*, 77: 4216-4220, (1980) であって、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる）。

【0241】

発現ベクターは、典型的には、発現されるDNA配列または断片に作動可能に連結された少なくとも1つの発現制御配列を含む。クローン化DNA配列の発現を制御および調節するために、制御配列をベクターに挿入する。有用な発現制御配列の例は、`l a c`系、`t r p`系、`t a c`系、`t r c`系、ファージラムダの主要なオペレーターおよびプロモーター領域、`f d`コートタンパク質の制御領域、酵母の解糖プロモーター、例えば`3 - H o s t o g`50

リセリン酸キナーゼのプロモーター、酵母酸性ホスファターゼのプロモーター、例えば P h o 5 、酵母アルファ - 接合因子のプロモーター、ならびにポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルスおよびシミアンウイルスに由来するプロモーター、例えば、初期および後期プロモーターまたは S V 4 0 、ならびに原核細胞または真核細胞の遺伝子およびそれらのウイルスまたはそれらの組み合わせの発現を制御することが知られている他の配列である。

【 0 2 4 2 】

前述の発現ベクターを含む組換え宿主細胞も本明細書に記載される。本明細書に記載の融合タンパク質は、ハイブリドーマ以外の細胞株で発現され得る。本発明によるポリペプチドをコードする配列を含む核酸は、適切な哺乳動物宿主細胞の形質転換に使用することができる。10

【 0 2 4 3 】

特に好ましい細胞株は、高レベルの発現、目的のタンパク質の構成的発現、および宿主タンパク質からの最小限の汚染に基づいて選択される。発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は当技術分野で周知であり、多くの不死化細胞株、例えば、限定されないが、H E K 2 9 3 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、ベビーハムスター腎臓 (B H K) 細胞などが挙げられる。適切な更なる真核細胞には、酵母および他の真菌が含まれる。有用な原核生物宿主には、例えば、大腸菌、例えば大腸菌 S G - 9 3 6 、大腸菌 H B 1 0 1 、大腸菌 W 3 1 1 0 、大腸菌 X 1 7 7 6 、大腸菌 X 2 2 8 2 、大腸菌 D H I 、および大腸菌 M R C 1 、 P s e u d o m o n a s 、 B a c i l l u s 、例えば B a c i l l u s s u b t i l i s (枯草菌) および S t r e p t o m y c e s が含まれる。20

【 0 2 4 4 】

これらの本組換え宿主細胞は、ポリペプチドの発現を可能にする条件下で細胞を培養し、宿主細胞または宿主細胞を取り囲む培地からポリペプチドを精製することによって融合タンパク質を産生するために使用することができる。組換え宿主細胞における分泌のための発現ポリペプチドのターゲティングは、目的の抗体コード遺伝子の 5 ' 末端にシグナルまたは分泌リーダーペプチドコード配列を挿入することによって促進することができる (Shokriら、(2 0 0 3) A p p l M i c r o b i o l B i o t e c h n o l . 6 0 (6) : 6 5 4 - 6 6 4 、 N i e l s e n ら、 P r o t . E n g . , 1 0 : 1 - 6 (1 9 9 7) ; v o n H e i n j e ら、 N u c l . A c i d s R e s . , 1 4 : 4 6 8 3 - 4 6 9 0 (1 9 8 6) 、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる) 。これらの分泌リーダーペプチドエレメントは、原核生物配列または真核生物配列のいずれかに由来し得る。したがって、適切には、宿主細胞サイトゾルからのポリペプチドの移動および培地への分泌を指示するためにポリペプチドの N 末端に結合したアミノ酸である分泌リーダーペプチドが使用される。30

【 0 2 4 5 】

本明細書に記載の融合タンパク質は、追加のアミノ酸残基に融合することができる。そのようなアミノ酸残基は、例えば、単離を容易にするためのペプチドタグであり得る。抗体を特定の器官または組織にホーミングするための他のアミノ酸残基も企図される。40

【 0 2 4 6 】

H C - フェリチンと L C との同時トランスフェクションによって F a b - ナノケージを生成できることが理解されるであろう。あるいは、図 1 C に示すように、1 つのプラスミドのトランスフェクションのみを必要とする単鎖 F a b - フェリチンナノケージを使用することもできる。これは、 L C と H C との間の異なる長さのリンカー、例えば 6 0 または 7 0 アミノ酸を用いて行うことができる。単鎖 F a b を使用する場合、重鎖と軽鎖とが対になっていることを確実にすることができる。タグ (例えば、 F l a g 、 H A 、 m y c 、 H i s 6 x 、 S t r e p など) はまた、上記のように精製を容易にするために、コンストラクトの N 末端またはリンカー内に付加することができる。さらに、タグシステムを使用して、異なる F a b ナノ粒子プラスミドを同時トランスフェクトする場合、連続 / 付加ア
50

フィニティークロマトグラフィーステップを使用して、同じナノ粒子上に多くの異なる F a b が存在することを確実にすることができます。これは、ナノ粒子に多重特異性を提供する。プロテアーゼ部位（例えば、T E V、3 Cなど）は、必要に応じて、発現および／または精製後にリンカーおよびタグを切断するために挿入することができる。

【0247】

本明細書に記載の融合タンパク質を投与するために、任意の適切な方法または経路を使用することができる。投与経路には、例えば、経口、静脈内、腹腔内、皮下または筋肉内投与が含まれる。

【0248】

本明細書に記載の融合タンパク質は、予防または処置の目的で哺乳動物に使用される場合、薬学的に許容され得る担体をさらに含む組成物の形態で投与されることが理解される。適切な薬学的に許容され得る担体には、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせの1つまたはそれを超えるものが含まれる。薬学的に許容され得る担体は、結合タンパク質の貯蔵寿命または有効性を高める、湿潤剤または乳化剤、保存剤または緩衝剤などの少量の補助物質をさらに含み得る。注射の組成物は、当技術分野で周知のように、哺乳動物への投与後に有効成分の迅速な、持続的なまたは遅延的な放出を提供するように製剤化され得る。

【0249】

ヒト抗体はヒトへの投与に特に有用であるが、他の哺乳動物にも投与することができる。本明細書で使用される「哺乳動物」という用語は、ヒト、実験動物、家庭用ペットおよび家畜を含むことが意図されているが、これらに限定されない。

【0250】

一様では、一般に、本開示の自己組織化ポリペプチド複合体を含む組成物を対象に投与するステップを含む、S A R - C o V - 2 関連症状を処置、改善、または予防するのに有用であり得る方法が提供される。

【0251】

「S A R - C o V - 2 関連症状」は、S A R S - C o V - 2 の感染に関連する症状（例えば、症候または徵候）を指す。いくつかの実施形態では、症状は、対象（例えば、本明細書に開示されるような自己組織化ポリペプチド複合体を投与される対象）からの試料中のS A R S - C o V - 2 RNA、タンパク質、またはウイルス粒子のレベルであり、そのレベルはS A R S - C o V - 2 感染（例えば、レベルが閾値を満たすか、またはS A R S - C o V - 2 感染を示す基準レベルを超えるため）を示す。いくつかの実施形態では、症状は、C O V I D - 1 9 病に関連する症候、例えば、発熱、咳、疲労、息切れもしくは呼吸困難、筋肉痛、悪寒、喉の痛み、鼻水、頭痛、胸痛、結膜炎、吐き気、嘔吐、下痢、嗅覚喪失、味覚喪失、または脳卒中）である。いくつかの実施形態では、症状は、C O V I D - 1 9 病の下流の続発症に関連し、および／または長期C O V I D - 1 9 病の症状である。

【0252】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物、例えばヒトである。

【0253】

対象への投与のための組成物は、一般に、本明細書に開示される自己組織化ポリペプチド複合体を含む。いくつかの実施形態では、そのような組成物は、薬学的に許容され得る賦形剤をさらに含む。

【0254】

組成物は、全身経路（例えば、経口、静脈内、腹腔内、皮下、または筋肉内投与）を含む様々な投与経路のいずれかのための投与のために製剤化され得る。

【0255】

上記の開示は、本発明を一般的に説明している。以下の具体例を参照することにより、より完全な理解を得ることができる。これらの例は、例示のみを目的として提供されてお

10

20

30

40

50

り、特に明記しない限り、限定することを意図しない。したがって、本発明は、決して以下の実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになる、ありとあらゆる変形例を包含すると解釈されるべきである。

【0256】

以下の実施例は、ベクターおよびプラスミドの構築、そのようなベクターおよびプラスミドへのポリペプチドをコードする遺伝子の挿入、または宿主細胞へのプラスミドの導入に使用されるものなど、従来の方法の詳細な説明を含まない。そのような方法は当業者に周知であり、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを含む多数の刊行物に記載されており、これは参考により本明細書に組み込まれる。
10

【0257】

更なる説明がなければ、当業者は、前述の説明および以下の例示的な実施例を使用して、本発明の化合物を作製および利用し、特許請求される方法を実施することができると考えられる。したがって、以下の実施例は、本発明の典型的な態様を具体的に指摘しており、決して本開示の残りの部分を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0258】

実施例1：SARS-CoV-2抗体を超強力な中和剤に変換する多価性

この実施例は、アポフェリチンとの融合タンパク質の設計、発現、精製および特性評価について説明する。アポフェリチンプロトマーは、24個の同一のポリペプチドで構成される約6nmの流体力学半径(R_h)を有する八面体対称構造に自己組織化する。各アポフェリチンサブユニットのN末端は球形ナノケージの外側を指し、したがって目的のタンパク質の遺伝子融合に利用可能である。折り畳み時に、アポフェリチンプロトマーが、アポフェリチン末端に融合された24個のタンパク質の多量体化を駆動する構成要素として作用するように、融合タンパク質を設計した。
20

【0259】

要約

COVID-19の原因ウイルスであるSARS-CoV-2は、世界的なパンデミックを引き起こしている。抗体は、ウイルス感染と戦うための強力な生物治療薬であり得る。ここで、本発明者らは、ヒトアポフェリチンプロトマーをモジュラーサブユニットとして使用して、抗体断片のオリゴマー化を促進し、SARS-CoV-2を標的とする抗体を非常に強力な中和剤に変換する。このプラットフォームを使用して、 $9 \times 10^{-14} M$ という低い50%阻害濃度(IC₅₀)値が、対応するIgGと比較して最大10,000倍の力価増強の結果として達成される。3つの異なる抗体特異性と、単一の多価分子上の断片結晶化可能(Fc)ドメインとの組み合わせは、顕著な力価およびIgG様バイオアベイラビリティーと共にウイルス配列多様性を克服する能力を付与した。したがって、多重特異性、多重親和性抗体(MultobodyまたはMB)プラットフォームは、多重特異性と共に結合アビティを独自に活用して、SARS-CoV-2に対して超強力かつ広範な中和剤を送達する。プラットフォームのモジュール性はまた、世界的に健康上重要な他の感染症に対する迅速な評価にも関連する。中和抗体は、SARS-CoV-2の有望な治療薬である。
30
40

【0260】

導入部

新規なSARS-CoV-2などの呼吸器系ウイルスによる公衆衛生への継続的な脅威は、パンデミックに対抗するための予防的および治療的介入を迅速に開発および展開する緊急の必要性を強調している。モノクローナル抗体(mAb)は、高リスク乳児¹における呼吸器合胞体ウイルスの予防のためのパリビズマブまたはエボラ²の処置のためのZmapp、mAb114およびREGN-EB3によって例示されるように、感染症の処置

に有效地に使用されてきた。その結果、SARS-CoV-2のスパイク(S)タンパク質を標的とするmAbが、COVID-19に対する生物医学的対策の開発の焦点となってきた。現在までに、Sタンパク質を標的とするいくつかの抗体が同定されており^{3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19}、バムラニビマブは、2020年11月にSARS-CoV-2の緊急処置のために米国食品医薬品局(FDA)によって承認された最初の抗体である。細胞移入²⁰のための受容体であるアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)への結合を妨害する受容体結合ドメイン(RBD)指向mAbは、通常、最も高い中和能に関連する^{6, 18, 19}。

【0261】

mAbは、感染ドナー、免疫化動物からのB細胞選別によって、または予め組み立てられたライプラリ中のバインダーを同定することによって単離することができる。これらの方法論はウイルス特異的mAbの発見のために頑強で信頼性があるにもかかわらず、最良の抗体クローニングの同定は通常、時間コストの不利益を伴う。さらに、RNAウイルスはDNAウイルスよりも高い突然変異率を有し、そのような突然変異は中和抗体の力価を著しく変化させ得る。実際、いくつかの研究は、回復期血清からの中和力価および特定のmAb^{21, 22, 23}の耐性の低下を、より最近のSARS-CoV-2のB.1.1.7²⁴、B.1.351²⁵およびB.1.1.28^{26, 27}バリエントに対して既に示している。したがって、抗体発見と、ウイルス配列多様性の影響を受けにくい非常に強力な中和剤の迅速な同定および展開とを橋渡しするプラットフォームの開発が求められている。

10

20

30

【0262】

抗体の力価は、そのエピトープ^{28, 29, 30}と複数回同時に相互作用するその能力によって大きく影響される。アビディティとして知られるこの増強された見かけのアフィニティーは、SARS-CoV-2に対するナノボディ^{31, 32}およびIgGのFab^{8, 10, 16}を超える中和力価を増加させることができが以前に報告されている。結合アビディティの全能力を活用するために、本発明者らは、ヒトアポフェリチンプロトマーをモジュラーサブユニットとして使用して抗体断片を多量体化し、mAbをSARS-CoV-2に対する超強力中和剤へと発展させる抗体スカフォールド技術を開発した。実際、得られたMultabody分子は、対応するIgGに対して力価を最大4桁増加させることができる。さらに、本発明者らは、スパイクにおける点突然変異をより良好に克服するために3つの異なるFab特異性を組み合わせるこの技術の能力を実証する。Multabodyは、SARS-CoV-2に対するmAbの抗ウイルス特性を高めるための多用途のIgG様「プラグアンドプレイ」プラットフォームを提供し、ウイルス病原体に対して活用される機構としてのアビディティの能力を実証する。

【0263】

材料および方法

タンパク質の発現および精製

VHH-ヒトアポフェリチン融合物、Fc融合物、Fab、IgGおよびRBD突然変異体をコードする遺伝子を合成し、GeneArt(Life Technologies社)によってpcDNA3.4発現ベクターにクローニングした。特に明記しない限り、FectoPRO(Polyplus Transfections社)を1:1の比で使用して、細胞200mL当たり50μgのDNAを含む0.8×10⁶細胞/mLの密度で、すべてのコンストラクトをHEK 293 F細胞(Thermo Fisher Scientific社)中で一過性発現させた。Multitron Proシェーカー(Infors HT社)中、37、8%CO₂、および湿度70%で125rpmの振動で6~7日間インキュベートした後、細胞懸濁液を5000×gで15分間の遠心分離によって回収し、上清を0.22μmのSteri-topフィルター(EMD Millipore社)で濾過した。FabおよびIgGを、90μgのLCおよびHCを1:2の比で同時トランスフェクトすることによって一過性発現させ、Kappaselectアフィニティカラム(GE Healthcare社)およびHiTrap

40

50

Protein A HPカラム(GE Healthcare社)を使用して精製し、溶出緩衝液として100 mMグリシンpH 2.2をそれぞれ用いた。溶出した分画を直ちに1 M Tris-HCl(pH 9.0)で中和し、Superdex 200 Increaseサイズ排除カラム(GE Healthcare社)を用いてさらに精製した。ACE2およびVHH-72のFc融合物をIgGと同じ方法で精製した。VHH-72アポフェリチン融合物を、HiTrap Phenyl HPカラムを使用する疎水性相互作用クロマトグラフィーによって精製し、溶出分画を、20 mMリン酸ナトリウムpH 8.0、150 mM NaCl中のSuperose 6 10/300 GLサイズ排除カラム(GE Healthcare社)上にロードした。マウスおよびヒト由来の野生型RBD(BEINR 52309)および突然変異RBD、prefusion型のSエクトドメイン(BEINR 52394)およびFc受容体(FcRnおよびFc RI)を、HiTrap Ni-NTAカラム(GE Healthcare社)を使用して精製した。Ni-NTA精製に続いて、S三量体の場合はSuperose 6、RBDおよびFc受容体の場合はSuperdex 200 Increaseサイズ排除カラム(GE Healthcare社)を、いずれの場合も20 mMリン酸塩pH 8.0、150 mM NaCl緩衝液中で行った。

【0264】

Multabodiesの設計、発現および精製

本明細書でMultabodiesと呼ばれるすべての分子は、scFabおよびscFc断片を含有する。scFabおよびscFcポリペプチドコンストラクトを、70 アミノ酸フレキシブルリンカー[(GGGGS)_{x14}]を使用して生成して、それぞれヘテロ二量体およびホモ二量体断片を生成した。具体的には、Fab軽鎖のC末端は、リンカーを介してFab重鎖のN末端に融合される。scFcの場合、機能的ホモ二量体Fcを形成する2つの単一Fc鎖をタンデムに融合した。個々のドメインを、25アミノ酸リソカートン:(GGGGS)_{x5}を有するアポフェリチンモノマーに融合する。ヒトアポフェリチンの軽鎖の残基1~90(C-フェリチン)および91~175(N-フェリチン)を欠失させることにより、ハーフアポフェリチンに連結したscFab断片およびscFc断片をコードする遺伝子を作製した。HEK 293F細胞における多形体の一過性トランスクレクションは、66 µgのプラスミドscFab-ヒトアポフェリチン:scFc-ヒトN-フェリチン:scFab-C-フェリチンを2:1:1の比で混合することによって得た。scFab-ヒトアポフェリチンの添加は、効率的なMultobodyアセンブリを可能にし、最終分子中のFcと比較してFabの数を増加させ、したがってFcアビディティよりもFabアビディティを支持した。多重特異性Multabodiesの場合、scFab1-ヒトアポフェリチン:scFc-ヒトN-フェリチン:scFab2-C-フェリチン:scFab3-C-フェリチンの4:2:1:1の比を使用した。DNA混合物を濾過し、66 µlのFecto PROと共に室温(RT)でインキュベートした後、細胞培養物に添加した。Split Multabodiesを、20 mM Tris pH 8.0、3 M MgCl₂および10%グリセロール溶出緩衝液を含むHiTrap Protein A HPカラム(GE Healthcare社)を使用するアフィニティーコロマトグラフィーによって精製した。タンパク質を含有する分画を濃縮し、Superose 6 10/300 GLカラム(GE Healthcare社)でのゲル濾過によってさらに精製した。

【0265】

ネガティブ染色電子顕微鏡法

約0.02 mg/mLの濃度の3マイクロリットルのMultobodyを、先に空気中で15秒間グロー放電した炭素被覆銅グリッドの表面に配置し、30秒間吸着させ、3 µLの2%ギ酸ウラニルで染色した。ワットマンNo.1濾紙を使用してグリッドから過剰の染色を直ちに除去し、さらに3 µLの2%ギ酸ウラニルを20秒間添加した。グリッドは、200 kVで動作し、Orius電荷結合素子(CCD)カメラ(Gatan Inc.社)を備えたFEI Tecnai T20電子顕微鏡でイメージングした。

【0266】

バイオレイヤー干渉法

直接結合動態測定は、25でPBS pH 7.4、0.01%BSA、および0.002%Tween（登録商標）中でOctet RED 96 BLIシステム（Sartorius ForteBio社）を使用して行った。Hisタグ付きRBD、SARS-CoV-2スパイクをNi-NTA（NTA社）バイオセンサ（Sartorius ForteBio社）にロードして、0.8nmのBLIシグナル応答に達した。会合速度は、ロードしたバイオセンサを、250~8nM（Fab）、125~4nM（IgG）および16~0.5nM（MB）の二倍希釈系列を含むウェルに移すことによって測定した。解離速度は、バイオセンサを緩衝液含有ウェルに浸漬することによって測定した。各ステップの持続時間は180秒であった。分割Multabody設計におけるFcの特性評価を、上記の実験条件および濃度範囲に従って、Ni-NTA（NTA社）バイオセンサにロードしたhFc RIおよびhFcRnへの結合を測定することによって評価した。Multabodiesがエンドソームリサイクリングを受ける理論的能力を調べるために、hFcRn 2-ミクログロブリン複合体への結合を生理学的pH（7.4）およびエンドソームpH（5.6）で測定した。同様に、マウスサロゲートMBのFc特性評価を、Ni-NTA（NTA社）バイオセンサに予め固定化したmFc RIおよびmFcRnへの結合を測定することによって評価した。100~3nM（IgG）および10~0.3nM（MB）の二倍希釈系列を使用した。センソグラムの分析は、1:1適合モデルを用いてOctetソフトウェアを使用して行った。競合アッセイを2段階結合プロセスで行った。Hisタグ付きRBDをプリロードしたNi-NTAバイオセンサを、最初に一次抗体を50μg/mLで含むウェルに180秒間浸漬した。30秒間のベースライン期間の後、センサを、50μg/mLの第2の抗体を含むウェルにさらに300秒間浸漬した。すべてのインキュベーションステップを、25のPBS pH 7.4、0.01% BSAおよび0.002%Tween（登録商標）中で行った。ACE2-Fcを使用して、受容体結合部位へのmA b結合をマッピングした。

10

20

20

【0267】

動的光散乱

MultobodyのRhを、DynaPro Plate Reader III（Wyatt Technology社）を使用して動的光散乱（DLS）によって決定した。1mg/mLの濃度の約20μLのMultobodyを384ウェル黒色透明底プレート（Corning社）に添加し、25の固定温度で5秒/読み取りの持続時間で測定した。粒径決定および多分散性は、Dynamics software（Wyatt Technology社）を使用して5回の読み取りの集積から得た。

30

【0268】

凝集温度

Multabodiesおよび親IgGの凝集温度（T_{agg}）は、Unit ins trument（Unchained Labs社）を用いて決定した。試料を1.0mg/mLに濃縮し、1ずつ25~95まで温度勾配に供した。T_{agg}は、ベースラインに対して266nmの波長での静的光散乱の50%の増加が観察された温度として決定された（すなわち、微分曲線の最大値）。2つの独立した測定値の平均および標準誤差を、Unit解析ソフトウェアを使用して計算した。

40

【0269】

薬物動態および免疫原性

マウスアポフェリチン（mFerritin）の軽鎖のN末端に融合したマウスHD37（抗hCD19）IgG2aのscFab断片およびscFc断片から構成されるサロゲートMultobodyを研究に使用した。上記の手順に従って、2:1:1の比のHD37 scFab-mFerritin:Fc-mFerritin:mFerritinをトランスフェクトし、精製した。L234A、L235A、およびP329G（LALAP）突然変異をマウスIgG2a Fcコンストラクトに導入して、Multabodyを用いた。

50

body⁴⁸のエフェクター機能をサイレンシングした。21~23の温度および40~55%の湿度で12時間の明/暗サイクル(午前7時/午後7時)下で個別通気ケージに収容された、Charles River社(系統コード:027)から購入した12週齢の雄C57BL/6マウスを使用して、インビボ研究を実施した。すべての手順は、トロント大学スカボロ校のLocal Animal Care Committeeによって承認された。200μLのPBS(pH7.5)中の約5mg/kgのMultabodiesまたは対照試料(HD37一本鎖IgG-IgG1またはIgG2aサブタイプ)およびピロリ菌フェリチン(Hpフェリチン)-PfcSPマラリアペプチドの単回注射を皮下注射した。血液試料を複数の時点で採取し、血清試料をELISAによって循環抗体および抗薬物抗体のレベルについて評価した。簡潔には、96ウェルのPierce Nickel Coated Plates(Thermo Fisher社)を0.5μg/mlのHis₆x-タグ付き抗原hCD19で50μL被覆して、IgGおよびMultabodiesに対する試薬特異的標準曲線を用いて循環HD37特異的濃度を決定した。HRP-Protein A(Invitrogen社)を使用して、結合したIgG/MBのレベルを検出した(希釈率1:10,000)。抗薬物抗体の決定のために、Nunc MaxiSorpプレート(Biolegend社)を12量体HD37 scFab-mFerritinまたはHpFerritin-PfcSPマラリアペプチドでコーティングした。1:100血清希釈物を室温で1時間インキュベートし、HRP-Protein A(Invitrogen社)を二次分子としてさらに展開した(希釈1:10,000)。Synergy Neo2 Multi-Mode Assay Microplate Reader(Biotek Instruments社)を用いて、450nmでの化学発光シグナルを定量化した。

【0270】

生体内分布

8週齢の雄BALB/cマウスをThe Jackson Laboratory社から購入し、個別通気ケージに収容した。マウスを14時間明期/10時間暗期に、20~21の温度および40~60%の湿度で明け方から夕暮れまでの強度を調整し、正午に最大となるように飼育した。すべての手順は、トロント大学のLocal Animal Care Committeeによって承認された。マウスアポフェリチン軽鎖のN末端に融合したマウスHD37 IgG2aのscFabおよびscFc断片から構成されるMultabodiesをこの研究に使用した。製造業者の指示に従って、Alexa Fluor(商標)647抗体ラベリングキット(Invitrogen社)を使用して、HD37 IgG2a Multobodyまたは対照試料(HD37一本鎖IgG2a)をAlexa-647と蛍光コンジュゲートさせた。Alexa Fluor(商標)647で標識された15nm金ナノ粒子は、Creative Diagnostic社(GFLV-15)から購入した。PerkinElmer IVISスペクトル(PerkinElmer社)を使用して、非侵襲的生体内分布実験を行った。BALB/cマウスの肩のたるみに、200μLのPBS(pH7.5)中約5mg/kgのMB、HD37 IgG2a、または金ナノ粒子を皮下注射し、注射後0、1時間、6時間、24時間、2、3、4、8、および11日目にイメージングした。イメージングの前に、マウスをイソフルランと酸素との混合物を含む麻酔誘導チャンバに1分間入れた。次いで、麻酔したマウスを、IVISイメージングシステム内の内蔵加熱ドッキングシステムの中央の腹臥位に置いた(37に維持し、イソフルランと酸素との混合物を供給した)。全身2Dイメージングのために、マウスをイメージングシステム内で1~2秒間(励起640nmおよび発光680nm)イメージングした。IVISソフトウェア(IVIS用Living Image Software)を用いてデータを分析した。2D落射照明画像からの蛍光シグナルを確認した後、3×3または3×4の透過照明位置の内蔵スキャンフィールドを使用して、関心領域に対して3D透過照明蛍光イメージング断層撮影(FLITT)を行った。640nmおよび680nmの発光の励起を使用して、様々な透過照明位置で一連の2D蛍光表面放射輝度画像を撮影した。対応する位置で一連のCTスキャ

10

20

30

40

50

ンも行った。蛍光シグナルとCTスキャンとを組み合わせることによって、蛍光シグナルの3D分布マップを再構築した。得られた3D蛍光画像は、対応する身体位置で撮影したPBS注射マウスの3D画像に基づいて閾値を設定した。画像をIVISソフトウェアのrainbow LUTにマッピングし、カラースケールの上端を、金ナノ粒子を注射したマウスについては $50\text{ pmol M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ に設定し、MBおよびIgG2aを注射したマウスについては $1000\text{ pmol M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ に設定して、経時的な生体内分布のより良好な視覚化を可能にした。3D画像から試料身体位置を評価するため的一般的な指針として、IVISソフトウェアのマウス器官登録機能を使用した。

【0271】

SARS-CoV-2のRBDに対するファージライブリのパニング

10

市販のSuperHuman 2.0 Phage library (Distributed Bio社/Charles River Laboratories社)を使用して、SARS-CoV-2 RBDに対するモノクローナル抗体バインダーを同定した。この目的のために、SARS-CoV-2のRBD-Fc-AviタグコンストラクトをEXPi-293哺乳動物発現系において発現させた。その後、このタンパク質をprotein G Dynabeadsによって精製し、ビオチン化し、ビオチン化およびACE2組換えタンパク質への結合について品質管理した(Sino Biologics Inc社)。SuperHuman 2.0 Phage library (5×10^{12})を72で10分間加熱し、Protein G Dynabeads(商標)(Invitrogen社)、M-280 Streptavidin Dynabeads(商標)(Invitrogen社)、Histone from Calf Thymus(Sigma社)、Human IgG(Sigma社)およびssDNA-Biotin NNK(Integrated DNA Technologies社)およびDNA-Biotin NNK(Integrated DNA Technologies社)に対して選択を解除した。次に、ライブリを、Kingfisher FLEX(Thermofisher社)の自動化プロトコルを使用して、M-280ストレプトアビジンDynabeads(商標)によって捕捉されたRBDに対してパニングした。選択されたファージをビーズから酸溶出し、Triis-HCl pH 7.9(Teknova社)を使用して中和した。ER2738細胞を1:10の比でOD₆₀₀=0.5の中和ファージプールに感染させ、37および100rpmで40分間インキュベートした後、ファージプールを遠心分離し、抗生物質を選択した寒天上で30にて一晩インキュベートした。救済されたファージをPEGによって沈殿させ、3回の更なる固相自動化パニングに供した。PBST/1%BSA緩衝液および/またはPBS/1%BSAを、脱選択、洗浄および選択ラウンドにおいて使用した。

20

30

30

【0272】

SARS-CoV-2 RBDを用いた細菌PPEにおける抗SARS-CoV-2 scFvのスクリーニング

ファージディスプレイから選択した抗SARS-CoV-2 RBD scFvを発現させ、25でHCl 0.1Mセンサチップ(Carterra社)を備えたCarterra LSA Array SPR装置(Carterra社)でハイスループット表面プラズモン共鳴(SPR)を使用してスクリーニングした。標準的なアミンカップリングによってチップ表面に予め固定化された固定化抗V5抗体(Abcam社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州ケンブリッジ在)による捕捉を可能にするために、V5エピトープタグをscFvに附加した。簡潔には、チップ表面を、0.4M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)、0.1M N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(sNHS)および0.1M 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)pH 5.5の1:1:1(v/v/v)混合物の10分間の注入によって最初に活性化した。次いで、10mM酢酸ナトリウムpH 4.3中で調製した50μg/mlの抗V5タグ抗体を14分間カップリングさせ、10分間の注射中に過剰の反応性エステルを1M エタノールアミンHCl pH 8.5でブロックした。スクリーニン

40

50

グのために、S C F V (S C F V 当たり 1 スポット) を含有する粗細菌ペリプラズム抽出物 (P P E) を含む 384 リガンドアレイを調製した。各抽出物をランニングバッファー (10 mM HEPES pH 7.4 、 150 mM NaCl 、 3 mM EDTA および 0.01% (v/v) Tween (登録商標) - 20 (HBST)) で二倍希釈して調製し、抗 V5 表面に 15 分間印刷した。次いで、 SARS-CoV-2 RBD AviTeV His タグを、 0.5 mg/ml の BSA を補充した 10 mM HEPES pH 7.4 、 150 mM NaCl 、および 0.01% (v/v) Tween (登録商標) - 20 (HBST) 中 0 、 3.7 、 11.1 、 33.3 、 100 、 37 、および 300 nM で調製し、分析物として 15 分間の解離時間で 5 分間注入した。再生ステップは一切行わずに、試料を漸増濃度で注入した。局所参照スポットからの結合データを使用して活性スポットからシグナルを減算し、最も近いバッファーブランク分析物応答を減算してデータを二重参照した。二重参照データを、 Carterra 社の Kinetic Inspection Tool (2019 年 10 月版) の単純な 1:1 ラングミュア結合モデルに当てはめた。ファージディスプレイスクリーニングからの 20 個の中程度のアフィニティーバインダーを本研究のために選択した。

10

20

30

【 0273 】

シュードウイルスの產生および中和

HIV ベースのレンチウイルスシステム⁴⁹ をほとんど改変することなく使用して、 SARS-CoV-2 シュードタイプ化ウイルス (PsV) を生成した。簡潔には、 293T 細胞を、 Biotransfection 試薬 (Bioland Scientific 社) を使用して、製造元の説明書に従って、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (BEI NR 52516) をコードするレンチウイルス骨格、スパイク (BEI NR 52310) を発現するプラスミド、ならびに HIV 構造および調節タンパク質 Tat (BEI NR 52518) 、 Gag-pol (BEI NR 52517) および Rev (BEI NR 52519) をコードするプラスミドで同時トランスフェクトした。 37 でのトランスフェクションの 24 時間後、 5 mM 酪酸ナトリウムを培地に添加し、細胞を 30 でさらに 24 ~ 30 時間インキュベートした。 SARS-CoV-2 スパイク突然変異 D614G は D.R. Burton (The Scripps Research Institute 社) の厚意により提供され、 SARS-CoV-2 PsV バリアント B.1.351 は D.D. Ho (コロンビア大学) の厚意により提供され、残りの PsV 突然変異体は、表 1 に記載のプライマーを使用して KOD-Plus 突然変異誘発キット (東洋紡、大阪、日本) を使用して生成された。 PsV 粒子を回収し、 0.45 μm 細孔滅菌フィルターを通過させ、最後に 100K Amicon (メルクミリポアのアミコンウルトラ 2.0 遠心式フィルターユニット) を用いて濃縮した。

【 0274 】

【表 1】

表 1. プライマー配列

プライマーネーム	プライマー
N234Q_fwd	CAGATCACCGGGTTTCAGACACTGCTGGCC
N234Q_rev	GATGCCGATGGGCAGATCCACCAGGGG
L452R_fwd	CGGTACCGGCTGTTCCGGAAGTCCAATCTG
L452_rev	GTAATTGTAGTTGCCGCCGACTTTGG
A475V_fwd	GTGGGCAGCACCCCTGTAACTGGCGTGGAAAG
A475V_rev	CTGATAGATCTCGGTGGAGATGTCCC
V483A_fwd	GCCGAAGGCTTCAACTGCTACTTCCCACTGC
V483A_rev	GCCGTTACAAGGGGTGCTGCCGGCC
N439K_fwd	AAGAACCTGGACTCCAAAGTCGGCGGCAACTAC
N439K_rev	GCTGTTCCAGGCAATCACACAGCCGGTG

40

50

293T - ACE2細胞 (B E I N R 52511) およびHeLa - ACE2細胞 (D . R . Burtonの厚意により提供される；スクリプス研究所) を使用して、1サイクル中和アッセイで中和を決定した。実験前日に、細胞を $100\mu\text{l}$ 容量で $10,000$ 細胞 / ウェルの密度で播種した。293T細胞の場合、ポリ - L - リジン (Sigma - Aldrich社) でプレコーティングしたプレート。実験当日、 $50\mu\text{l}$ の連続希釈したIgGおよびMB試料を $50\mu\text{l}$ のPSVと共に37で1時間インキュベートした。1時間のインキュベーション後、インキュベートした体積を細胞に添加し、48時間インキュベートした。 $50\mu\text{l}$ のBritelite plus試薬 (PerkinElmer社) を $50\mu\text{l}$ の細胞に添加することによってPSV中和をモニターし、2分間のインキュベーション後、体積を96ウェル白色プレート (Sigma - Aldrich社) に移し、Synergy Neo2 Multi - Mode Assay Microplate Reader (Bioteck Instruments社) を使用して相対光単位 (RLU) での発光を測定した。各々2回の技術的反復実験を伴う2~3回の生物学的反復実験を行った。IC₅₀上昇率を以下のように計算した：

$$\text{IgG IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{MB IC}_{50} (\mu\text{g/mL})$$

【0275】

真正ウイルス中和

VeroE6細胞を、 100U ペニシリン、 100U ストレプトマイシン、および10%FBSを補充したDMEM中 $30,000$ /ウェルの濃度で96Fプレートに播種した。細胞をプレートに接着させ、一晩静置した。24時間後、 100U ペニシリンおよび 100U ストレプトマイシンを補充したDMEM中、96Rプレート中でIgGおよびMB試料の5倍連続希釈物を四連 ($25\mu\text{L}$ / ウェル) で調製した。約 $25\mu\text{L}$ のSARS-CoV-2/SB2-P4-PB⁵⁰クローン1を 100TCID / ウェルで各ウェルに添加し、15分ごとに振盪しながら37で1時間インキュベートした。共培養後、VeroE6プレートから培地を除去し、 $50\mu\text{L}$ の抗体 - ウイルス試料を使用して、VeroE6細胞に四連で37、5%CO₂で1時間、15分ごとに振盪しながら接種した。1時間の接種後、接種材料を除去し、 100U ペニシリン、 100U ストレプトマイシン、および2%FBSを補充した $200\mu\text{L}$ の新鮮なDMEMを各ウェルに添加した。プレートをさらに5日間インキュベートした。細胞変性効果 (CPE) をモニターし、PRISMを使用してIC₅₀値を計算した。各々4回の技術的反復実験を伴う3回の生物学的反復実験を行った。

【0276】

Fab 80、298および324によるスパイクタンパク質の架橋

約 $100\mu\text{g}$ のスパイク三量体を、 20mM HEPES pH 7.0および 150mM NaCl中2倍モル過剰のFab 80、298または324と混合した。0.075% (v/v) グルタルアルデヒド (Sigma Aldrich社) の添加によってタンパク質を架橋し、室温で120分間インキュベートした。複合体をサイズ排除クロマトグラフィー (Superose 6 Increase 10/300 GL、GE Healthcare社) によって精製し、 0.5mg/mL に濃縮し、cryo-EMグリッド調製に直接使用した。

【0277】

Fab 46 - RBD複合体の架橋

約 $100\mu\text{g}$ のFab 46を、 20mM HEPES pH 7.0および 150mM NaCl中の2倍モル過剰のRBDと混合した。複合体を0.05% (v/v) グルタルアルデヒド (Sigma Aldrich社) の添加によって架橋し、室温で45分間インキュベートした。架橋複合体をサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200 Increase 10/300 GL、GE Healthcare社) によって精製し、 2.0mg/mL に濃縮し、cryo-EMグリッド調製に直接使用した。

【0278】

Cryo-EMデータ収集および画像処理

10

20

30

40

50

使用前に P E L C O eas i G l o w (T e d P e l l a 社) を用いて空気中で 1 秒間グロー放電させた 3 マイクロリットルの試料を、インハウス^{5 1}で調製した穴を開いた金グリッド上に堆積させた。試料を、オフセット - 5 を使用して改良型 F E I M a r k I I I V i t r o b o t (4 および湿度 1 0 0 % に維持) で 6 秒間プロッティングし、続いて液体エタンとプロパンとの混合物中でプランジャー凍結した。 T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c T i t a n K r i o s G 3 電子顕微鏡および 2 5 0 フレーム / 秒の電子計数モードで動作するプロトタイプ F a l c o n 4 カメラを用いて、 3 0 0 k V でデータを取得した。動画を 9 . 6 秒間収集し、 2 9 回の露光割合、 約 5 e⁻ / p i x / s のカメラ露光速度、 および約 4 4 e⁻ / ² の総供試体露光量であった。対物アーチャは使用しなかった。ピクセルサイズは、金回折標準から 1 . 0 3 / ピクセルで較正した。顕微鏡を E P U ソフトウェアパッケージで自動化し、データ収集を c r y o S P A R C L i v e^{5 2} でモニターした。

【 0 2 7 9 】

いくつかの試料で遭遇する好ましい配向を克服するために、傾斜データ収集を使用した^{5 3}。スパイク - F a b 8 0 複合体について、 8 2 0 個の 0 ° 傾斜動画および 2 7 9 0 個の 4 0 ° 傾斜動画を収集した。スパイク - F a b 2 9 8 複合体について、 4 2 5 9 個の 0 ° 傾斜動画および 3 5 1 3 個の 4 0 ° 傾斜動画を収集した。スパイク - F a b 3 2 4 複合体について、 1 0 9 8 個の 0 ° 傾斜動画および 3 3 8 0 個の 4 0 ° 傾斜動画を収集した。 R B D - F a b 4 6 複合体について、 4 7 2 2 個の 0 ° 傾斜動画を収集した。 0 ° 傾斜した動画については、 c r y o S P A R C パッチの動き補正を行った。 4 0 ° 傾斜した動画については、 R e l i o n M o t i o n C o r r^{5 4 , 5 5} を使用した。次いで、顕微鏡写真を c r y o S P A R C にインポートし、パッチ C T F 推定を行った。 c r y o S P A R C L i v e セッション中に 2 D 分類から生成されたテンプレートを、粒子のテンプレート選択に使用した。 2 D 分類を使用してジャンク粒子画像を除去し、スパイク - F a b 8 0 複合体の 8 0 , 9 5 1 個の粒子画像、スパイク - F a b 2 9 8 複合体の 2 0 3 , 1 3 8 個の粒子画像、スパイク - F a b 3 2 4 複合体の 6 4 , 3 6 5 個の粒子画像、および R B D - F a b 4 6 複合体の 2 , 1 4 3 , 6 2 9 個の粒子画像のデータセットを得た。複数回のマルチクラス a b i n i t i o 精密化を使用して粒子画像スタックをクリーンアップし、均一精密化を使用してコンセンサス構造を得た。傾斜した粒子については、この段階で R e l i o n 内で粒子研磨を行い、 c r y o S P A R C に再インポートした。スパイク - F a b 複合体については、広範なフレキシビリティが観察された。 3 D 変動解析を行い^{5 6}、存在する異なる状態を分類するために不均一な精密化と共に使用した。次いで、粒子画像^{5 7}の最終セットに対して不均一な精密化を行った。 R B D - F a b 4 6 複合体については、 3 つのクラスを有する c r y o S P A R C a b i n i t i o 精密化を繰り返し使用して、粒子画像スタックをクリーンアップした。その後、精密化されたオイラー角を有する粒子画像スタックを再構築^{5 8}のために c i s T E Mに入れ、 4 . 0 分解能マップを作成した。 R e l i o n と c r y o S P A R C との間のデータの転送は、 p y e m^{5 9} を用いて行った。

【 0 2 8 0 】

結晶化および構造決定

5 2 F a b - 2 9 8 F a b - R B D の三元複合体を、 2 0 0 μ g の R B D を、 2 0 mM T r i s p H 8 . 0 、 1 5 0 mM N a C l 中の 2 倍モル過剰の各 F a b と混合することによって得て、 続いてサイズ排除クロマトグラフィー (S u p e r d e x 2 0 0 I n c r e a s e 1 0 / 3 0 0 G L 、 G E H e a l t h c a r e 社) によって精製した。複合体を含有する分画を 7 . 3 m g / m l に濃縮し、 2 0 % (w / v) 2 - プロパノール、 2 0 % (w / v) P E G 4 0 0 0 、および 0 . 1 M クエン酸ナトリウム p H 5 . 6 と 1 : 1 の比で混合した。結晶が約 1 日後に現れ、 1 0 % (v / v) エチレングリコール中で凍結保護した後、液体窒素中で急速凍結した。

【 0 2 8 1 】

o t o n S o u r c e の 2 3 - I D - D ビームラインでデータを収集した。 X D S^{6 0} および X P R E P を使用してデータセットを処理した。相は、 5 2 F a b のモデルとしての C N T O 8 8 F a b (P D B I D : 4 D N 3) 、 2 9 8 F a b のモデルとしての 2 0 3 5 8 F a b (P D B I D : 5 C Z X) 、 および R B D の検索モデルとしての P D B I D : 6 X D G による P h a s e r^{6 1} を用いた分子置換によって決定した。構造の精密化は、 p h e n i x . r e f i n e^{6 2} および C o o t^{6 3} の手動構築の反復を使用して実行した。 P y M O L を構造解析および図レンダリング^{6 4} に利用した。すべてのソフトウェアへのアクセスは、 S B G r i d^{6 5} を通じてサポートされた。 2 つの F a b - R B D 界面の代表的な電子密度を図 2 e 、 f に示す。

【 0 2 8 2 】

10

材料の入手可能性

電子顕微鏡マップは、 アクセッションコード E M D - 2 2 7 3 8 、 E M D - 2 2 7 3 9 、 E M D - 2 2 7 4 0 および E M D - 2 2 7 4 1 を用いて電子顕微鏡データバンク (E M D B) に寄託されている (表 2) 。 2 9 8 - 5 2 - R B D 複合体の結晶構造 (表 3) は、 P D B I D : 7 K 9 Z のアクセッションで P r o t e i n D a t a B a n k から入手可能である。 使用されるモノクローナル抗体の配列は、本紙と共に提供される (表 4) 。 m A b によってターゲティングされた異なるエピトープビンの比較分析を行うために、原稿全体を通して追加の P D B / E M D B エントリを使用した。 この分析で使用されるエントリは、 R E G N 1 0 9 3 3 (P D B I D : 6 X D G) 、 C V 3 0 (P D B I D : 6 X E 1) 、 C 1 0 5 (P D B I D : 6 X C M) 、 C O V A 2 - 0 4 (P D B I D : 7 J M O) 、 C O V A 2 - 3 9 (P D B I D : 7 J M P) 、 C C 1 2 . 1 (P D B I D : 6 X C 2) 、 B D 2 3 (P D B I D : 7 B Y R) 、 B 3 8 (P D B I D : 7 B Z 5) 、 P 2 C - 1 F 1 1 (P D B I D : 7 B W J) 、 2 - 4 (P D B I D : 6 X E Y) 、 C B 6 (P D B I D : 7 C 0 1) 、 R E G N 1 0 9 8 7 (P D B I D : 6 X D G) 、 S 3 0 9 (P D B I D : 6 W P S 、 6 W P T) 、 E Y 6 A (P D B I D : 6 Z C Z) 、 C R 3 0 2 2 (P D B I D : 6 Y L A) 、 H 0 1 4 (P D B I D : 7 C A H) 、 4 - 8 (E M D B I D : 2 2 1 5 9) 、 4 A 8 (P D B I D : 7 C 2 L) 、 および 2 - 4 3 (E M D B I D : 2 2 2 7 5) である。

【 0 2 8 3 】

20

30

40

50

【表2】

表2. Cryo-EMデータ収集および画像処理

	Fab 80-スパイク	Fab 298-スパイク	Fab 324-スパイク	Fab 46-RBD
EMDB ID	EMD-22739	EMD-22740	EMD-22741	EMD-22738
データ収集				
電子顕微鏡	Titan Krios G3	Titan Krios G3	Titan Krios G3	Titan Krios G3
カメラ	Falcon 4EC	Falcon 4EC	Falcon 4EC	Falcon 4EC
電圧(kV)	300	300	300	300
公称倍率	75,000	75,000	75,000	75,000
較正された物理ピクセルサイズ(Å)	1.03	1.03	1.03	1.03
総露光量(e-/Å²)	44	44	44	44
フレーム数	29	29	29	29
画像処理				
モーション補正ソフトウェア	cryoSPARC v2、Relion Motion Corr	cryoSPARC v2、Relion Motion Corr	cryoSPARC v2、Relion Motion Corr	cryoSPARCv2
CTF推定ソフトウェア	cryoSPARCv2	cryoSPARCv2	cryoSPARCv2	cryoSPARCv2
粒子選択ソフトウェア	cryoSPARCv2	cryoSPARCv2	cryoSPARCv2	cryoSPARCv2
3Dマップ分類および精密化ソフトウェア	cryoSPARCv2	cryoSPARCv2	cryoSPARCv2	cisTEM
使用した顕微鏡写真(合計)	3610	7772	4478	4722
0° 傾斜	820	4259	1098	4722
40° 傾斜	2790	3513	3380	0
全体分解能(Å)	6.2	6.2	6	4
最終マップ内の粒子	7,525	26,972	18,595	32,283

10

20

30

40

【0 2 8 4】

50

【表3】

表3. X線結晶学データ収集および精密化統計

	Fab 52- SARS-CoV-2 RBD	Fab 298- RBD
PDB ID	7K9Z	
データ収集		
波長(Å)	1.03317	
空間群	P 3 ₂ 2 1	
細胞寸法		
a, b, c(Å)	87.6, 87.6, 325.1	10
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	
分解能(Å)	39.66-2.95 (3.05-2.95)	
ASU中の分子数	1	
全観察数	496,550 (43,958)	
固有の観察なし	31,545 (3,060)	
多重度	15.7 (14.3)	
R _{merge} (%)	16.8 (74.2)	
R _{free} (%)	4.3 (20.1)	
⟨I/σ I⟩	12.3 (1.4)	
CC _{1/2}	99.8 (86.3)	20
完全性 (%)	99.9 (99.9)	
精密化		
非水素原子	8061	
高分子	8047	
グリカン	14	
R _{work} /R _{free}	0.259/0.286	
Rms偏差		
結合長(Å)	0.002	
結合角(°)	0.53	30
ラマチャンドランプロット		
好ましい領域 (%)	95.6	
許容領域 (%)	4.1	
外れ値 (%)	0.3	
回転異性体の外れ値 (%)	2.6	
B因子(Å ²)		
ウィルソンB因子	78.6	
平均B因子	103.9	
平均高分子	103.9	
平均グリカン	114.3	40

【0 2 8 5】

【表4 - 1】

表4.

mAb ID	VH	VK	RBD K _D (nM)	IC ₅₀ SARS-CoV2 PsV (μg/mL)		IC ₅₀ SARS-CoV2/SB2-P4-PB (μg/mL)		可変重鎖配列	可変軽鎖配列
				MB	IgG	MB	IgG		
56	IGHV1-46	IGKV1-39	23	>50	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTSYGISWVRQA PGQQGLEWMGWISA YNGNTNYAQKLQG RVVTMTRDTSTTV YMELOSSLRSEDTAV YYCARDIGPIDYWG QGTLTVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QGISSYLAWYQQK PGKAPKLLIYDAS NLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQQ ANSFPSTFGQGTK VEIKR
								EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGWII NPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMELOSSLRSEDT AVYYCARDISSWY EITKFDPWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YIFSRYAIHWVRQA PGQQGLEWMGWMN PISGNTDYAPNFQG RVVTMTRDTSTTV YMELOSSLRSEDTAV YYCAKDGSQLAYL VEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTTHYMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QSISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYDTS NLETGVPSRFSG GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSY TTPWTFGQGTRL EIKR
349	IGHV3-23	IGKV1-39	74	>50	>50	n.d.	n.d.	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGWII NPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMELOSSLRSEDT AVYYCARDISSWY EITKFDPWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YIFSRYAIHWVRQA PGQQGLEWMGWMN PISGNTDYAPNFQG RVVTMTRDTSTTV YMELOSSLRSEDTAV YYCAKDGSQLAYL VEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTTHYMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QSISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYDTS NLETGVPSRFSG GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSY TTPWTFGQGTRL EIKR
								EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGWII NPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMELOSSLRSEDT AVYYCARDISSWY EITKFDPWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YIFSRYAIHWVRQA PGQQGLEWMGWMN PISGNTDYAPNFQG RVVTMTRDTSTTV YMELOSSLRSEDTAV YYCAKDGSQLAYL VEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTTHYMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QSISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYDTS NLETGVPSRFSG GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSY TTPWTFGQGTRL EIKR
178	IGHV1-46	IGKV3-15	72	1.7	>50	n.d.	n.d.	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGWII NPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMELOSSLRSEDT AVYYCARDISSWY EITKFDPWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YIFSRYAIHWVRQA PGQQGLEWMGWMN PISGNTDYAPNFQG RVVTMTRDTSTTV YMELOSSLRSEDTAV YYCAKDGSQLAYL VEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTTHYMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QSISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYDTS NLETGVPSRFSG GSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCL QTHSYPPTFGQQ TKVEIKR
								EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGWII NPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMELOSSLRSEDT AVYYCARDISSWY EITKFDPWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YIFSRYAIHWVRQA PGQQGLEWMGWMN PISGNTDYAPNFQG RVVTMTRDTSTTV YMELOSSLRSEDTAV YYCAKDGSQLAYL VEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTTHYMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QVITNNLAWYQQK PGKAPKLLIYDAST LETGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQP EDFATYYCQQSYT FPYTFQGQGTLV KR
108	IGHV1-46	IGKV1-39	72	0.37	>50	n.d.	n.d.	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGWII NPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMELOSSLRSEDT AVYYCARDISSWY EITKFDPWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YIFSRYAIHWVRQA PGQQGLEWMGWMN PISGNTDYAPNFQG RVVTMTRDTSTTV YMELOSSLRSEDTAV YYCAKDGSQLAYL VEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTTHYMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QVITNNLAWYQQK PGKAPKLLIYDAST LETGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQP EDFATYYCQQSYT FPYTFQGQGTLV KR
								EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QNISSRLNWWYQQ KPGKAPKLLIYDAS NLETGVPSRFSG GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQQA NGFPPTFGQGQGTL EIKR
128	IGHV1-46	IGKV1-39	57	3.5	>50	n.d.	n.d.	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QNISSRLNWWYQQ KPGKAPKLLIYDAS NLETGVPSRFSG GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQQA NGFPPTFGQGQGTL EIKR
								EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWVRQ APGKGLEWVSGIS SAGSITINYADSVKG RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAGNHAGTTVT SEYFQHWGQGTLV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASG YTFTDYHMHWVRQ APGQGLEWMGIIN PSSSSASYSQKFQ GRVTMTRDTSTT VYMELOSSLRSEDTA VYYCARDGRYGS SYPFDYWQGQGTLV TVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRAS QNISSRLNWWYQQ KPGKAPKLLIYDAS NLETGVPSRFSG GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQQA NGFPPTFGQGQGTL EIKR

10

20

30

40

50

【表4 - 2】

160	IGHV3-23	IGKV1-39	7.7	0.22	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG YTFTGHDMHWVR QAPGQGLEWMGII NPSGGSTSYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMEMLSSLRSEDT AVYYCARANSRLY YYGMDV/WGQGTM VTVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTTICRAS QSVSSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQG YTPPYTFGQGTKL EIKR
368	IGHV1-69	IGKV2-28	nb	0.073	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSKASG YTFTSYDINWVRQA PGQGLEWMGAIMP MFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVY YCARGSSGYYYG WGQGTLTVSS	DIVMTQSPSLPV TPGEPASISCRSS QSLLHSNGNYLD WYLQKPGQSPQL LIYLGNSNRASGV DRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVG VYYCMQALQTPAT FGPGTKVDIKR
192	IGHV1-69	IGKV2-28	nb	0.79	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSKASG GTFSSYAIWVRQ APGQGLEWMGW NPNSGGANYAQKF QGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTA VYYCSTYYDSSG YSTDYWGQGTLVT VSS	DIVMTQSPSLPV TPGEPASISCRSS QSLLHSNGNYLD WYLQKPGQSPQL LIYAASSLQSGV DRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVG VYYCMQALQTPYT FGQGTLKLEIKR
158	IGHV1-46	IGKV1-39	172	0.1	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG YTFTGYYMHWVRQ APGQGLEWMGW NPLNGGTNFAPKF QGRVTMTRDTSTS TVYMEMLSSLRSEDT AVYYCARDPGGSY SNDAFDIWGQGTL VTVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTTICRAS QSIISRYLNWYQQK PGKAPKLLIYDAS NLESQVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQA NSFPLTFGGGTKV DIKR
180	IGHV1-69	IGKV2-28	nb	0.89	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSKASG YTFTSYAMHWVRQ APGQGLEWMGRIS PRSGGTYAQRFQ GRVTITADESTSTA YMESSLRSEDTAV YYCAREAVAGTHP QAGDFDLWGRGTL VTVSS	DIVMTQSPSLPV TPGEPASISCRSS QSLLHSNGNYLD WYLQKPGQSPQL LIYAASSLQSGV DRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVG VYYCQQYSSPYT FGQGTLKLEIKR
254	IGHV3-23	IGKV1-39	127	9.3	>50	n.d.	n.d.	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSSAMHWVRQ APGKGLEWVSAIG TGGDTYYADSVKG RFTISRDNSKNLY LQMNSLRAEDTAV YYCAREGDGYNFY	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTTICRAS QGISSYLAWYQQK PGKAPKLLIYDASS LQIGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQP EDFATYYCLQSYS

10

20

30

40

50

【表4 - 3】

120	IGHV1-46	IGKV3-15	24	7.2	>50	n.d.	n.d.	FDYWQGQTLTVVS S QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG YTFTSYDINWVRQA PGQGLEWMGMIDP SGGSTSYAQQKFQG RVTMTRDTSTSTV YMELOSSLRSEDTAV YYCAKDFGGGTRY DYWYFDLWGRGTL VTVSS EVQLLESGGGLVQ PGGSRLSCAASG FPFSQHGMHWVR QAPGKGLEWVSAI DRSGSYIYADSVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCARDTYGGKV TYFDYWGQGTLVT VSS	TPPWTFGQQGKTV EIKR EIVMTQSPATLSV SPGERATLSCRAS QSVSSRYLAWYQ QKPGQAPRLLIYG ASTRATGIPARFS GSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYCQ QYYTTPTFQGQT RLEIKR		10	
64	IGHV3-23	IGKV1-39	97	14	>50	n.d.	n.d.	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG GTFSYGISWVRQ APGQGLEWMWIS PNSGGTDLAQKFQ GRVTMTRDTSTST VYMELOSSLRSEDT VYYCASPRDDIAG GYWGQGTLVTVSS	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLYSSNNKNYL AWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTD FTLTSSLQAEDVA VYYCQQYYSTPPT FGQGTTKLEIKR		20	
298	IGHV1-46	IGKV4-1	24	0.00011	2.8	0.0057	2.2	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG GSFSTSAYWVRQ APGQGLEWMWI NPYTGTTNYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMELOSSLRSEDT AVYYCARSLALY SGSYFDYWGQGTL VTVSS EVQLLESGGGLVQ PGGSRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSTIYS GGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCARGDSRDAFDI WGQGTMVTVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITCRAS QVISNYLAWYQQK PGKAPKLLIYDAS NLETGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSF SPPPTFGQGTRLE IKR		30	
82	IGHV1-46	IGKV1-39	206	0.0022	1.6	0.21	19	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG GSFSTSAYWVRQ APGQGLEWMWI NPYTGTTNYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMELOSSLRSEDT AVYYCARSLALY SGSYFDYWGQGTL VTVSS EVQLLESGGGLVQ PGGSRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSTIYS GGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCARGDSRDAFDI WGQGTMVTVSS	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITCRAS QVISNYLAWYQQK PGKAPKLLIYDAS NLETGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSF SPPPTFGQGTRLE IKR		40	
46	IGHV3-23	IGKV1-39	83	0.0024	2.1	0.027	19	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG GTFNYYGISWVRQ APGQGLEWMWIS NPNSGNTGYAQKF	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITCRAS QSISSWLAWYQQ PGKAPKLLIYDAS NLETGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSY STPFTFGPGTKVD IKR			
324	IGHV1-69	IGKV1-39	111	0.0009	0.78	0.024	21	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG GTFNYYGISWVRQ APGQGLEWMWIS NPNSGNTGYAQKF	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITCRAS QSISSWLAWYQQ PGKAPKLLIYDAS NLETGVPSRFSGS			

【表4-4】

								QGRVTMTRDTSTS TVYMESSLRSEDT AVYYCARVGDYGD YIVSPFDLWGRGTL VTVSS QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSKASG GFTTSYGINWVRQ APGQGLEWMGWM NPNSGNTGYAQKF QGRVTMTRDTSTS TVYMESSLRSEDT AVYYCASRGIQLLP RGMDVWGGTTV TVSS QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSKASG YTFTSYGISWVRQA PGQGLEWMGGIIP MFGTTNYAQKFQG RVITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVY YCARDRGDTIDYW GGQTLTVSS QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSKASG GTFNRYAFSWVRQ APGQGLEWMGGII PIFGTANYAQKFQG RVITIADESTSTAY MELSSLRSEDTAVY YCARSTRELPEVV DWYFDLWGRGTLV TVSS	GSGTDFLTLSLQ PEDFATYYCQQSY STPPTFGQGTKE IKR DIVMTQSPSLPV TPGEPASISCRSS QSLLHSNGNYLD WYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVP DRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVG VYYCMQALQTPPT FGQQGTRLEIKR DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITICRAS QGISNNLNWYQQ KPGKAPKLLIYAAS SLESGVPSRFSGS GSGTDFLTLSLQ PEDFATYYCQQG NGFPLTFGPGBK DIKR DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLYSSNNKNYL AWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVA VYYCQQYYSAPLIT FGGGTKVEIKR		
236	IGHV1-69	IGKV2-28	145	0.00047	0.057	0.028	5.5		10		
52	IGHV1-69	IGKV1-39	12	0.0002	0.55	0.27	6.2		20		
80	IGHV1-69	IGKV4-1	142	0.0013	0.1	0.32	12.7		30		

【0286】

材料および方法の参考文献

46. Kabsch, W. et al. XDS. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 66, 125 - 132 (2010).

47. McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40, 658 - 674 (2007).

48. Adams, P. D. et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 66, 213 - 221 (2010).

49. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 66, 486 - 501 (2010).

50. Morin, A. et al. Collaboration gets the most out of software. Elife 2, (2013).

51. Marr, C. R., Benlekbir, S. & Rubinstein, J. L. Fabrication of carbon films with ~500 nm holes for cryo-EM with a direct detector device. *J. Struct. Biol.* 185, 42-47 (2014).
52. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. CryoSPARC: Algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* 14, 290-296 (2017).
53. Zi Tan, Y. et al. Addressing preferred specimen orientation in single-particle cryo-EM through tilting. *Nat. Methods* 14, (2017). 10
54. Zivanov, J. et al. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife* 9, e42166 (2018).
55. Scheres, S. H. W. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 180, 519-530 (2012). 20
56. Punjani, A. & Fleet, D. 3D Variability Analysis: Directly resolving continuous flexibility and discrete heterogeneity from single particle cryo-EM images. *bioRxiv* (2020).
57. Punjani, A., Zhang, H. & Fleet, D. Non-uniform refinement: Adaptive regularization improves single particle cryo-EM reconstruction. *bioRxiv* (2019).
58. Grant, T., Rohou, A. & Grigorieff, N. CisTEM, user-friendly software for single-particle image processing. *Elife* 7, e35383 (2018). 30
59. Asarnow, D., Palovcak, E. & Cheng, Y. asarnow/pyem: UCSF pyem v0.5. (2019).

【0287】

結果

アビディティは中和力値を増強する

本発明者らは、ヒトアポフェリチンの軽鎖の自己組織化を使用して、SARS-CoV-2 S糖タンパク質を標的とする抗原結合部分を多量体化した。アポフェリチンプロトマーは、24個の同一のポリペプチド³³から構成される約6nmの流体力学半径(Rh)を有する八面体対称構造に自己組織化する。各アポフェリチンサブユニットのN末端は球形ナノケージの外側を指し、したがって目的のタンパク質の遺伝子融合に利用可能である。折り畳むと、アポフェリチンプロトマーは、それらのN末端に融合した24個のタンパク質の多量体化を駆動する構成要素として作用する(図1a)。

【0288】

最初に、本発明者らは、ウイルス感染を阻止する一本鎖可変ドメインVHH-72の能力に対する多価性の影響を調査した。VHH-72は、Fcドメインに融合した場合にSARS-CoV-2を中和すると以前に記載されているが、その一価フォーマット³¹ではそうではない。24コピーのVHH-72を提示するヒトアポフェリチンの軽鎖は、单 50

分散の十分に形成された球状粒子（図 1 b、c）に集合し、二価 VHH-72-Fc と比較して、S 糖タンパク質（図 1 d）に対する結合アビディティの増強を示した。驚くべきことに、ヒトアポフェリチンの軽鎖上の VHH-72 の提示は、従来の Fc 融合と比較して、SARS-CoV-2 シュードウイルス（PsV）に対する中和力価の約 10,000 倍の上昇を達成し（図 1 e）、結合部分を強力な中和剤に変換するアビディティの能力を実証した。

【0289】

多形体は IgG 様特性を有する。

Fc は、それぞれ新生児型 Fc 受容体（FcRn）および Fc ガンマ受容体（FcR）との相互作用を介して、インビボでの IgG の半減期およびエフェクター機能を付与する。これらの IgG 様特性を本発明者らの多量体スカフォールドに付与するために、本発明者らは次に、結合部分と Fc ドメインとの両方を組み込むことを試みた。Fab は軽鎖と重鎖とからなるヘテロ二量体であり、Fc はホモ二量体であるので、本発明者らは単鎖 Fab（scFab）および単鎖 Fc（scFc）ポリペプチドコンストラクトを作製した。scFab ドメインおよび scFc ドメインを、アポフェリチンプロトマーの N 末端に直接融合した。インビボ原理証明実験のために、本発明者らは、マウス scFab およびマウス scFc（IgG2a サブタイプ）へのマウス軽鎖アポフェリチン融合物からなる種一致サロゲート分子を生成した。結合動態は、得られた MB 分子が親 IgG（図 3 a）と同様に、pH 依存的にマウス FcRn に結合し、すなわちエンドソーム pH（5.6）で結合し、生理学的 pH（7.4）では結合しないことを示した。予想されるように、高アフィニティーマウス FcR1 への結合は、親 IgG と比較してアビディティ効果を介して増強された。したがって、本発明者らは、多量体の文脈で Fc 結合を低下させるための FcR サイレンシング突然変異 LALAP を含む改変マウス scFc バージョンを生成した（図 3 a）。C57BL/6 マウスまたは BALB/c マウスにおける MB の皮下投与は、体重の減少も目に見える有害イベントもなく、忍容性が高かった。MB は良好な IgG 様血清半減期（図 3 b）を示し、野生型 MB と比較してより低い FcR 結合 MB（LALAP Fc 配列）について血清中の検出可能な力価が延長されており、インビボバイオアベイラビリティーの決定における Fc の役割を示していた。ライブ 2D および 3D イメージングにより、蛍光標識 MB が、いかなる特定の組織にも蓄積することなく、対応する IgG と同様に全身に生体内分布することが明らかになった（図 3 c および図 4）。対照的に、MB と同様の Rh を有する 15 nm 金ナノ粒子（GNP）は、注射部位から急速に散布された（図 3 c および図 4）。おそらく宿主に由来するすべての配列のために、サロゲートマウス MB はマウスにおいて抗薬物抗体応答を誘導せず（図 3 d）、したがって MB プラットフォームの IgG 様特性をさらに強調した。

【0290】

より高い結合価を達成するためのタンパク質エンジニアリング

マウス MB サロゲートに対するこれら的好ましい結果を考慮して、本発明者らは、それ SARS-CoV-2 スパイク RBD および N 末端ドメイン（NTD）を標的とする、以前に報告された IgG BD23^{1,2} および IgG 4A8^{1,3} に由来する完全ヒト MB を生成することを目的とした。scFc を MB に添加すると、多量体化できる scFab の数が減少する。Fab アビディティ、したがって中和力価を損なうことなく MB プラットフォームに Fc を付与するために、本発明者らは、粒子当たり 24 個を超える成分を収容するようにアポフェリチンプロトマーを操作した。その 4 ヘリカルバンドルフォールドに基づいて、ヒトアポフェリチンプロトマーを 2 つの半分に分割した：2 つの N 末端 ヘリックス（N-フェリチン）および 2 つの C 末端 ヘリックス（C-フェリチン）。この構成では、ヒト IgG1 の scFc 断片および抗 SARS-CoV-2 IgG の scFab を、それぞれ各アポフェリチン半部の N 末端で遺伝子融合した。分割アポフェリチン相補性は、2 つの半部のヘテロ二量体化をもたらし、その結果、融合タンパク質の非常に効率的なヘテロ二量体化プロセスをもたらした。scFab-C-フェリチンおよび scFc-N-フェリチン遺伝子を scFab-C-フェリチン遺伝子と共に過剰に共発現さ

10

20

30

40

50

せると、ナノケージ周辺部に多数の s c F a b および少数の s c F c を示す完全なアポフェリチン自己組織化が生じた（図 5 a および材料および方法）。好都合なことに、この設計は、I g G 精製に類似するプロテイン A を使用した M B の直接的な精製を可能にする。

【 0 2 9 1 】

この分割 M B 設計は、密度の連続したリングと、規則的に間隔を置いて突出した s c F a b および s c F c （図 5 b、c）とを有する 16 nm Rh 球状粒子を形成する。したがって、M B は、天然 I g M^{3/4} のより低いサイズ範囲にあるが、高い多価性を達成するために同様のサイズでより多くの重量を詰め込む。結合動態実験は、スパイクに対する M B の高い結合アビティが F c 断片の添加時に保存されることを実証した（図 5 d および表 5）。pH 5.6 および 7.4 の両方でヒト F c RI および F c Rn に結合すると、s c F c が分割 M B 設計で適切に折り畳まれていることが確認された（表 6 および 7）。さらに、s c F c における L A L A P 突然変異は、サロゲートマウス M B（図 3 a）で以前に観察されたように、ヒト F c RI に対する結合アフィニティーを低下させた（図 5 e）。分割設計 M B を用いた S A R S - C o V - 2 P s V 中和アッセイは、スパイクに対する結合アフィニティーの増強が、それらの I g G 対応物と比較して中和力値の改善につながり、BD23 および 4A8 がそれぞれ約 1600 倍および >2000 倍上昇することを示した（図 5 f）。合わせて、このデータは、異なるスパイクドメイン上のエピトープにわたって強い結合アビティおよび P s V 中和を与える I g G 様プラットフォームとしての M B の更なる探求を裏付けた。

【 0 2 9 2 】

【 表 5 】

表 5. B L I によって決定された M u l t a b o d i e s の S A R S - C o V - 2 スパイク抗原に対する速度定数およびアフィニティー

Multobody	SARS-CoV-2 スパイク		
	k_{on} [M⁻¹ x s⁻¹]	k_{off} [s⁻¹]	K_D [M]
4A8 MB	1.08E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
4A8 IgG	1.33E+05	1.91E-04	1.42E-09
BD23 MB	9.57E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
BD23 IgG	2.17E+05	9.37E-04	4.33E-09

【 0 2 9 3 】

10

20

30

40

50

【表6】

表6. SARS-CoV-2を標的とするBD23抗体(IgG1)に由来するヒトフェリチンMultabodiesのヒトFcRnに対する速度定数およびアフィニティー

Multabody	FcRn, pH 5.6			FcRn, pH 7.5		
	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
IgG1 対照	5.03E+05	3.86E-03	7.67E-09	-	-	結合なし
WT MB	2.18E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	結合なし
LALAP MB	2.69E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	結合なし
I253A MB	2.00E+05	4.28E-04	2.15E-09	-	-	結合なし
LALAP +I253A MB	4.34E+05	6.10E-04	1.41E-09	-	-	結合なし

10

20

30

【0294】

【表7】

表7. SARS-CoV-2を標的とするBD23抗体(IgG1)に由来するヒトフェリチンマルチボディのヒトFcγRIに対する速度定数およびアフィニティー

Multabody	FcγRI		
	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
IgG1 対照	1.27E+05	1.34E-04	1.06E-09
WT MB	7.21E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
LALAP MB	-	-	結合なし
I253A MB	5.01E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
LALAP I253A MB	-	-	結合なし

【0295】

Multabodiesで評価されたIgG1主鎖のFc突然変異には、FcRへの抗体結合を減少させるLALAP(L234A、L235AおよびP329G)およびI235A、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。(番号付けは、EU番号付け方式に従う)

【0296】

k_{on} 、 k_{off} について決定された値、およびMultobodyについて得られた平衡解離定数(K_D)を表6~10に要約する。結合動態は、得られたマウスMB分子が、親IgG(図3A)と同様に、pH依存的様式でマウスFcRnに結合し、すなわちエンドソームpH(5.6)で結合し、生理学的pH(7.4)で結合しないことを示した。高いアフィニティーマウスFcR1への結合は、親IgGと比較してアビディティ効果を介して増強された。エンドソームpHでのヒトFcγRIおよびFcRnへのヒトMBの結合により、scFcが分割MB設計において適切にフォールディングされ、LALAPおよびI253A突然変異がFcγRIおよびFcRnに対する結合アフィニティーをそれぞれ低下させることが確認された。

【0297】

40

50

【表8】

表8. B L Iによって決定された、CD19を標的とするHD37抗体（IgG2a）に由来するマウスフェリチンマルチボディのマウスFcRnに対する速度定数およびアフィニティー

Multabody	mFcRn, pH 5.6			mFcRn, pH 7.4		
	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
mIgG2a 対照	1.16E+05	1.23E-04	1.06E-09	-	-	結合なし
mWT MB	6.82E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	結合なし
mLALAP MB	2.40E+06	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	結合なし

10

【0298】

【表9】

表9. B L Iによって決定された、CD19を標的とするHD37抗体（IgG2）に由来するマウスフェリチンMultabodiesのマウスFcγRIに対する速度定数およびアフィニティー

Multabody	mFcγRI		
	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
mIgG2a 対照	5.22E+04	4.51E-04	8.63E-09
mWT MB	9.39E+05	<1.0E-07	<1.0E-12
mLALAP MB	-	-	結合なし

20

【0299】

【表10】

表10. SARS-CoV-2を標的とするBD23抗体（IgG1）に由来するヒトフェリチンMultabodiesのヒトFcRnに対する速度定数およびアフィニティー

Multabody	FcRn, pH 5.6			FcRn, pH 7.5		
	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
IgG1対照	5.03E+05	3.86E-03	7.67E-09	-	-	結合なし
WT MB	2.18E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	結合なし
LALAP MB	2.69E+05	<1.0E-07	<1.0E-12	-	-	結合なし
I253A MB	2.00E+05	4.28E-04	2.15E-09	-	-	結合なし
LALAP +I253A MB	4.34E+05	6.10E-04	1.41E-09	-	-	結合なし

30

40

【0300】

抗体発見から超強力中和剤へ

次に、初期ファージディスプレイスクリーンから同定されたmAbバインダーをSARS-CoV-2に対する強力な中和剤に変換するMBプラットフォームの能力を評価した（図6a）。SARS-CoV-2のRBDに対する標準的なバイオパニングプロトコルに従って、 10^{-6} ~ 10^{-8} Mの範囲の中程度のアフィニティーを有する20個のヒトmAbバインダーを選択した（表4；表11）。これらのmAbを全長IgGおよびMBとして產生し、ウイルス感染を阻止する能力をSARS-CoV-2 Psv（図6bお

50

よび図 7 a)に対する中和アッセイで比較した。特に、MBの発現収率、均一性および熱安定性は、親 IgG のものと類似しており(図 8 および表 12)、MBは、20 IgG のうち 18 (90 %) の力価を最大4桁増強した(表 13)。最大の増分は、mAb 298 で観察され、IgG としての約 0.3 μg / mL の平均 IC₅₀ から MB としての 0.0001 μg / mL になった。驚くべきことに、試験した濃度範囲で 11 mA b を非中和 IgG から中和 MB に変換した。7つのMBは、2つの異なる標的細胞を使用した SARSCoV-2 Psv に対して 0.2 ~ 2 ng / mL の IC₅₀ 値で並外れた力価を示した(293T-ACE2 および HeLa-ACE2 細胞; 図 6 b および図 7 b)。ベンチマークとして組換え mAb の REGN10933 および REGN10987 を使用する Psv 中和アッセイは、以前に報告された IC₅₀ 値⁸ と同様の IC₅₀ 値(それぞれ 0.0044 および 0.030 μg / mL)を示し、したがって、本発明者らのアッセイで観察された MB の並外れた力価を確認した。MB の増強された中和力価は、2つの組換え REGN mAb でもベンチマークしたように、最も高い力価を有する mAb (図 6 c および図 7 c)について真正 SARSCoV-2 ウィルスを用いてさらに確認された。Psv と比較して本発明者らが真正ウィルスに対して観察した感度の低い中和表現型もまた、以前の報告^{5, 6, 9, 12} と一致する。

10

20

30

40

【0301】

【表 11】

表 11. SARSCoV-2 RBD のヒト mA b バインダー

mAb ID	VH	VK	RBD KD (nM)
56	IGHV1-46	IGKV1-39	23
349	IGHV3-23	IGKV1-39	74
178	IGHV1-46	IGKV3-15	72
108	IGHV1-46	IGKV1-39	72
128	IGHV1-46	IGKV1-39	57
160	IGHV3-23	IGKV1-39	7.7
368	IGHV1-69	IGKV2-28	nb
192	IGHV1-69	IGKV2-28	nb
158	IGHV1-46	IGKV1-39	172
180	IGHV1-69	IGKV2-28	nb
254	IGHV3-23	IGKV1-39	127
120	IGHV1-46	IGKV3-15	24
64	IGHV3-23	IGKV1-39	97
298	IGHV1-46	IGKV4-1	24
82	IGHV1-46	IGKV1-39	206
46	IGHV3-23	IGKV1-39	83
324	IGHV1-69	IGKV1-39	111
236	IGHV1-69	IGKV2-28	145
52	IGHV1-69	IGKV1-39	12
80	IGHV1-69	IGKV4-1	142

【0302】

nb = 検出限界未満の結合

50

【表12】

表12. Multabodiesおよび関連抗体の凝集温度 (T_{agg})

Multobody/抗体	T_{agg} [°C]
MB 298	73
MB 82	81
MB 46	69
MB 324	71
MB 236	71
MB 52	74
MB 80	85
IgG 298	74
IgG 82	75
IgG 46	75
IgG 324	70
IgG 236	70
IgG 52	73
IgG 80	81

10

【0303】

20

30

40

50

【表 1 3 - 1】

表 1 3. RBDターゲティングM u l t a b o d i e sによるSARS-CoV-2中和

Multabody	IC ₅₀ 中央値
MB 178	1.7 μg/mL (0.74 nM)
IgG 178	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 108	0.37 μg/mL (161 pM)
IgG 108	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 128	3.5 μg/mL (1.5 nM)
IgG 128	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 160	0.22 μg/mL (96 pM)
IgG 160	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 368	0.073 μg/mL (32 pM)
IgG 368	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 192	0.79 μg/mL (343 pM)
IgG 192	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 158	0.10 μg/mL (43 pM)
IgG 158	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 180	0.89 μg/mL (387 pM)
IgG 180	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 254	9.3 μg/mL (4.0 nM)
IgG 254	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 120	7.2 μg/mL (3.1 nM)
IgG 120	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 64	14 μg/mL (6.1 nM)
IgG 64	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 56	> 50 μg/mL (> 0.33 μM)
IgG 56	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 349	> 50 μg/mL (> 0.33 μM)
IgG 349	> 50 μg/mL (> 333 nM)
MB 298	0.00011 μg/mL (0.048 pM)
IgG 298	0.28 μg/mL (1.9 nM)
MB 82	0.0022 μg/mL (0.95 pM)
IgG 82	1.6 μg/mL (11 nM)
MB 46	0.0024 μg/mL (1.0 pM)
IgG 46	2.1 μg/mL (14 nM)
MB 324	0.0009 μg/mL (0.39 pM)
IgG 324	0.78 μg/mL (5.2 nM)
MB 236	0.00047 μg/mL (0.20 pM)

10

20

30

40

50

【表13-2】

IgG 236	0.057 µg/mL (0.38 nM)
MB 52	0.0002 µg/mL (0.087 pM)
IgG 52	0.61 µg/mL (4.1 nM)
MB 80	0.0013 µg/mL (0.56 pM)
IgG 80	0.1 µg/mL (0.67 nM)
参照IgG (REGN 10933)	0.0044 µg/mL (29 pM)
参照IgG (REGN 10987)	0.030 µg/mL (0.20 nM)

10

20

30

【0304】

遡及的に、すべての IgG および MB を、スパイク糖タンパク質および SARS-CoV-2 の RBD に結合する能力について試験した（図9）。アビディティが増加すると、見かけの結合アフィニティーがより高くなり、スパイク糖タンパク質に対する検出可能なオフレートはなくなり、おそらく高い中和力値に変換されるスパイク間架橋に起因する（図6b～図6d および図9）。全体として、データは、MB プラットフォームが、適度な中和特性の mAb で開始した場合でさえ、超強力な IgG 様分子の迅速な送達に適合することを示す。

【0305】

エピトープマッピング

それらの中和力値に基づいて、7つの mAb を更なる特性評価のために選択した： 298 (IGHV1-46 / IGKV4-1)、82 (IGHV1-46 / IGKV1-39)、46 (IGHV3-23 / IGKV1-39)、324 (IGHV1-69 / IGKV1-39)、236 (IGHV1-69 / IGKV2-28)、52 (IGHV1-69 / IGKV1-39)、および 80 (IGHV1-69 / IGKV4-1)（図6b および表4）。エピトープビニング実験は、これらの mAb が RBD 上の 2 つの主要部位を標的とし、これらのビンのうちの 1 つが ACE2 結合部位と重複することを示した（図10a および図11）。約 6 ~ 7 の全体分解能での Fab-SAR-CoV-2S 複合体の cryo-EM 構造により、mAb 324、298 および 80 が重複エピトープに結合することが確認された（図10b、図12a～c、および表2）。他のビンを標的とする mAb の結合に関する洞察を得るために、本発明者らは、4.0 の全体分解能で RBD と複合体を形成した Fab 46 の cryo-EM 構造（図10c、図12d、および表2）、ならびに 2.95 分解能で RBD と三元複合体を形成した Fab 298 および 52 の結晶構造（図10d、図2 および表3）を得た。

【0306】

結晶構造は、Fab 298 が RBD の ACE2 受容体結合モチーフ (RBM) にほぼ排他的に結合することを示す（残基 438 ~ 506）。実際、Fab 298 の結合に関与する 16 個の RBD 残基のうち、12 個も ACE2-RBD の結合に関与する（図2a～c および表14）。RBM は、Fab 298 の重鎖残基および軽鎖残基由来の 11 個の水素結合によって安定化される。さらに、RBM Phe486 は、約 170² を埋没する 11 個の Fab 298 残基（RBD 上の全埋没面積の 24%）と接触し、したがって抗体 - 抗原相互作用の中心である（図2a および表14）。

【0307】

RBD-52 Fab 界面の詳細な分析は、mAb 52 のエピトープが、RBM の 20 残基およびコアドメイン中の 7 残基を包含する RBD のコアに向かってシフトしていることを明らかにする（図10c、図2b、および表14）。競合データと一致して、抗体

40

50

5 2 および抗体 4 6 は類似の結合部位を共有するが、それらはわずかに異なる角度で R B D に接近する（図 1 0 c 、 d および図 2 d ）。R B D - 抗体複合体の以前に報告された構造を検査すると、抗体 4 6 および 5 2 が、以前に記載されていない S A R S - C o V - 2 スパイク上の脆弱性の部位を標的とすることが明らかになる（図 1 0 e ）。これらの抗体によってターゲティングされるエピトープは、S 「閉」 構造の N T D によって部分的に閉塞されており、このクラスの抗体の作用機序がスパイク不安定化を伴い得ることを示唆している。まとめると、これらのデータは、アビディティを介して M B プラットフォームについて観察された増強された中和力値が、R B D 上の異なるエピトープピンを標的とすることができる m A b と関連していることを実証している。

【 0 3 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表14. PISAによって同定されたRBD-298およびRBD-52接触残基

RBD	残基	BSA (Å ²)	相互作用	Fab 298 (H-HC, K-KC)
453	Tyr	2	vdW	H-Thr31, H-Ile100
455	Leu	20	vdW	H-Thr31, H-Ile100
456	Phe	30	vdW	H-Thr31, H-Tyr32
458	Lys	1	vdW	K-Ser27F
474	Gln	12	vdW	K-Tyr27D
	Gln ^{NE2}		HB	K-Tyr27D ^{OH}
475	Ala	45	vdW	K-Tyr27D, H-Tyr32, K-Tyr32, H-Arg97
	Ala ^O		HB	K-Tyr32 ^{OH}
476	Gly	23	vdW	K-Tyr27D, K-Tyr32, K-Tyr91, K-Tyr92, K-Ser93, H-Arg97
477	Ser	75	vdW	K-Tyr27D, K-Tyr92, K-Ser93, K-Thr94
	Ser ^N		HB	K-Tyr92 ^O
	Ser ^{OG}		HB	K-Tyr92 ^O
478	Thr	41	vdW	K-Tyr27D, K-Tyr92, K-Ser93, K-Thr94
	Thr ^{OG1}		HB	K-Thr94 ^{OG1}
484	Glu	74	vdW	H-Trp50, H-Ser52, H-Ser54, H-Gly55, H-Gly56, H-Thr57, H-Asp58
	Glu ^{OE2}		HB	H-Ser54 ^{OG}
485	Gly	28	vdW	H-Trp50, H-Thr57, H-Asp58
486	Phe	169	vdW	K-Gln89, K-Tyr91, K-Ser93, K-Thr94, K-Pro96, H-Ser35, H-Trp47, H-Trp50, H-Asp58, H-Asp95, H-Arg97
	Phe ^N		HB	H-Asp58 ^{OD2}
	Phe ^O		HB	K-Thr94 ^{OG1}
487	Asn	41	vdW	K-Tyr32, K-Tyr91, K-Ser93, K-Thr94, H-Asp95, H-Arg97
	Asn ^{OD1}		HB	H-Arg97 ^{NH2}
	Asn ^{ND2}		HB	K-Tyr91 ^O , K-Tyr92 ^O
488	Cys	1	vdW	H-Trp50

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

489	Tyr	84	vdW	H-Ser30, H-Thr31, H-Tyr32, H-Trp50, H-Asp95, H-Arg97,
	Tyr ^{OH}		HB	H-Arg97 ^{NH2} , H-Asp95 ^{OD2}
493	Gln	45	vdW	H-Ser30, H-Thr31, H-Ile100
総BSA (Å ²):		691		

RBD	残基	BSA (Å ²)	相互作用	Fab 52 (H-HC, K-KC)
346	Arg	45	vdW	H-Gln64
351	Tyr	29	vdW	K-Phe94, H-Ile52, H-Thr56, H-Asn58
352	Ala	19	vdW	K-Gly93, K-Phe94
354	Asn	6	vdW	K-Phe94
355	Arg	36	vdW	K-Ser0, K-Gln27
	Arg ^O		HB	K-Ser0 ^{OG}
356	Lys	13	vdW	K-Ser0
357	Arg	66	vdW	K-Ser0, K-Gln27
	Arg ^N		HB	K-Ser0 ^{OG}
	Arg ^{NH2}		HB	K-Gln27 ^{OE1}
449	Tyr	13	vdW	H-Phe554, H-Thr56
450	Asn	38	vdW	H-Phe554, H-Thr56
452	Leu	47	vdW	H-Ile52, H-Phe554, H-Gly55, H-Thr56
462	Lys	1	vdW	K-Ser30
465	Glu	28	vdW	K-Ser30, K-Asn31, K-Asn32, K-Asn92
	Glu ^{OE2}		HB	K-Ser30 ^{OG}
466	Arg	70	vdW	K-Asn32, K-Asn92, K-93Gly, K-Phe94
	Arg ^O		HB	K-Asn32 ^{ND2}
	Arg ^{NH1}		HB	K-Asn92 ^O
467	Asp	12	vdW	K-Asn32, K-Asn92, H-Asp98
468	Ile	102	vdW	K-Asn32, K-Gly91, K-Asn92, K-93Gly, K-Phe94, K-Leu96, H-Arg96, H-Gly97, H-Asp98
469	Ser	37	vdW	K-Asn32, H-Arg96, H-Gly97, H-Asp98
	Ser ^{OG}		HB	H-Asp98 ^{OD1}
470	Thr	67	vdW	H-Ser31, H-Tyr32, H-Gly33, H-Ile52, H-Asp95, H-Arg96, H-Gly97, H-Asp98

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

	Thr ^{OG1}		HB	H-Gly97 ^N
471	Glu	39	vdW	H-Tyr32, H-Arg96, H-Gly97, H-Asp98
	Glu ^{OE1}		SB	H-Arg96 ^{NH2}
	Glu ^{OE2}		SB	H-Arg96 ^{NH2}
472	Ile	7	vdW	H-Ser31, H-Tyr32, H-Arg96
481	Asn	1	vdW	H-Tyr32
482	Gly	42	vdW	H-Ser31, H-Tyr32
	Gly ^O		HB	H-Tyr32 ^{OH}
483	Val	12	vdW	H-Thr28, H-Ser31, H-Tyr32
484	Glu	53	vdW	H-Thr28, H-Phe29, H-Thr30, H-Ser31, H-Met54
490	Phe	87	vdW	H-Thr30, H-Ser31, H-Tyr32, H-Gly33, H-Ile52, H-Met54, H-Phe554
492	Leu	13	vdW	H-Ile52, H-Met54, H-Phe554
493	Gln	8	vdW	H-Phe554
494	Ser	17	vdW	H-Phe554
総BSA(Å ²):		904		

10

20

Fab 298	残基鎖	BSA (Å ²)	相互作用	RBD
30	Ser-H	9	vdW	Tyr489, Gln493
31	Thr-H	68	vdW	Tyr453, Leu455, Phe456, Tyr489, Gln493
32	Tyr-H	57	vdW	Phe456, Ala475, Tyr489
35	Ser-H	8	vdW	Phe486
47	Trp-H	23	vdW	Phe486
50	Trp-H	79	vdW	Glu484, Gly485, Phe486, Cys488, Tyr489
52	Ser-H	8	vdW	Glu484
54	Ser-H	17	vdW	Glu484
	Ser ^{OC} -H		HB	Glu484 ^{OE2}
55	Gly-H	7	vdW	Glu484
56	Gly-H	7	vdW	Glu484
57	Thr-H	10	vdW	Glu484, Gly485
58	Asp-H	28	vdW	Glu484, Gly485, Phe486

30

40

50

【表 1 4 - 4】

		Asp ^{OD2} -H	HB	Phe486 ^N	
95		Asp-H	15	vdW	Phe486, Asn487, Tyr489
		Asp ^{OD2} -H		HB	Tyr489 ^{OH}
97		Arg-H	61	vdW	Asn487, Tyr489
		Arg ^{NH2} -H		HB	Asn487 ^{OD1} , Tyr489 ^{OH}
100		Ile-H	7	vdW	Tyr453, Leu455, Gln493
27D		Tyr-K	59	vdW	Gln474, Ala475, Gly476, Ser477, Thr478
		Tyr ^{OH} -K		HB	Gln474 ^{NE2}
27F		Ser-K	1	vdW	Lys458
32		Tyr-K	28	vdW	Ala475, Gly476, Asn487
		Tyr ^{OH} -K		HB	Ala475 ^O
89		Gln-K	1	vdW	Phe486
91		Tyr-K	30	vdW	Gly476, Phe486, Asn487
		Tyr ^O -K		HB	Asn487 ^{ND2}
92		Tyr-K	40	vdW	Gly476, Ser477, Thr478
		Tyr ^O -K		HB	Asn487 ^{ND2}
		Tyr ^O -K		HB	Ser477 ^N , Ser477 ^{OG}
93		Ser-K	26	vdW	Gly476, Ser477, Thr478, Phe486, Ser487
94		Thr-K	57	vdW	Ser477, Thr478, Phe486, Asn487
		Thr ^{OG1} -K		HB	Thr478 ^{OG1} , Phe486 ^O
96		Pro-K	23	vdW	Phe486
総BSA(Å ²):			669		
Fab 52	残基鎖	BSA (Å ²)	相互作用	RBD	30
28	Thr-H	24	vdW	Val483, Glu484	
30	Thr-H	3	vdW	Glu484, Phe490	
31	Ser-H	66	vdW	Glu471, Gly482, Val483, Glu484, Phe490	
32	Tyr-H	51	vdW	Thr470, Glu471, Ile472, Asn481, Gly482, Val483, Phe490	
	Tyr ^{OH} -H		HB	Gly482 ^O	

10

20

30

40

50

【表14-5】

33	Gly-H	7	vdW	Thr470, Phe490
52	Ile-H	62	vdW	Tyr351, Leu452, Thr470, Phe490, Leu492
53	Met-H	38	vdW	Glu484, Phe490, Leu492
54	Phe-H	110	vdW	Tyr449, Asn450, Leu452, Phe490, Leu492, Gln493, Ser494
55	Gly-H	4	vdW	Leu452
56	Thr-H	57	vdW	Tyr351, Tyr449, Asn450, Leu452
58	Asn-H	10	vdW	Tyr351
64	Gln-H	43	vdW	Arg346
95	Asp-H	2	vdW	Thr470
96	Arg-H	64	vdW	Ile468, Ser469, Thr470, Glu471, Ile472
	Arg ^{NH2} -H		SB	Glu471 ^{OE1} , Glu471 ^{OE2}
97	Gly-H	64	vdW	Ile468, Ser469, Thr470, Glu471
	Gly ^N -H		HB	Thr470 ^{OG1}
98	Asp-H	28	vdW	Asp467, Ile468, Ser469, Thr470, Glu471
	Asp ^{OD1} -H		HB	Ser469 ^{OG}
0	Ser-K	77	vdW	Arg355, Lys356, Arg357
	Ser ^{OG} -K		HB	Arg355 ^O , Arg357 ^N
27	Gln-K	60	vdW	Arg355, Arg357
	Gln ^{OE1} -K		HB	Arg357 ^{NH2}
30	Ser-K	28	vdW	Lys462, Glu465
	Ser ^{OG} -K		HB	Glu465 ^{OE2}
32	Asn-K	19	vdW	Glu465, Arg466, Asp467, Ile468, Ser469
	Asn ^{ND2} -K		HB	Arg466 ^O
91	Gly-K	18	vdW	Ile468
92	Asn-K	56	vdW	Glu465, Arg466, Asp467, Ile468
	Asn ^O -K		HB	Arg466 ^{NH1}
93	Gly-K	22	vdW	Ala352, Arg466, Ile468
94	Phe-K	56	vdW	Tyr351, Ala352, Asn354, Arg466, Ile468
96	Leu-K	5	vdW	Ile468
総BSA(Å ²):		974		

vdW: ファン・デル・ワールス相互作用(カットオフ5.0 Å)

HB: 水素結合(カットオフ3.8 Å)

SB: 塩橋(カットオフ4.0 Å)

10

20

30

40

M u l t a b o d i e s はスパイク配列多様性を克服する

M B がそれらの結合アビディティの増強を介したウイルス逃避に潜在的に抵抗できるか否かを調べるために、本発明者らは、最も力価の高い7つのヒトmAb : 抗体46および52のエピトープ内に位置するL452R(ビン1)、ACE2結合部位内に位置するA475VおよびV483A(ビン2)、ならびに循環RBDバリアントN439K^{3,6}(図13a~c)の結合および中和に及ぼす4つの天然に存在するRBD突然変異^{3,5}の効果を試験した。さらに、N結合型グリコシル化部位であるAsn234をGlnに突然変異させることの影響も評価したが、その理由は、この部位にグリコシル化が存在しないと、RBD^{3,5}を標的とする中和抗体に対する感度が低下することが以前に報告されている

50

からである。より感染性の高い P s V バリアント D 6 1 4 G^{3 7} もパネルに含めた。予想通り、突然変異 L 4 5 2 R は m A b 5 2 および 4 6 の結合および力価を有意に減少させたが、抗体 2 9 8 は突然変異 A 4 7 5 V に対して感受性を示した（図 1 3 b、c）。位置 A s n 2 3 4 における N 結合型グリカンの欠失は、抗体の大部分、特に m A b 4 6、8 0、および 3 2 4 に対するウイルス耐性を増加させ、ウイルス抗原性におけるグリカンの重要性を強調した（図 1 3 c）。驚くべきことに、MB フォーマットにおける以下の抗体特異性は、いずれの S 突然変異によってもその並外れた中和力価において最小限の影響を受けた：2 9 8、8 0、3 2 4、および 2 3 6（図 1 3 d）。突然変異 L 4 5 2 R は、4 6 - MB および 5 2 - MB の感度を低下させたが、それらの親 IgG とは対照的に、これらは、この P s V バリアントに対して中和したままであった（図 1 3 d）。より感染性の高い S A R S - C o V - 2 P s V バリアント D 6 1 4 G は、IgG と MB との両方について野生型 P s V と同様の力価で中和された（図 1 3 c および図 1 4 a）。

10

20

【 0 3 0 9 】

3 つの単一特異性 MB からなる MB カクテルは、力価を有意に失うことなくすべての P s V バリアントにわたって汎中和をもたらし、したがって、対応する IgG カクテルと比較して 100 ~ 1000 倍高い力価を達成した（図 1 3 e および図 1 4 c、d）。単一分子内の幅を達成するために、本発明者らは次に、同じ MB アセンブリにおいて 3 つの異なる F a b を示す多量体化サブユニットを組み合わせることによって三重特異性 MB を生成した（図 1 4 b）。特に、得られた三重特異性 MB は、B . 1 . 3 5 1 P s V バリアントに対するものを含む単一特異性バージョンの並外れた中和力価を維持しながら、汎中和を示した（図 1 3 e、f および図 1 4 c、d）。2 9 8 - 3 2 4 - 4 6 の組み合わせで最も高い力価が観察され（図 1 4 c、e）、三重特異性 MB は、これまでに報告された最も強力な IgG のいくつかで観察されたものを超える並外れた力価を達成し、本発明者らは利用可能な配列から組換え生成した（図 1 3 g）。さらに、MB フォーマットは、P s V および複製 S A R S - C o V - 2 生ウイルス（図 1 3 h）に対してこれらの以前に報告された非常に強力な IgG の力価をさらに 1 ~ 2 枠増加させることができ、したがって MB のプラグアンドプレイ特性およびある範囲の力価にわたって m A b の中和能を増強する多価性の能力を強調した。

20

30

【 0 3 1 0 】

中和の中央値 IC₅₀ について決定された値を、表 1 3 および表 1 5 に要約する。

【 0 3 1 1 】

【 表 1 5 】

表 1 5. M u l t a b o d i e s による S A R S - C o V - 2 中和

Multabody	IC ₅₀ 中央値
VHH-hFerr	0.00011 μg/mL (0.13 pM)
VHH-Fc	1.3 μg/mL (16 nM)
BD23 MB	0.008 μg/mL (3.5 pM)
BD23 IgG	13 μg/mL (87 nM)
4A8 MB	0.052 μg/mL (23 pM)
4A8 IgG	> 100 μg/mL (> 0.66 μM)

40

【 0 3 1 2 】

考察

本研究では、本発明者らは、抗体中和力価およびウイルス突然変異からの耐性を推進する有効な機構として結合アビディティをどのように活用できるかを明らかにする。この目的のために、本発明者らは、タンパク質エンジニアリングを使用して、S A R S - C o V - 2 を標的とする m A b のアビディティを増加させるプラグアンドプレイ抗体多量体化プラットフォームを開発した。7 つの最も強力な MB は、S A R S - C o V - 2 P s V に

50

対して $0.2 \sim 2 \text{ ng/mL}$ ($9 \times 10^{-14} \sim 9 \times 10^{-13} \text{ M}$) の IC₅₀ 値を有し、したがって、本発明者らの知る限り、SARS-CoV-2 に対してこれまでに報告された最も強力な抗体様分子内にある。

【0313】

MB プラットフォームは、開発性の観点から重要な好ましい属性を含むように設計された。第1に、抗体力価を増強する能力は、標的とされる抗体配列、フォーマットまたはエピトープとは無関係である。プラットフォームのモジュール性および柔軟性は、2つの SARS-CoV-2 S サブドメイン (RBD および NTD) 上の重複しない領域を標的とする VHH および複数の Fab の力価を増強することによって例示された。MB を使用して VHH ドメインの力価を増強することは、その小さなサイズが非常に効率的な多量体化を可能にするので、このクラスの分子に特定の価値を提供することができる。第2に、一本鎖可変断片^{38, 39}のタンデム融合によってアビディティを増強する他のアプローチとは対照的に、MB は低い安定性に悩まされず、実際にそれらの親 IgG と同様の凝集温度で非常に安定な粒子に自己組織化する。第3に、ストレプトアビジン⁴⁰、ベロ毒素 B サブユニットスカフォールド⁴¹、またはウイルス様ナノ粒子⁴²のような代替の多量体化戦略は、Fc 断片が存在せず、したがって FcRn 媒介性リサイクルを受けることができないため、免疫原性の課題および / またはバイオアベイラビリティーの低さに直面する。アポフェリチンの軽鎖は完全にヒトであり、生物学的に不活性であり、Fc ドメインを含むように操作されており、> 24 の Fab / Fc 断片の多量体化にもかかわらず、IgM に類似する Rh を有する。したがって、サロゲートマウス MB はマウスにおいて抗薬物抗体を誘発せず、その親 IgG と同様のものが1週間にわたって血清中に検出可能であった。しかしながら、MB のインビボバイオアベイラビリティーは、Fc Rに対するその結合アフィニティーに依存しており、MB の臨床への効率的な翻訳のために Fc アビディティを慎重に微調整する必要があることを示唆している。さらに、SARS-CoV-2 感染の場合の肺などの関心のある解剖学的部位において MB がどのように分布するかを評価するために更なる研究が必要とされる。バイオアベイラビリティーがエフェクター機能、例えばヒト血清アルブミン⁴³、またはヒト血清アルブミン^{44, 45}に結合する結合部分を欠く唯一の所望の形質である場合、Multi antibody のプラグアンドプレイの性質は、Fc 以外の代替の半減期延長部分の探索にも役立つ。

【0314】

SARS-CoV-2 に対する MB で試験した異なる mAb 配列について、中和力価の異なる增加が観察された。これは、MB が力価を増強する能力は、スパイク上のエピトープ位置、または Fab が抗原とどのように係合して中和を達成するかの幾何学的形状に依存し得ることを示唆している。20個のうち2個の SARS-CoV-2 RBD バインダーの中和が MB プラットフォームによって救済されなかつたという事実は、mAb 配列および結合特性のみに基づく制限を示唆している。それにもかかわらず、MB が SARS-CoV-2 スパイク上のある範囲のエピトープ特異性にわたってアビディティを中和力価に変換する能力は、この技術を広く使用する可能性を強調している。HIV-1⁴⁶ のような低い表面スパイク密度を有するウイルスに対する、または従来の抗体の二価性がそれらの効率的な活性化⁴⁷を制限する腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーのような他の標的に対する MB プラットフォームの力価増強能力を調べることは興味深いであろう。

【0315】

ウイルス逃避は、処置からの選択圧に応答して、または自然選択中に生じ得る。逃避バリアントと戦うための従来のアプローチは、異なるエピトープを標的とする抗体カクテルの使用である。MB は、おそらくアフィニティーの喪失が結合アビディティの増強によって補償されたため、それらの親 IgG と比較して S 突然変異に対する感受性が低いことを示した。したがって、カクテルに使用した場合、MB は、並外れた力価でウイルス配列多様性を克服した。さらに、分割 MB 設計は、単一の多量体化分子内の複数の抗体特異性の組み合わせを可能にし、MB カクテルと同様の力価および幅をもたらす。重要なことに、いくつかの mAb^{21, 22, 23} の中和から逃避することができる関心対象の B.1.3

10

20

30

40

50

51 突然変異株は、三重特異性 Multobody によって高い力値で中和され、したがって、ウイルス逃避に抵抗するこれらの分子の能力をさらに強調する。同じ粒子内の多重特異性は、mAb の正しい組み合わせに対する S 内アビディティおよび相乗効果などの追加の利点を提供し、MB 上の mAb 特異性の異なる組み合わせの更なる調査のための段階を設定することができる。アビディティおよび多重特異性を活用して、ベータコロナウイルスなどのウイルス属全体で強力に中和する単一分子を送達することもできる。

【0316】

全体として、MB プラットフォームは、広範な抗体発見またはエンジニアリング努力を経ながら、抗体アフィニティー限界を超えて、広く強力な中和分子を生成するためのツールを提供する。このプラットフォームは、世界的に健康上重要な感染症に対する最も強力な生物製剤の発見までのタイムラインを加速するために結合アビディティをどのように活用できるかの例である。10

【0317】

参考文献

- Connor, E. M. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* 102, 531-537 (1998).
- Mulangu, S. et al. A randomized, controlled trial of Ebola virus disease therapeutics. *N. Engl. J. Med.* 381, 2293-2303 (2019). 20
- Ju, B. et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* 584, 115-119 (2020).
- Liu, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 584, 450-456 (2020).
- Wang, C. et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* 11, 2251 (2020).
- Zost, S. J. et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature* 584, 443-449 (2020).
- Baum, A. et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science* 369, 1014-1018 (2020). 30
- Hansen, J. et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science* 369, 1010-1014 (2020).
- Lv, Z. et al. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody. *Science* 369, 1505-1509 (2020).
- Tortorici, M. A. et al. Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms. *Science* 370, 950-957 (2020). 40
- Zhou, D. et al. Structural basis for the neutralization of SARS-CoV-2 by an antibody from a convalescent patient. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 950-958 (2020).
- Cao, Y. et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells. *Cell* 182, 73-84 (2020).
- Chi, X. et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science* 369, 650-655 (2020).
- Seydoux, E. et al. Analysis of a SARS-CoV-2-infected individual. 50

- dual reveals development of potent neutralizing antibodies with limited somatic mutation. *Immunity* 53, 98-105 (2020).
15. Pinto, D. et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature* 583, 290-295 (2020).
16. Barnes, C. O. et al. Structures of human antibodies bound to SARS-CoV-2 spike reveal common epitopes and recurrent features of antibodies. *Cell* 182, 828-842.e16 (2020).
17. Shi, R. et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature* 584, 120-124 (2020).
18. Rogers, T. F. et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science* 369, 956-963 (2020). 10
19. Brouwer, P. J. M. et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science* 369, 643-650 (2020).
20. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE 2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181, 271-280 (2020).
21. Wang, P. et al. Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host Microbe*. 29, 747-751.e4 20 (2021).
22. Wu, K. et al. mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants. Preprint at bioRxiv (2021).
23. Wibmer, C. K. et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat. Med.*, 622-6 25 (2021).
24. Rambaut, A. et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. Preprint at <https://virological.org/t/preliminarygenomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-ofspike-mutations/563> (2020). 30
25. Tegally, H. et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248640> (2020).
26. Faria, N. R. et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. 372, 815-821 (2021).
27. Naveca, F. et al. Phylogenetic relationship of SARS-CoV-2 sequences from Amazonas with emerging Brazilian variants harboring mutations E484K and N501Y in the spike protein. Preprint at <https://virological.org/t/phylogenetic-relationship-of-sars-cov-2-sequences-from-amazonas-with-emerging-brazilian-variants-harboring-mutations-e484k-and-n501y-in-the-spike-protein/585> (2021). 40
28. Wu, H. et al. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *J. Mol. Biol.* 350, 126-144 (2005).
29. Icenogle, J. et al. Neutralization of poliovirus by a monoclonal antibody: kinetics and stoichiometry. *Virology* 127, 412-425 (1983). 50

30. Cavacini, L. A., Emes, C. L., Power, J., Duval, M. & Posner, M. R. Effect of antibody valency on interaction with cell-surface expressed HIV-1 and viral neutralization. *J. Immunol.* 152, 2538-2545 (1994).
31. Wrapp, D. et al. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. *Cell* 181, 1004-1015.e15 (2020).
32. Li, W. et al. High potency of a bivalent human VH domain in SARS-CoV-2 animal models. *Cell* 183, 1-13 (2020).
33. Lawson, D. M. et al. Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature* 349, 541-544 (1991). 10
34. Radomsky, M. L., Whaley, K. J., Cone, R. A. & Saltzman, W. M. Macromolecules released from polymers: diffusion into unstirred fluids. *Biomaterials* 11, 619-624 (1990).
35. Li, Q. et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell* 182, 1284-1294 (2020).
36. Thomson, E. C. et al. Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity. *Cell* 185, 1171-1187.e20 (2021). 20
37. Korber, B. et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell* 182, 812-827 (2020).
38. Miller, K. et al. Design, construction, and in vitro analysis of multivalent antibodies. *J. Immunol.* 170, 4854-4861 (2003).
39. Kipriyanov, S. M. et al. Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics. *J. Mol. Biol.* 293, 41-56 (1999).
40. Kipriyanov, S. M. et al. Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Eng.* 9, 203-211 (1996). 30
41. Zhang, J. et al. Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *J. Mol. Biol.* 335, 49-56 (2004).
42. Hoffmann, M. A. G. et al. Nanoparticles presenting clusters of CD4 expose a universal vulnerability of HIV-1 by mimicking target cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 117, 18719-18728 (2020).
43. Sleep, D., Cameron, J. & Evans, L. R. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 5526-5534 (2013). 40
44. van Faassen, H. et al. Serum albumin-binding VHFs with variable pH sensitivities enable tailored half-life extension of biologics. *FASEB J.* 34, 8155-8171 (2020).
45. Adams, R. et al. Extending the half-life of a fab fragment through generation of a humanized anti-human serum albumin Fv domain: an investigation into the correlation between affinity and serum half-life. *MAbs* 8, 1336-1346 (2016).
46. Zhu, P. et al. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. 50

- ions. Proc. Natl Acad. Sci. USA 100, 15812-15817 (2003).
47. Wajant, H. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. Cell Death Differ. 22, 1727-1741 (2015).
48. Schlothauer, T. et al. Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. Protein Eng. Des. Sel. 29, 457-466 (2016).
49. Crawford, K. H. D. et al. Protocol and reagents for pseudotyping lentiviral particles with SARS-CoV-2 spike protein for neutralization assays. Viruses 12, 513 (2020).
50. Banerjee, A. et al. Isolation, sequence, infectivity, and replication kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. Emerg. Infect. Dis. 26, 2054-2063 (2020). 10
51. Marr, C. R., Benlekbir, S. & Rubinstein, J. L. Fabrication of carbon films with ~500nm holes for cryo-EM with a direct detector device. J. Struct. Biol. 185, 42-47 (2014).
52. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. CryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. Nat. Methods 14, 290-296 (2017).
53. Zi Tan, Y. et al. Addressing preferred specimen orientation in single-particle cryo-EM through tilting. Nat. Methods 14, 793-7 20 96 (2017).
54. Zivanov, J. et al. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. Elife 9, e42166 (2018).
55. Scheres, S. H. W. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. J. Struct. Biol. 180, 519-530 (2012).
56. Punjani, A. & Fleet, D. J. 3D variability analysis: Resolving continuous flexibility and discrete heterogeneity from single particle cryo-EM. J. Struct. Biol. 213, 107702 (2021).
57. Punjani, A., Zhang, H. & Fleet, D. J. Non-uniform refinement: adaptive regularization improves single-particle cryo-EM reconstruction. Nat. Methods. 17, 1214-1221 (2020). 30
58. Grant, T., Rohou, A. & Grigorieff, N. CisTEM, user-friendly software for single-particle image processing. Elife 7, e35383 (2018).
59. Asarnow, D., Palovcak, E. & Cheng, Y. asarnow/pyem: UCSF pyem v0. 5 (Zenodo, 2019).
60. Kabsch, W. et al. XDS. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 66, 125-132 (2010).
61. McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40, 658-674 (2007). 40
62. Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66, 213-221 (2010).
63. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 66, 486-501 (2010).
64. The PyMol Molecular Graphics System, Version 1.8 (Schroedinger, LLC., 2015).
65. Morin, A. et al. Collaboration gets the most out of software. Elife 2, e01456 (2013). 50

66. Lan, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581, 215-220 (2020).

67. Yuan, M. et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 368, 630-633 (2020).

68. Piccoli, L. et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell* 183, 1024-1042.e21 (2020).

69. Hurlburt, N. K. et al. Structural basis for potent neutralization of SARS-CoV-2 and role of antibody affinity maturation. *Nat. Commun.* 11, 5413 (2020). 10

70. Barnes, C. O. et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature* 588, 682-687 (2020).

71. Yuan, M. et al. Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. *Science* 369, 1119-1123 (2020).

72. Hansen, J. et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science* 369, 1010-1014 (2020).

【0318】

20

実施例 2

ウイルス產生およびシードウイルス中和アッセイ

HIVベースのレンチウイルスシステムをほとんど改変することなく前述⁴⁴のように使用して、SARS-CoV-2シードタイプ化ウイルス(PsV)を生成した。簡潔には、293T細胞を、ルシフェラーゼレポーター遺伝子(BEINR52516)をコードするレンチウイルス骨格、スパイク(BEINR52310)を発現するプラスミド、ならびにHIV構造および調節タンパク質Tat(BEINR52518)、Gag-pol(BEINR52517)およびRev(BEINR52519)をコードするプラスミドで同時トランスフェクトした。37でのトランスフェクションの24時間後、5mM酪酸ナトリウムを培地に添加し、細胞を30でさらに24~30時間インキュベートした。KOD-Plus突然変異誘発キット(東洋紡、大阪、日本)を使用して、PsV突然変異を生成した。SARS-CoV-2スパイクバリアントの関心対象のるB.1.117、B.1.351、P.1およびB.1.617.2は、David Ho(コロンビア大学)の厚意により提供された。293T-ACE2細胞(BEINR52511)を使用して、1サイクル中和アッセイで中和を決定した。Briteelite plus試薬(PerkinElmer社)を細胞に添加し、Synergy Neo2 Multi-Mode Assay Microplate Reader(Biotek Instruments社)を使用して相対発光量(RLU)で発光を測定することによって、PsV中和を監視した。IC₅₀上昇を、IgGIC₅₀(μg/mL)/MBIC₅₀(μg/mL)として計算した。各々2回の技術的反復実験を伴う2~3回の生物学的反復実験を行った。

30

40

【0319】

結果

mAb 52における配列ライアビリティーの同定

リードVH/VL配列のin silico分析により、位置N92におけるmAb 52のCDRL3中の脱アミド部位が同定された。mAb中の脱アミド部位は、結合動態の変化および製剤中の不均一性の両方に寄与し得る。この潜在的効果を回避するために、本発明者らは、アスパラギン残基をトレオニン(N92T)に突然変異させたバリアントを生成した。図15は、N92T突然変異が、IgGとしても、野生型シードウイルス中和アッセイにおける单一特異性MBとしても、力価に影響を及ぼさなかったことを示す。

50

続けて、mAb 52 の VL 中に N92T 突然変異を含む 298-80-52 三重特異性 MB を PsV 中和アッセイでスクリーニングし、その結果、親三重特異性 MB と比較して、力値の喪失は観察されないことを確認したことを示す（図 16）。

【0320】

関心対象のバリエントにわたる三重特異性 MB の中和

例示的な三重特異性 MB 298-80-52 を、シュードウイルス中和アッセイにおいて関心対象のバリエント（VOC）にわたる力値について評価した。表 16 および図 17 に示すように、この MB は VOC 全体で活性を保持し、野生型、B.1.1.7、B.1.351 および PsV アッセイでの平均 IC₅₀ は約 0.2 ng/ml [97fM] であったが、対応する IgG カクテルは 91 ng/ml [0.61 nm] の平均 IC₅₀ を有していた（n = 5 実験）。これは、ng/ml で約 200 ~ 1000 倍またはモル濃度で約 3000 ~ 16000 倍の力値の増加を表す。これらの結果は、三重特異性 MB が並外れた効力で SARS-CoV-2 のウイルス逃避を克服する能力を強調している。

【0321】

【表 16】

表16.

PsV	三重特異性 MB	IgG カクテル	力値の上昇倍数	三重特異性 MB	IgG カクテル	力値の上昇倍率
	IC ₅₀ (μg/ml)	IC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	
野生型	4.10E-04	9.52E-02	232	1.87E-04	6.34E-01	3401
B.1.351	1.94E-04	4.02E-02	207	8.82E-05	2.68E-01	3037
B.1.1.7	1.16E-04	8.51E-02	733	5.28E-05	5.67E-01	10749
P.1	1.30E-04	1.47E-01	1130	5.92E-05	9.81E-01	16577
平均	2.13E-04	9.19E-02	576	9.67E-05	6.13E-01	8441

【0322】

配列表

20

30

40

50

【化16】

配列番号1 hFerritinLC

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLQASYT~~Y~~SLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLL
KMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETH
FLDEEVKLIK~~K~~MGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD

配列番号2 リンカー1

GGGGSGGGGS~~GGGG~~GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGG

10

配列番号3 VHH-hFerr

(下線はリンカー配列を示す; 太字はhFerritinLCを示す)

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEYAMGWFRQAPGKERE~~V~~FATISWSGGSTYYTDSVK
GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPD~~T~~AVYYCAAAGLTVVSEWDYDYWGQGTQVTVSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLQASYT~~Y~~SLGFYFDRDDV
ALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKL
NQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIK~~K~~MGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLR
HD

20

配列番号4 VHH-Fc

(下線はリンカー配列を示す)

30

40

50

【化 1 7】

QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSEYAMGWFRQAPGKEREVATISWSGGSTYYTDSVK
GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPDDTAVYYCAAAGLTVSEWDYDYWGQGTQVTVSSGSDKT
HTCPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALNHYTQKSLSLSPKG

配列番号 5 N-hFerritinLC

MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLL
KMQNQRGGRALFQDIIKKPAEDEW

10

配列番号 6 C-hFerritinLC

GKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGG
PFAGI GEYI FERI TI RHD

配列番号 7 シグナル配列

MGILPSPGMPALLSLVSLLSVLLMGCV

配列番号 8 リンカー 1

配列番号 9 リンカ=2

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

20

配列番号 10 BD23-scFab-hFerritinLC

(下線はリンカー配列を示す;太字はhFerritinLCを示す)

30

配列番号11 BD23のV_K

40

【化 1 8】

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQSISWWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS
GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQQNSYPYTFGQGTKEIK

配列番号12 BD23のV_H

QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYFTTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGF
TGRFVFSLDTSVATAYLQISSLKAEDTAVYYCARPQGGSSWYRDYYYGMDVWGQGTTVTVSS

配列番号 13 BD23-scFab-C_hFerritinLC

(下線はリンカー配列を示す; 太字はC_hFerritinLCを示す)

10

LEDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISWLA~~WYQQKPGKAPKL~~IYKASSLESGVPSRFS~~GSG~~
SGTEFTLTSSLQPDDFATYYCQQYNSPYTFGQGT~~KLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVCL~~
LNNFYPREAKVQW~~KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY~~LSSTL~~SKADYEKHKVYACEVTHQGL~~
~~SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG~~
~~GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSQVQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYTFTSYAMNWVRQA~~
PGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSV~~STAYLQISSLKAEDTAVYYCARPQGGSSWY~~
RDYYYYGMDVWGQGTTVSSASTKGPSVFLAPSSK~~STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGA~~
TSGVHTFP~~AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGG~~
~~SGGGGSGGGGSGGGGSGGGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFL~~
DEEV~~VKLIKMGDHNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLRHD~~

20

配列番号 14 scFc-N_hFerritinLC

(下線はリンカー配列を示す; 太字はhFerritinLCを示す)

30

配列番号15 scFc(LALAP)

(野生型Fcと比較して突然変異している残基に囲いを設ける)

40

DKTHTCPPCPA**EAA**GGPSVFLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAGQPREPVYTLPP

50

【化 1 9】

SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 16 4A8-scFab-hFerritinLC

(下線はリンカー配列を示す; 太字はhFerritinLCを示す)

10

配列番号17 4A8のV_K

20

EIVMTQSPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFGVPDRFS
GSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCTQATQFPYTFGGQGKTVDIK

配列番号 18 4A8のV_H

EVQLVESGAEVKPGASVKVSKCVSGYTLTELSMHWRQAPGKGLEWMGGFPEDGETMYAQKF
QGRVTMTEDTSTDAYMELSSRLSEDATAVYYCATSTAVAGTPDLFDYYYYGMDVWGGTTVSS

配列番号19 4A8-scFab C_hFerritinLC

(下線はリンカー配列を示す; 太字はC_hFerritinLCを示す)

20

40

【化 2 0】

配列番号20 mFerritin

MTSQIRQNYSTEVAAVNRLVNLHLRASYTYLSGFFFDRDDVALEGVGHFRELAEEKREGAERR
EFQNDRGGRALFQDVQKPSQDEWGKTQEAMEAALAMEKNLNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLES
HYLDKEVKLIKKMGNHLTNRRVAGPQPAQTGAPQGSLGEYLFERLTLKH

配列番号 21 HD37-sclgG

(下線はリンカー配列を示す)

10

20

30

配列番号 22 IgG2a Fc_mFerr

(下線はリンカー配列を示す;太字はmFerritinを示す)

KPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHTAQTQ
THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEE
MTKKQVTLCMVTDFMPEDIYVEWTNNKGTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWERNSY
SCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPKGGGSSGSGSGSTGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGGGGG
SGGGGSAGGTATAGASSGSGSSSSGGTGKPCPPCKCPAPNLLGGPSVIFPPKIKDVLMSLSP
IVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLCMVTDFMPEDIYVEWTNNKGTELNY
KNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKSRASTASSAS
SGGGGGSGGSGGGSGGSMTSQIRQNYSTEAAVNRLVNLHLRASYTYLSLGFFFDRDDVALEGV
GHFFRELAEKREGAERLLEFQNDRGGRALFQDVQKPSQDEWGKTQEAMEAALAMEKNLNQALL
DLHALGSARTDPHLCDFLESHYLDKEVKLIKMGHNLTNLRRVAGPQPAQTGAPQGSLGEYLFER
LTLKHD

配列番号 23 scFc-N-hFerr LALAP I253A

(下線はリンカー配列を示す; 太字はhFerritinLCを示す。囲いは、野生型IgG1 Fcに対して突然変異している残基を示す)

40

【化 2 1】

10

配列番号 24 野生型ヒト IgG1 Fc

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMIHEALHNHYTQKSLSLSPKG

20

配列番号 25 抗体 56 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLIIYDASNQLSGVPSRSGSGS
GTDFTLTSSLQPEDFATYYCQQANSFPSTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

20

配列番号 26 抗体 56 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQ
GRVTMTRDTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARDIGPIDYWQQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDVFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYIC
NVNHPKSNTKVDKVKEPKSC

30

配列番号 27 抗体 349 軽鎖

DIQMTQSPPSSLASVGDRVITCRASQSISSWLAZYQQKPGKAPKLLIYDTSNLETGVPSRSGSGS
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPWTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

40

配列番号 28 抗体 349 重鎖

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWSGISSAGSITNYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGNHAGTTVSEYFQHWGQGTLTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYPFEPPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQQSSGLYSLSSVTPSSL
GTQTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSC

50

【化22】

配列番号29 抗体178 軽鎖

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSGTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSG
 SGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCLQTHSYPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVCL
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFRGEC

配列番号30 抗体178 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTDYHMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKF
 QGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDISSWYEITKFDPWGQGTLTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSL
 GTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSC

10

配列番号31 抗体108 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVITNNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLETGVPSRFSGSGSG
 TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFRGEC

20

配列番号32 抗体108 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFSRYAIHWVRQAPGQGLEWMGMNPISGNTDYAPNFQ
 GRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKDGSQLAYLVEYFQHWGQGTLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSL
 LGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSC

30

配列番号33 抗体128 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANGFPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVCL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFRGEC

30

配列番号34 抗体128 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTHYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSSSASYSQKFQ
 GRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGRYGSYSYFPDYWGQGTLTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSL
 GTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKSC

40

配列番号35 抗体160 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVCL

50

【化23】

NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

配列番号 36 抗体 160 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGAVKVSKASGYTFTGHDMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSQAQKFQ
GRVTMTRDTSTSTVYMEPLLSEDTAVYYCARANSLRYYGMDVWGQGTMVTSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10

配列番号 37 抗体 368 軽鎖

DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLHSNGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLSNRASGVPDFR
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPATFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

20

配列番号 38 抗体 368 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGSSKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGAIMPMFGTANYAQKFQ
GRVTITADESTSTAYMEPLLSEDTAVYYCARGSSGYYYGWGQGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

20

配列番号 39 抗体 192 軽鎖

DIVMTQSPLSLPVTPGEPAISCRSSQSLHSNGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYAASSLQSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLNNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEV
HQGLSSPVTKSFNRGEC

30

配列番号 40 抗体 192 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGSSKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMWINPNSSGANYAQKF
QGRVTITADESTSTAYMEPLLSEDTAVYYCSTYYDSSGYSTDWGQGTLVTSSASTKGPSVF
LAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

30

配列番号 41 抗体 158 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSIISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRFSGSGS
GTDFTLTSSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

40

配列番号 42 抗体 158 重鎖

50

【化24】

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPLNGGTNFAPKF
 QGRVTMTRDTSTVYMEPLLSEDTAVYYCARDPGGSYSNDAFDIWGQGTLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

配列番号43 抗体180軽鎖

DIVMTQSPLSLPVTGPAPASCRSSQSLHSNGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYAASSLQSGVPDRFS
 GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYSSPYTFGQGTLKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC

10

配列番号44 抗体180重鎖

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQGLEWMGRISPRSGGTKYAQRF
 QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREAVAGTHPQAGDFDLWGRGTLTVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

配列番号45 抗体254軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQIGVPSRFSGSGSG
 TDFTLTISLQPEDFATYYCLQSYSTPPWTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC

20

配列番号46 抗体254重鎖

EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVSAIGTGGDTYYADSVKG
 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDGYNFYFDYWQGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

30

配列番号47 抗体120軽鎖

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSG
 SGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYYTPRTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
 LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC

40

配列番号48 抗体120重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGMIDPSGGSTSQAQKFQ
 GRVTMTRDTSTVYMEPLLSEDTAVYYCAKDFGGGTRYDYWYFDLWGRGTLTVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

50

【化25】

配列番号 49 抗体 64 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISSHAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSTPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFRGEC

配列番号 50 抗体 64 重鎖

EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSQHGMHWVRQAPGKGLEWVSAIDRSGSYIYYADSVK
 GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTYGGKVTYFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
 QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10

配列番号 51 抗体 298 軽鎖

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDR
 FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 52 抗体 298 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGTFSTYGISWVRQAPGQGLEWMGWISPNSGGTDLAQKFQ
 GRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASDPRDDIAGGYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

20

配列番号 53 抗体 82 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQVISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS
 TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSFSPPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC

30

配列番号 54 抗体 82 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGGSFSTAFYWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQKF
 QGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSRALYGSFSYFDYWGQGTLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

配列番号 55 抗体 46 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFRGEC

40

50

【化26】

配列番号56 抗体46重鎖

EVQLLESGGGLVQPGRLSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIYSGGSTYYADSVKG
 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSRDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSC

配列番号57 抗体324軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIITLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSG
 TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPFGQGKTVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFRGEC

10

配列番号58 抗体324重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFNNYGISWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQK
 FQGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARVGDYGDIYSPFDLWGRGTLTVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVP
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSC

20

配列番号59 抗体236軽鎖

DIVMTQSPSLSPVTPGEPAISCRSSQSLLHSNGNYLDWYLQKPGQSPQQLIYLSNRASGVPDFR
 SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
 SVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

30

配列番号60 抗体236重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFTSYGINWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKF
 QGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASRGIQLLPRGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSS
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSC

30

配列番号61 抗体52軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNGFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFRGEC

配列番号62 抗体52軽鎖N92T

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQG~~T~~GFPLTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL

40

50

【化27】

NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFRGEC

配列番号 63 抗体 52 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTTNYAQKFQ
GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRGDTIDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

10

配列番号 64 抗体 80 軽鎖

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDF
FSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSAPLITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

配列番号 65 抗体 80 重鎖

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFNRYAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQ
GRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTRELPEVVDWYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

【0323】

均等物 / 他の実施形態

本発明をその特定の実施形態に関連して説明してきたが、本発明は更なる修正が可能であり、本出願は、一般に、本発明の原理に従い、本発明が関係する技術分野内の既知のまたは慣習的な実施に含まれ、前で記載される本明細書の本質的な特徴に適用され得る本開示からの逸脱を含む、本発明の任意の変形、使用、または適合を網羅することを意図していることが理解されるであろう。

30

40

50

【図面】

【図1】

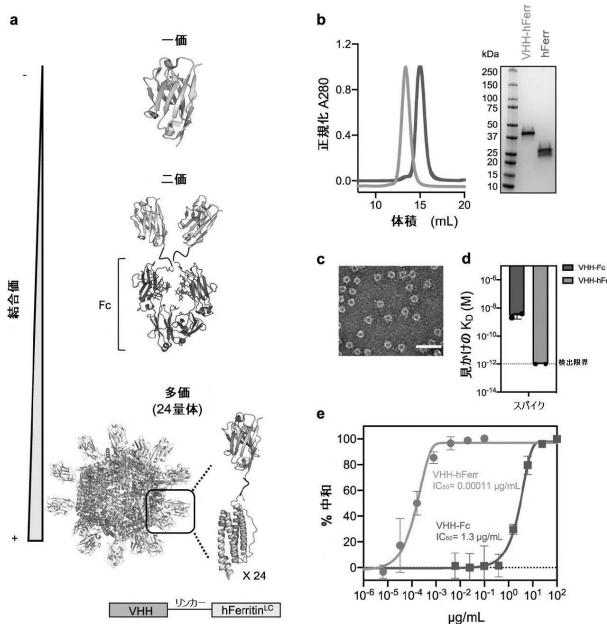


Figure 1

10

20

30

40

50

【図2 a】

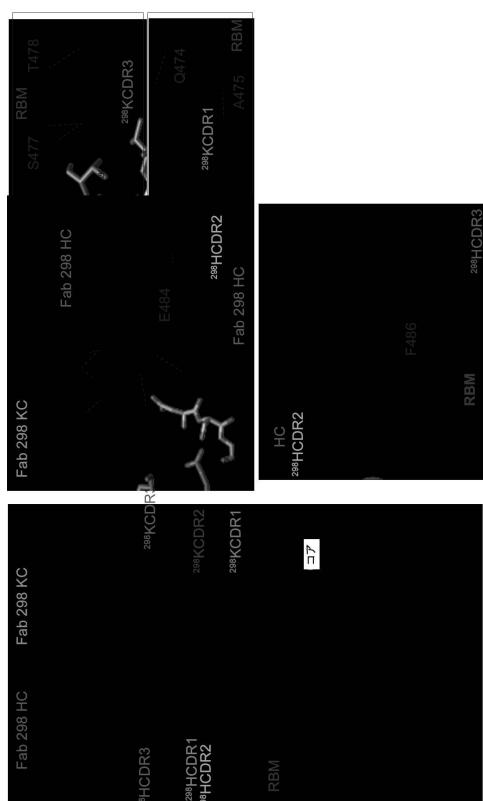


Figure 2a

10

20

30

40

50

【図2 b】

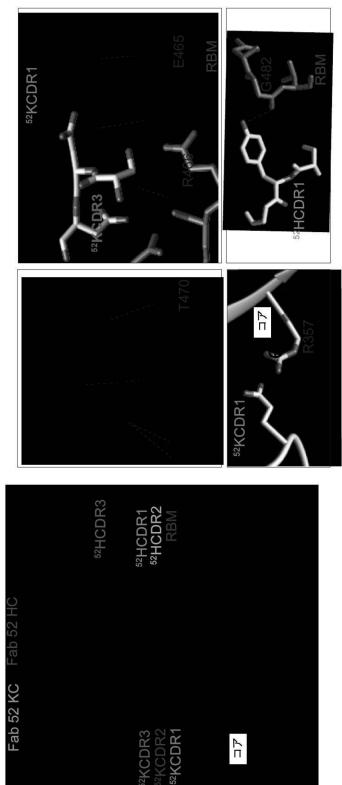


Figure 2b

【図2 c - 2 d】

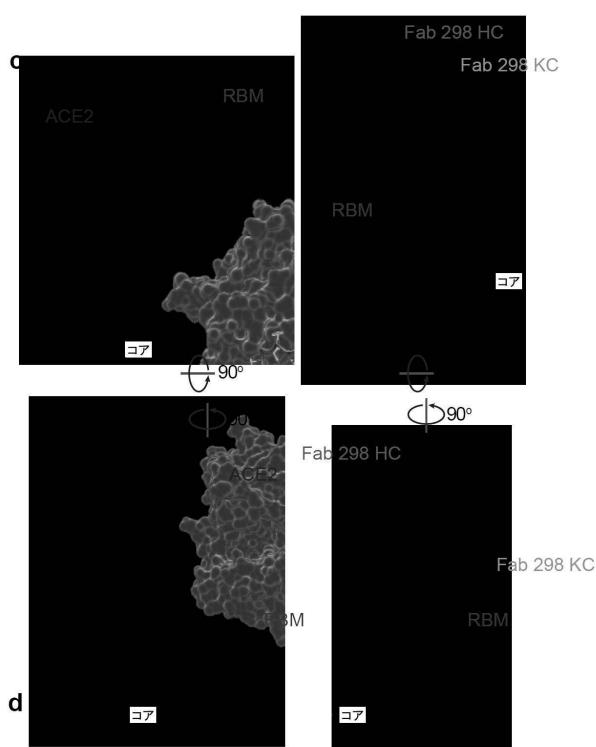


Figure 2cおよび2d

【図2 e】

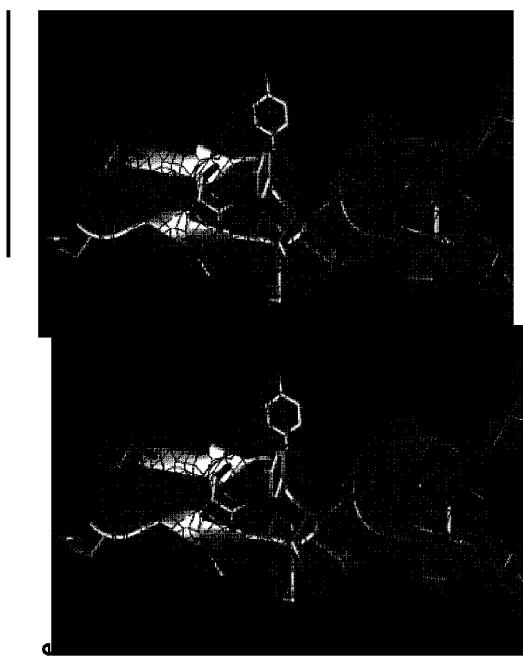


Figure 2e

【図2 f】

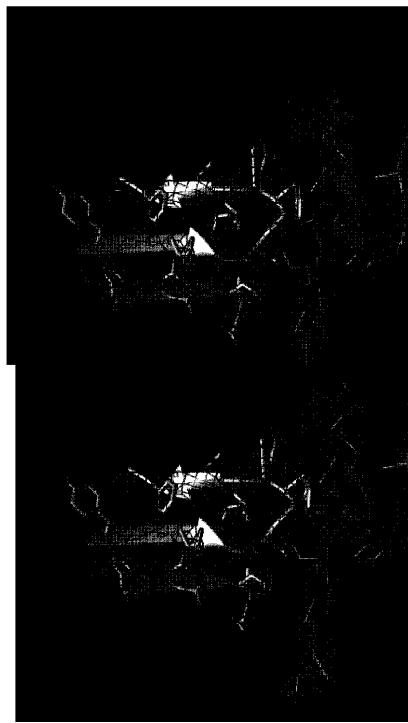


Figure 2f

10

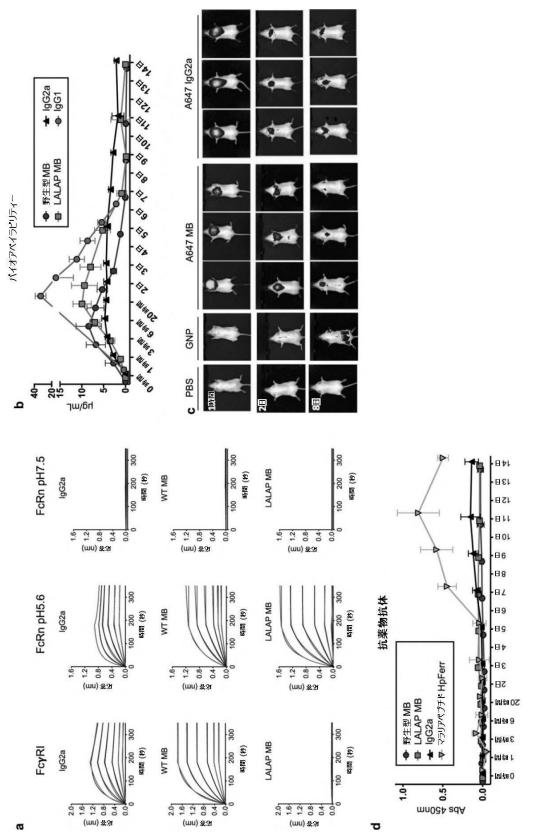
20

30

40

50

【図3】



【図4】

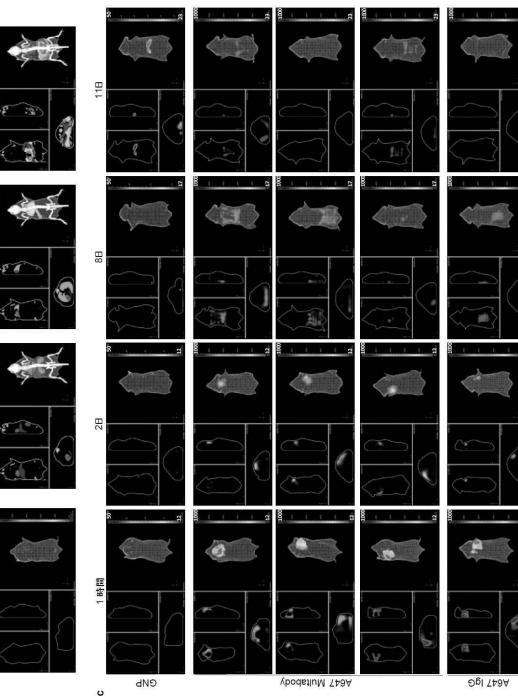


Figure 4

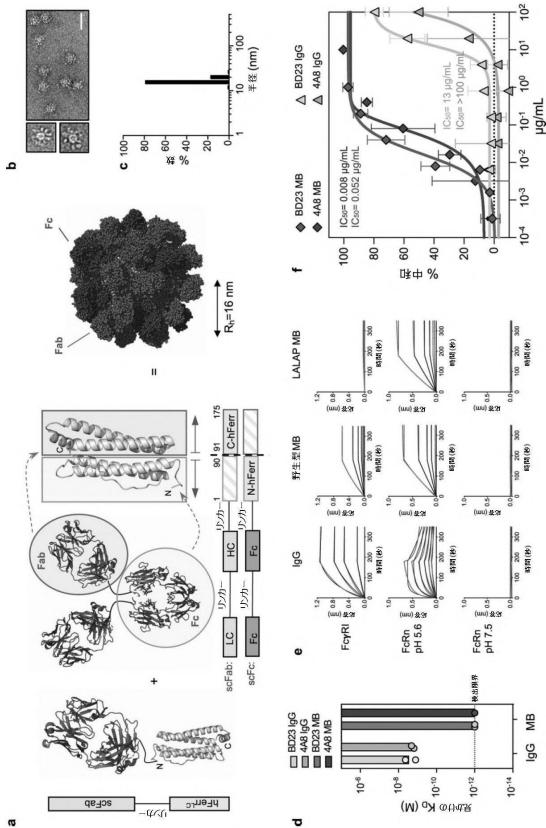
10

20

30

40

【図5】



【図6】

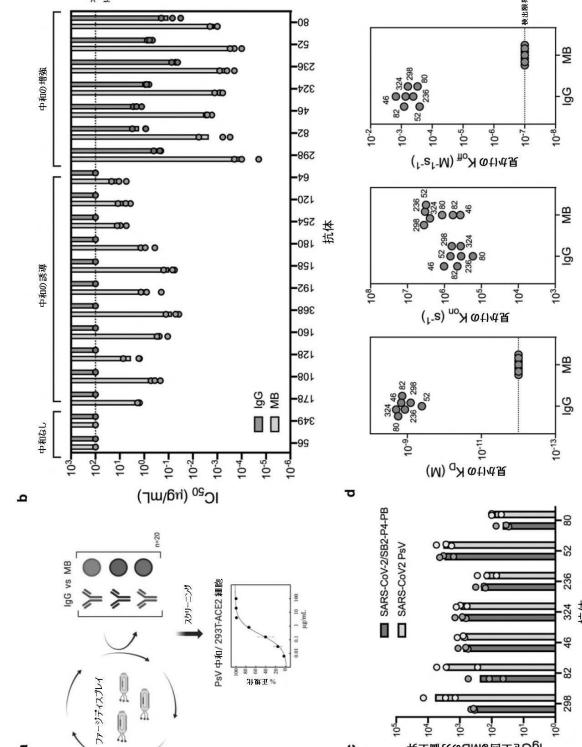


Figure 6

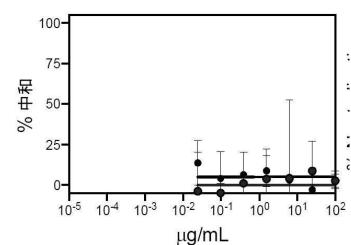
50

【図 7 a - 1】

a

中和なし

56



349

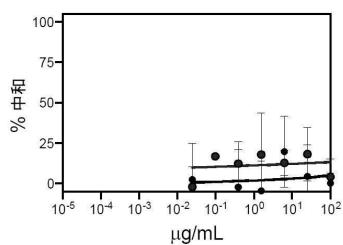


Figure 7a (パート1)

【図 7 a - 3】

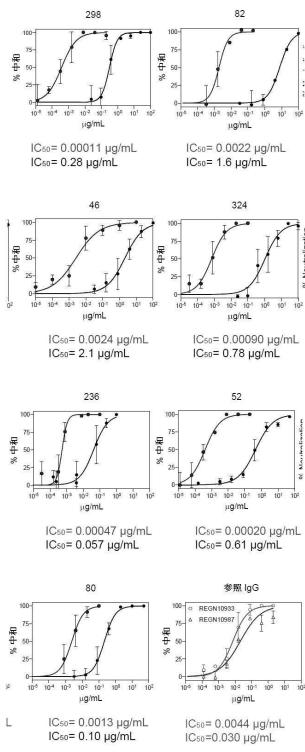


Figure 7a (パート3)

【図 7 a - 2】

10

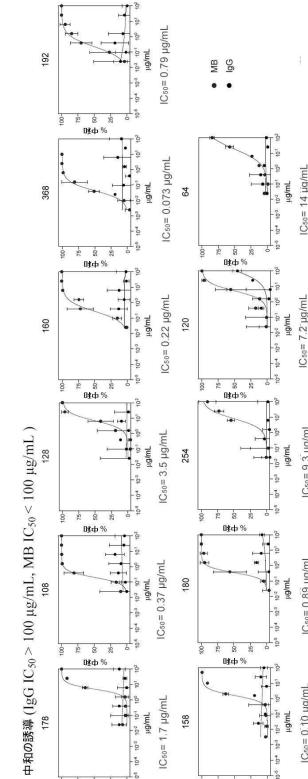
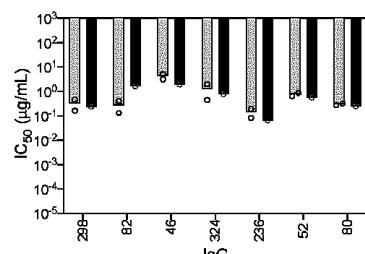


Figure 7a (パート2)

20

【図 7 b】

bHeLa-ACE2
293T-ACE2

30

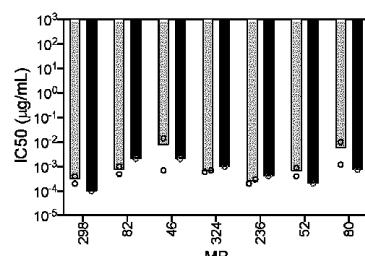


Figure 7b

40

50

【図 7 c】

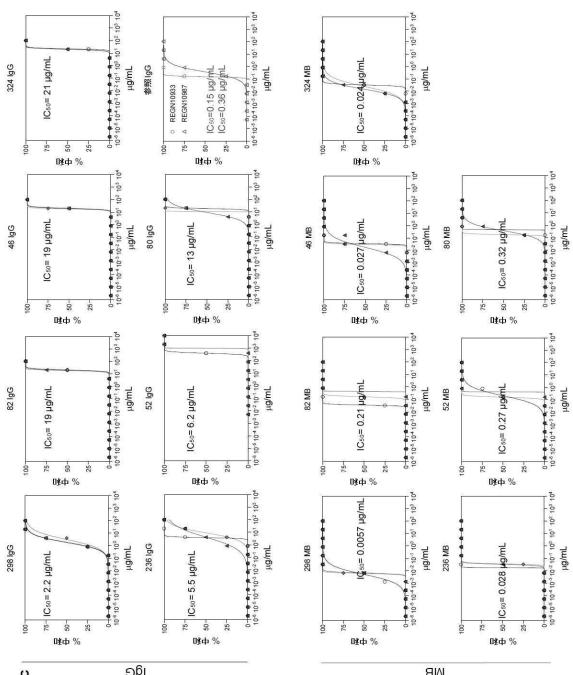


Figure 7c

【図 8】

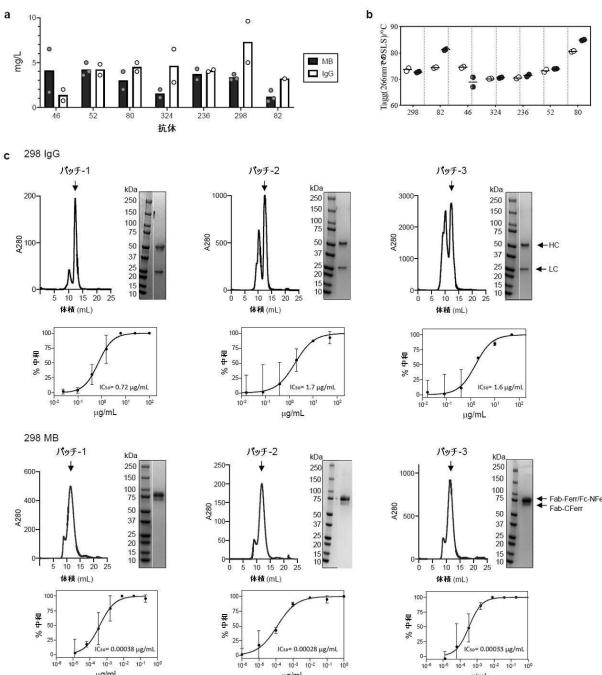


Figure 8

10

20

30

40

【図 9 - 1】

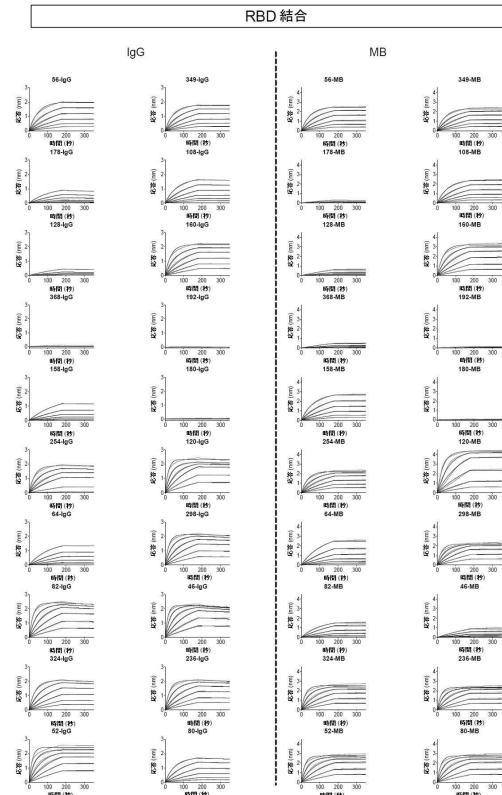


Figure 9 (- 1)

【図 9 - 2】

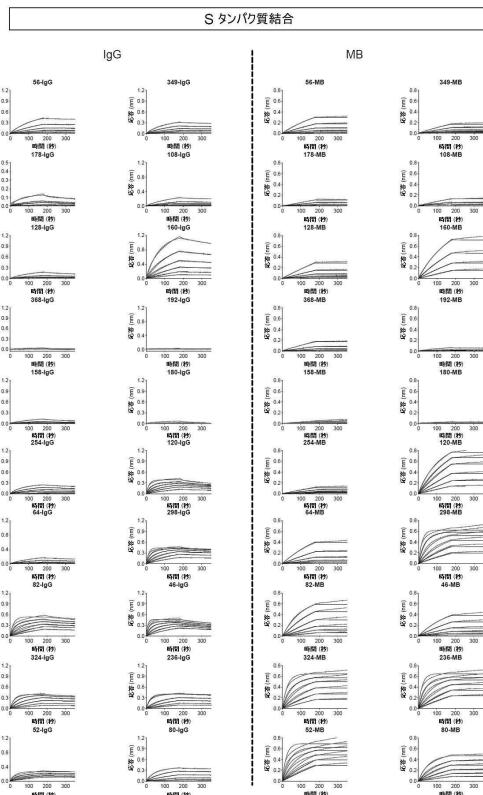
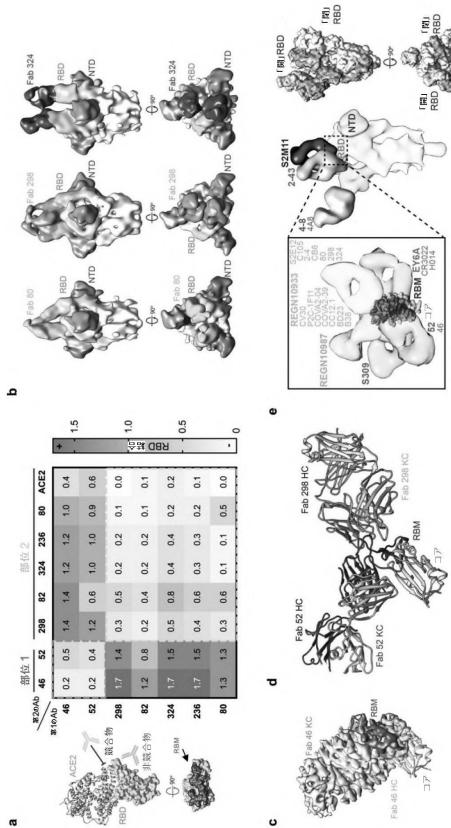


Figure 9 (- 2)

50

【 図 1 0 】



【図12a】

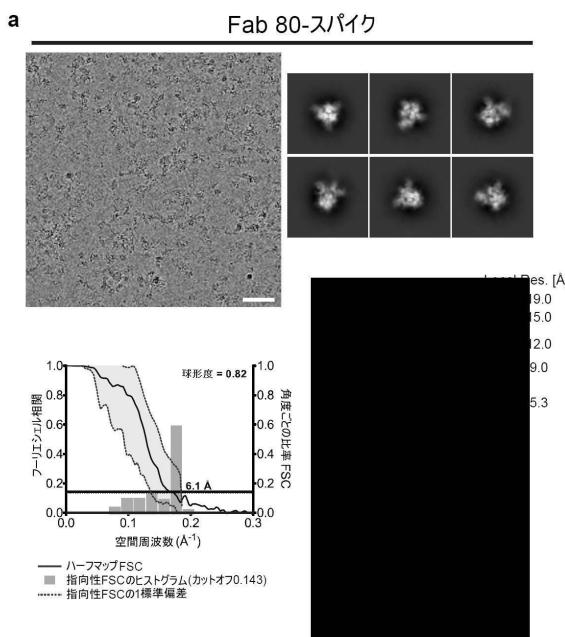


Figure 12a

【 図 1 1 】

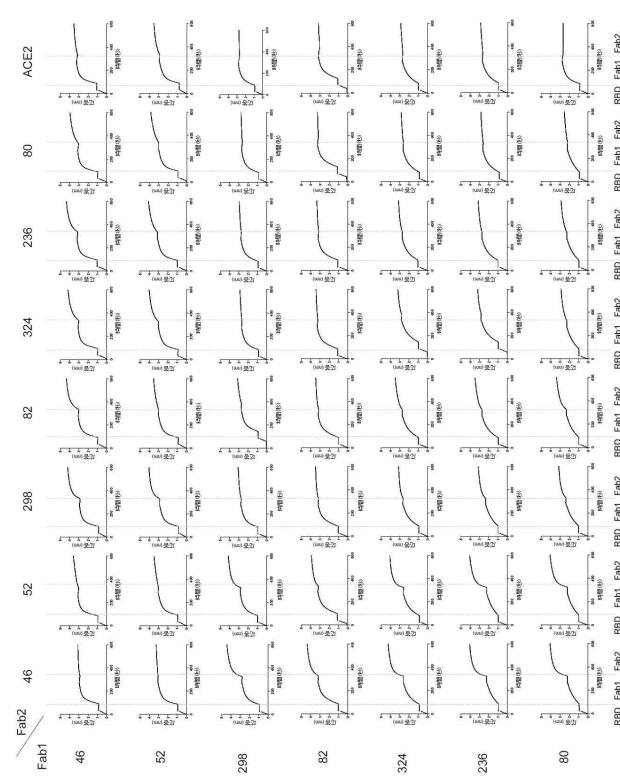


Figure 11

【図12b】

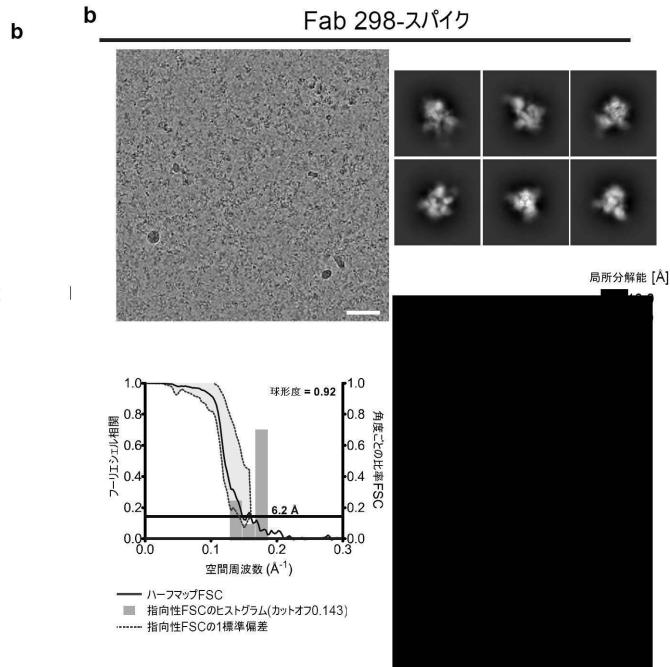


Figure 12b

【図 1 2 c】

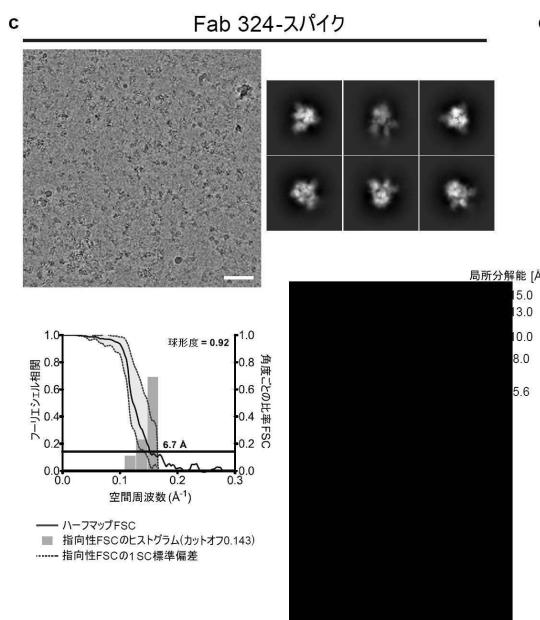


Figure 12c

【図 1 2 d】

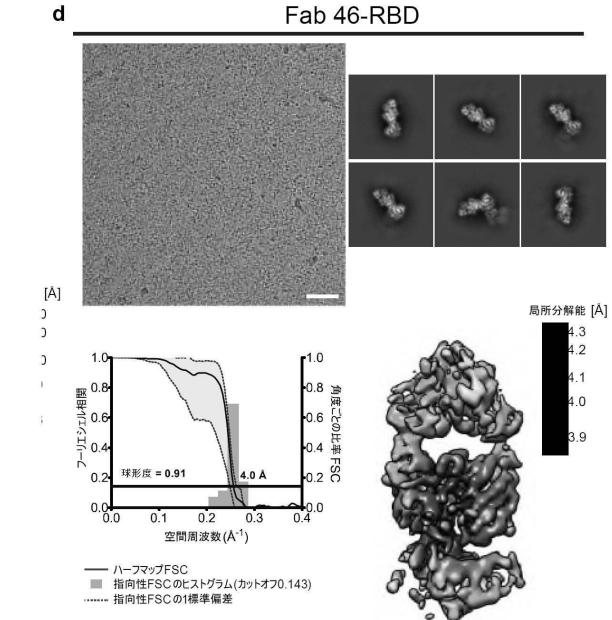


Figure 12d

10

20

30

40

【図 1 3 a - 1 3 c】

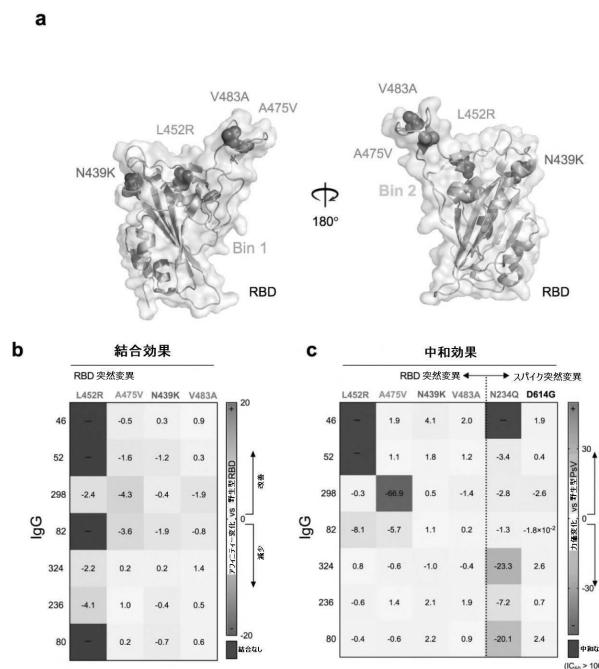


Figure 13a, 13b, 13c

【図 1 3 d - 1 3 f】

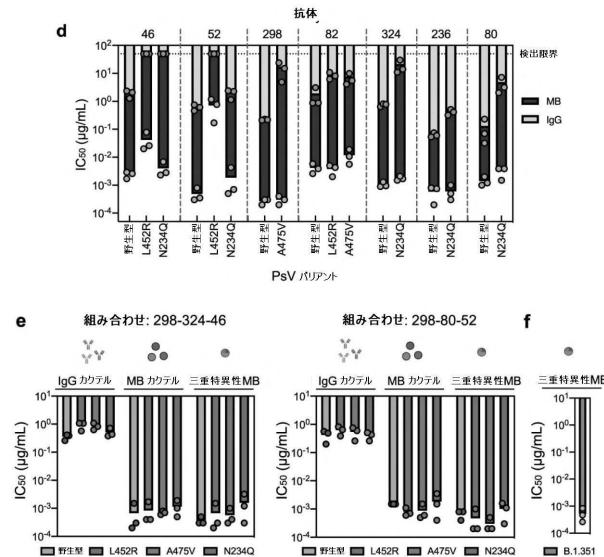


Figure 13d, 13e, 13f

50

【図 1 3 g - 1 3 h】

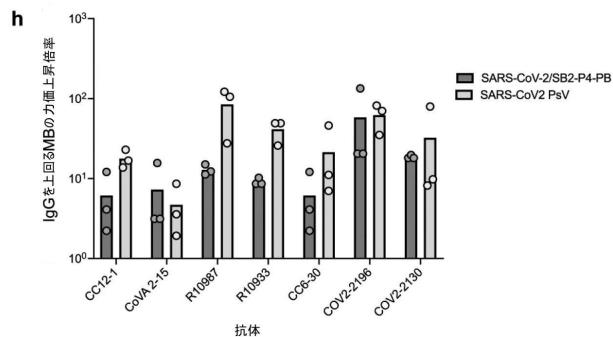
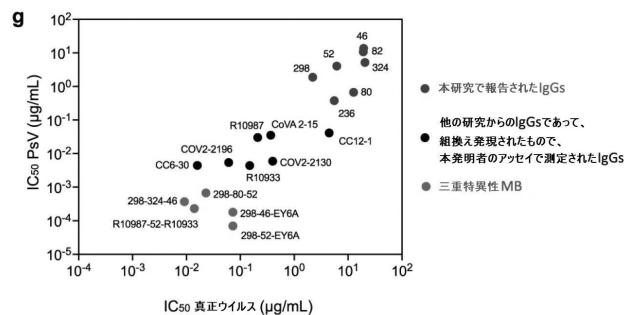


Figure 13g, 13h

10

20

30

40

【図 1 4 a】

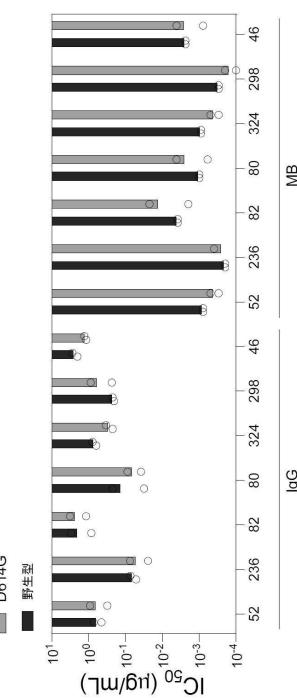


Figure 14a

10

20

30

40

【図 1 4 b】

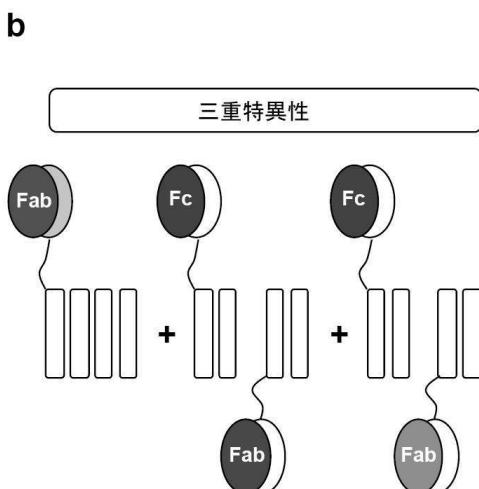


Figure 14b

【図 1 4 c】

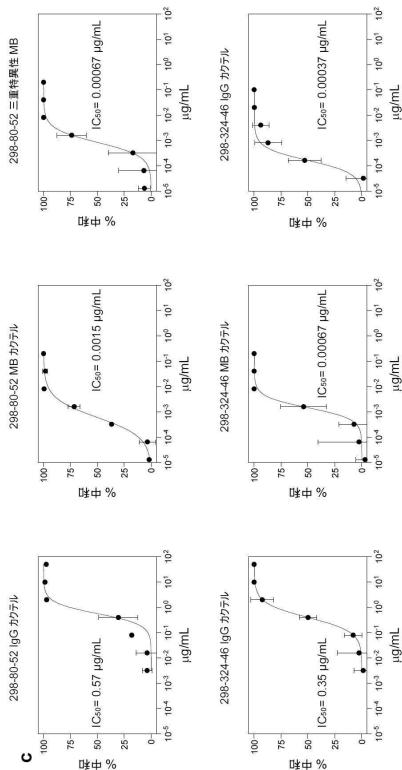


Figure 14c

10

20

30

40

50

【図 1 4 d】

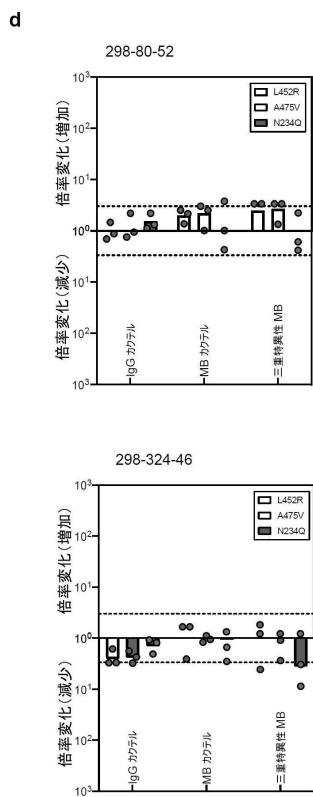


Figure 14d

【図 1 4 e】

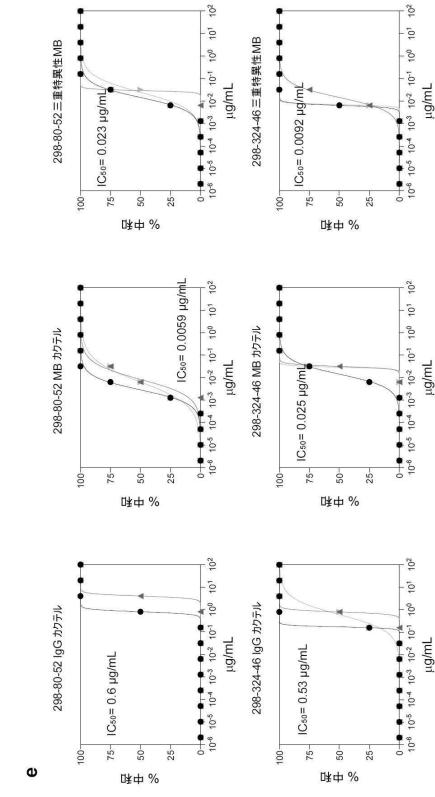


Figure 14e

【図 1 5】

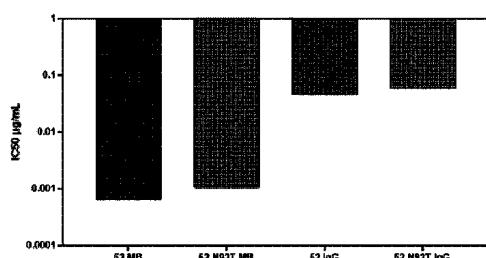


Figure 15

【図 1 6】

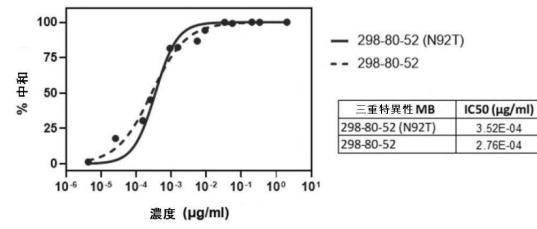


Figure 16

10

20

30

40

50

【図 17】

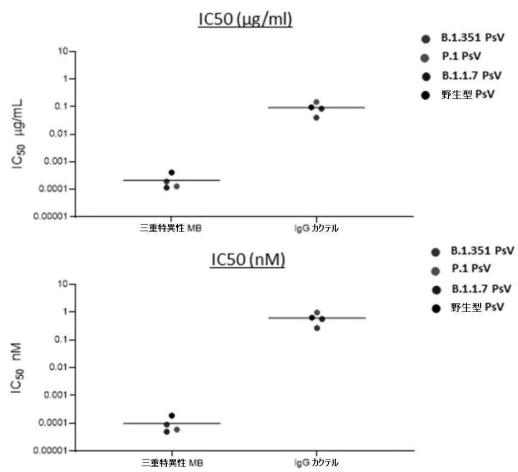


Figure 17

10

【配列表】

20235442110000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2021/051426												
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p>IPC: C07K 19/00 (2006.01), A61K 47/68 (2017.01), A61P 31/14 (2006.01), C07K 14/47 (2006.01), C07K 16/00 (2006.01), C07K 16/10 (2006.01), C07K 16/46 (2006.01), C12N 15/13 (2006.01), C12N 15/62 (2006.01)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>C07K 19/00 (2006.01), A61K 47/68 (2017.01), A61P 31/14 (2006.01), C07K 14/47 (2006.01), C07K 16/00 (2006.01), C07K 16/10 (2006.01), C07K 16/46 (2006.01), C12N 15/13 (2006.01), C12N 15/62 (2006.01)</p>														
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>														
<p>Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)</p> <p>Databases: Canadian Patent Database, Questel Orbit, PubMed, Google, Genome Quest</p> <p>Keywords: SARS-CoV-2, nanocage, tri-specific antibody, multi-specific antibody, I253A, Spike protein, ferritin, Covid-19</p>														
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">KIM et al.: 'Ferritin nanocage-based methyltransferase SETD6 for COVID-19 therapy', ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS, 16 September 2020, Volume 30, Issue 48, pages 1-10, ISSN: 1616301X The whole document</td> <td style="padding: 2px;">1-7, 11-36, 40-44, 47-49, 67-82, 100-102</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">WO2019023811 A1 (JULIEN ET AL.) 7 February 2019 (07-02-2019) The whole document</td> <td style="padding: 2px;">1-7, 11-36, 40-44, 47-49</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">JAHANSHAHLU AND REZAEI: 'Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19' BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY, 4 June 2020, Volume 129, pages 1-4, ISSN: 7533322 The whole document</td> <td style="padding: 2px;">45, 46, 50-52</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	KIM et al.: 'Ferritin nanocage-based methyltransferase SETD6 for COVID-19 therapy', ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS, 16 September 2020, Volume 30, Issue 48, pages 1-10, ISSN: 1616301X The whole document	1-7, 11-36, 40-44, 47-49, 67-82, 100-102	Y	WO2019023811 A1 (JULIEN ET AL.) 7 February 2019 (07-02-2019) The whole document	1-7, 11-36, 40-44, 47-49	Y	JAHANSHAHLU AND REZAEI: 'Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19' BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY, 4 June 2020, Volume 129, pages 1-4, ISSN: 7533322 The whole document	45, 46, 50-52
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	KIM et al.: 'Ferritin nanocage-based methyltransferase SETD6 for COVID-19 therapy', ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS, 16 September 2020, Volume 30, Issue 48, pages 1-10, ISSN: 1616301X The whole document	1-7, 11-36, 40-44, 47-49, 67-82, 100-102												
Y	WO2019023811 A1 (JULIEN ET AL.) 7 February 2019 (07-02-2019) The whole document	1-7, 11-36, 40-44, 47-49												
Y	JAHANSHAHLU AND REZAEI: 'Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19' BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY, 4 June 2020, Volume 129, pages 1-4, ISSN: 7533322 The whole document	45, 46, 50-52												
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="width: 50%; padding: 2px;">* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; padding: 2px;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </tbody> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family										
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family													
<p>Date of the actual completion of the international search 01 January 2022 (01-01-2022)</p>														
<p>Date of mailing of the international search report 12 January 2022 (12-01-2022)</p>														
<p>Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476</p>														
<p>Authorized officer Keely Ingrey (819) 639-7697</p>														

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2021/051426
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG et al.: 'Engineering a novel antibody-peptide bispecific fusion protein against MERS-CoV', ANTIBODIES (BASEL), 4 November 2019, Volume 8, Issue 4, pages 1-11, ISSN: 2073-4468 The whole document	45, 46, 50-52
X	WO2015109212 A1 (RONDON ET AL.) 23 July 2015 (23-07-2015) The whole document, specific to SEQ ID NO: 6	53-56
X	US10101333 B2 (SMIDLER AND MAO) 16 October 2018 (16-10-2018) The whole document, specific to SEQ ID NO: 2284	53-56
X	WO2018018039 A2 (MARASCO AND ZHU) 25 January 2018 (25-01-2018) The whole document, specific to SEQ ID NO: 18	53-56
Y	LIU et al.: 'Nanobody-ferritin conjugate for targeted photodynamic therapy', CHEMISTRY – A EUROPEAN JOURNAL, 10 June 2020, Volume 26, Issue 33, pages 7442-7450, ISSN: 15213765 The whole document	57, 59-82
Y	DENG et al.: 'Subcutaneous bioavailability of therapeutic antibodies as a function of FcRn binding affinity in mice', January–February 2012, MABS, Volume 4, Issue 1, pages 101-109, ISSN: 19420862 The whole document	57, 59-66
A	LO et al.: 'Effector-attenuating substitutions that maintain antibody stability and reduce toxicity in mice', JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 3 March 2017, Volume 292, Issue 9, pages 3900-3908, ISSN: 0021-9258 The whole document	58, 83-99
		30
		40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/CA2021/051426
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter</i>.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input checked="" type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter</i>.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter</i>.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p>	
<p>3. Additional comments:</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2021/051426

Box No. II**Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III**Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The instant claims are directed to: a fusion protein comprising a nanocage monomer linked to a SARS-CoV-2 binding moiety and use to treat or prevent SARS-CoV-2; a tri-specific antibody construct targeting SARS-CoV-2 and use to treat or prevent SARS-CoV-2; one of 40 different polypeptides defined by percent identity or an undefined functional fragment thereof; a fusion polypeptide comprising an Fc region with a I253A mutation linked to a nanocage monomer; and a self-assembled polypeptide complex comprising an Fc region linked to a nanocage monomer and a SARS-CoV-2 binding antibody linked to a second nanocage wherein said Fc region can comprise defined mutations. In view of the fact that the polypeptides of claim 53 and using ferritin-nanocage monomers or antibodies to treat SARS-CoV-2 are known (see Written Opinion), the subject matter of independent claims 1, 45, 53, 57, 67 and 83 is not unified.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

30

40

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No. PCT/CA2021/051426
Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date	
WO2019023811A1	07 February 2019 (07-02-2019)	CA3071922A1 EP3661968A1 EP3661968A4 JP2020534861A US2020179532A1	07 February 2019 (07-02-2019) 10 June 2020 (10-06-2020) 12 May 2021 (12-05-2021) 03 December 2020 (03-12-2020) 11 June 2020 (11-06-2020)	
WO2015109212A1	23 July 2015 (23-07-2015)	None		
US10101333B2	16 October 2018 (16-10-2018)	US2016069894A1 AU2010315101A1 AU2010315101B2 AU2016202532A1 CA2780221A1 EP2496600A1 JP2013510164A JP6007420B2 JP2017031153A US2012316071A1 WO2011056997A1	10 March 2016 (10-03-2016) 07 June 2012 (07-06-2012) 28 January 2016 (28-01-2016) 12 May 2016 (12-05-2016) 12 May 2011 (12-05-2011) 12 September 2012 (12-09-2012) 21 March 2013 (21-03-2013) 12 October 2016 (12-10-2016) 09 February 2017 (09-02-2017) 13 December 2012 (13-12-2012) 12 May 2011 (12-05-2011)	
WO2018018039A2	25 January 2018 (25-01-2018)	WO2018018039A3 AU2017300788A1 BR112019001262A2 CA3031194A1 CN109689689A EP3487884A2 IL264376D0 JP2019524111A KR20190039532A MX2019000963A RU2019104896A RU2019104896A3 SG11201900500TA US2021101989A1 US11046777B2	22 February 2018 (22-02-2018) 07 February 2019 (07-02-2019) 07 May 2019 (07-05-2019) 25 January 2018 (25-01-2018) 26 April 2019 (26-04-2019) 29 May 2019 (29-05-2019) 28 February 2019 (28-02-2019) 05 September 2019 (05-09-2019) 12 April 2019 (12-04-2019) 28 November 2019 (28-11-2019) 24 August 2020 (24-08-2020) 29 April 2021 (29-04-2021) 27 February 2019 (27-02-2019) 08 April 2021 (08-04-2021) 29 June 2021 (29-06-2021)	

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 47/69 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/69	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/65	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	L
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 P 21/08	

(32)優先日 令和3年7月12日(2021.7.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ジュリアン , ジャン - フィリップ

カナダ国 エム5ジー 0エー4 オンタリオ , トロント , ベイストリート 686 , 3アールディー フロア

(72)発明者 ルハス ディエス , エドゥルネ

カナダ国 エム5ジー 0エー4 オンタリオ , トロント , ベイストリート 686 , 3アールディー フロア

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24
CA25 CA44 CA46

4C076 AA62 AA64 AA65 AA95 CC15 CC35 CC41 CC50 EE41 EE59

4C085 AA14 AA25 BB44 CC22 CC23 EE01 EE05 GG02 GG03 GG04
GG06 GG08 HH01 HH11 JJ01 KA03 KA04 KA27 KB82 LL094H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA40 BA41 BA50 CA40 DA76 EA20
EA50 FA74