

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7554837号
(P7554837)

(45)発行日 令和6年9月20日(2024.9.20)

(24)登録日 令和6年9月11日(2024.9.11)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705 Z N A
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	9/64 (2006.01)	C 1 2 N	9/64 Z
C 1 2 N	15/57 (2006.01)	C 1 2 N	15/57
請求項の数 18 (全34頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-552150(P2022-552150)	(73)特許権者	517106833 華輝安健(北京)生物科技有限公司 中華人民共和国 北京市昌平生命科学園 医科路9号院5号路7-8層
(86)(22)出願日	令和3年2月27日(2021.2.27)	(73)特許権者	520493304 ナショナル インスティテュート オブ バイオロジカル サイエンシズ, ベイジン NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGICAL SCIEN CES, BEIJING 中華人民共和国 102206 ベイジン , チャンピン ディストリクト, ズイー ジーシー ライフ サイエンس パーク, サイエンс パーク ロード 7 7 Science Park Rd., 最終頁に続く
(65)公表番号	特表2023-515603(P2023-515603 A)		
(43)公表日	令和5年4月13日(2023.4.13)		
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/078343		
(87)国際公開番号	WO2021/170131		
(87)国際公開日	令和3年9月2日(2021.9.2)		
審査請求日	令和4年9月2日(2022.9.2)		
(31)優先権主張番号	202010124368.4		
(32)優先日	令和2年2月27日(2020.2.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		

(54)【発明の名称】 可溶性ACE2及び融合タンパク質、並びにその適用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)であって、
n個のポリペプチド単量体単位を含み、
前記ポリペプチド単量体単位は、2つの可溶性ACE2又はその欠失型が抗体の2つの重鎖Fc領域のN末端に接続された二量体であり、
前記n個のポリペプチド単量体単位は、2つの重鎖Fc領域のC末端に位置する尾部を介して多量体を形成しており、
前記可溶性ACE2又はその欠失型は、ACE2の細胞外ドメインを含み、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有し、
前記尾部はIgMに由来し、SEQ ID NO: 17に示される配列を有し、
前記重鎖Fc領域は、前記抗体のヒンジ領域、CH2ドメイン、及びCH3ドメインをそれぞれ有し、
前記抗体はIgG抗体であり、
前記nは5又は6であることを特徴とする多量体融合タンパク質。

【請求項2】

前記抗体がIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4から選択されることを特徴とする請求項1に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項3】

前記可溶性ACE2又はその欠失型はグリコシル化されたことを特徴とする請求項1に

記載の多量体融合タンパク質。

【請求項 4】

前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型はヒト A C E 2 の 5 3 番目、9 0 番目、1 0 3 番目、3 2 2 番目、4 3 2 番目、5 4 6 番目及び / 又は 6 9 0 番目がグリコシル化されたことを特徴とする請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項 5】

各ポリペプチド単量体単位における各重鎖 F c 領域の C 末端に 1 つの尾部が接続され、n 個のポリペプチド単量体単位は合計 2 n 個の尾部を有し、互いに接続されて多量体を構成することを特徴とする請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項 6】

前記多量体融合タンパク質は、

5 つのポリペプチド単量体単位が F c - ドメイン C 末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体であって、各ポリペプチド単量体単位は 2 つの A C E 2 欠失型と 2 つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 7 に示されるアミノ酸配列を有する、A C E 2 - h F c 5、

5 つのポリペプチド単量体単位が F c - ドメイン C 末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体であって、各ポリペプチド単量体単位は 2 つの A C E 2 欠失型と 2 つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 8 に示されるアミノ酸配列を有する、A C E 2 - N N - h F c 5、

5 つのポリペプチド単量体単位が F c - ドメイン C 末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体であって、各ポリペプチド単量体単位は 2 つの A C E 2 欠失型と 2 つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、ここで、重鎖 F c 領域は 3 0 9 番目に L 3 0 9 C 突然変異が発生した、A C E 2 - N N - h F c 5 - L 3 0 9 C、

6 つのポリペプチド単量体単位が F c - ドメイン C 末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた六量体であって、各ポリペプチド単量体単位が 2 つの A C E 2 欠失型と 2 つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、単一の尾部と共に S E Q I D N O : 7 に示されるアミノ酸配列を有する、A C E 2 - h F c 6、

6 つのポリペプチド単量体単位が F c - ドメイン C 末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた六量体であって、各ポリペプチド単量体単位が 2 つの A C E 2 欠失型と 2 つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、単一の尾部と共に S E Q I D N O : 8 に示されるアミノ酸配列を有する、A C E 2 - N N - h F c 6、及び

6 つのポリペプチド単量体単位が F c - ドメイン C 末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた六量体であって、各ポリペプチド単量体単位は 2 つの A C E 2 欠失型と 2 つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 1 8 に示されるアミノ酸配列を有する、A C E 2 - N N - h F c 6 - L 3 0 9 C、

からなる群から選択される 1 種又は複数種であることを特徴とする請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質を発現することを特徴とする発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質、又は請求項 7 の発現ベクターを発現することを特徴とする哺乳動物細胞株。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

前記細胞株はC H O細胞株、2 9 3細胞株及びV e r o細胞株及びその派生する細胞株を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の哺乳動物細胞株。

【請求項 1 0】

前記細胞株はV e r o E 6細胞又はH E K 2 9 3 T細胞を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の哺乳動物細胞株。

【請求項 1 1】

請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質、及び薬学的に許容される担体を含むことを特徴とする薬物組成物。

【請求項 1 2】

請求項 1 に記載の多量体融合タンパク質の、A C E 2に関連する疾患を治療するか又は予防するための薬物の製造における適用。

10

【請求項 1 3】

前記疾患はA C E 2を受容体とするウイルスの感染に起因する疾患であることを特徴とする請求項 1 2 に記載の適用。

【請求項 1 4】

前記ウイルスはコロナウイルスであることを特徴とする請求項 1 3 に記載の適用。

【請求項 1 5】

前記ウイルスはS A R S - C o V、H C o V - N L 6 3、又はS A R S - C o V - 2であることを特徴とする請求項 1 3 に記載の適用。

【請求項 1 6】

20

前記疾患は肺炎、重症急性呼吸器感染、腎不全、心不全、急性呼吸窮迫症候群（A R D S）、肝臓損傷、腸疾患、又は重症急性呼吸器症候群から選択されることを特徴とする請求項 1 2 に記載の適用。

【請求項 1 7】

前記薬物は医療従事者及びA C E 2を受容体とするウイルスに曝される可能性のある他の者の受動免疫に用いられることを特徴とする請求項 1 2 に記載の適用。

【請求項 1 8】

前記薬物は吸入、鼻内又は気道滴下注入薬物は吸入、鼻内又は気道滴下注入、点眼、中耳注射、点耳薬、局所、経皮、非経口、皮下、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、胸腔内滴下注入、腹膜内注射、病巣内、粘膜への適用又は徐放性担体の移植によって投与されることを特徴とする請求項 1 2 に記載の適用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は可溶性A C E 2及びその融合タンパク質、並びにその適用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

2 0 1 9 年 1 2 月に、新型コロナウイルス（S A R S - C o V - 2）により引き起こされた新型コロナウイルス感染症肺炎（S A R S - C o V 2）疫病が爆発し、世界中で急速に広がり、2 0 2 1 年 2 月まで、世界中で感染人数が1 億人以上に達し、死亡率が約 2 . 2 % であり、世界的な健康危機を引き起こすだけでなく、社会、経済などの様々な面に広く深刻な影響を与えている。

40

【0 0 0 3】

コロナウイルスはニドウイルス目、コロナウイルス科、コロナウイルス属に属し、エンペロープを有し、ゲノムが線状の一本鎖プラス鎖RNAのウイルスであり、自然界に広く存在するウイルスの一種であり、引き起こされた疾患の患者は一般的な風邪から重篤な肺感染などの異なる臨床症状が示されている。過去の2 0 年間、コロナウイルスは既に2 回の大規模な疫病を引き起こし、それぞれ2 0 0 2 / 2 0 0 3 年の重症急性呼吸器症候群（S A R S）及び2 0 1 2 年に現れた中東呼吸器症候群（M E R S）である。2 0 1 9 年末以来のS A R S - C o V - 2により引き起こされた新型コロナウイルス感染症の状況は、

50

流行範囲、累計感染人数であっても、死亡人数であっても、SARS及びMERS感染症の状況を遥かに超えている。

【0004】

SARS-CoV2のウイルスゲノム配列は、2013年に中国雲南省で発見された1種のコウモリ(*Rhinolophus sinicus*)から分離されたRaTG13ウイルス株と非常に類似し、配列相同性が96.2%に達する(Zhou et al., 2020)。これにより、今回爆発したウイルスの由来は、SARS及びMERSを引き起こすコロナウイルスの由来と一致しており、いずれもコウモリに由来すると推定される。ヒトでの流行、爆発を引き起こす経路も前述した2種類のウイルスと一致する可能性があり、ウイルスはコウモリから、中間宿主(ヒトの活動により密接な動物)の体内で進化し、増幅し、最終的にヒトに感染し、かつ進化し続け、迅速に伝播し、爆発流行を引き起こしてしまう。自然条件下で、SARSと類似するコロナウイルスは世界の多くの地域のコウモリに長期に存在しており、ほとんどが人体に感染することができない。ところが、これらの「Natural-focal diseases」は、偶然の条件下で、別の中間宿主によりヒトに感染することができる。2002/03年の「サーズ」及びその17年後の今回の新型コロナウイルス感染の爆発流行により、自然宿主が存在すれば、将来、他の可能な病原性コロナウイルス感染が再び爆発する可能性があることがもう一度明らかとなった。

10

【0005】

2020年11月に、FDAは2種類の新型コロナウイルスに対する特異性モノクローナル抗体による治療の緊急使用許可を承認した。それぞれイーライ・リリー社のbamnirivimab及びRegeneron社のcasirivimabとimdevimabの2つの抗体の組み合わせである。この2種類の治療方法がいずれも非入院の成人及び軽度から中度までのSARS-CoV2症状を有し、かつ疾患がさらに悪化するリスクがある12歳以上の子供に用いることが承認された。モノクローナル抗体は一般的に高効率性と広域スペクトル性の両方を両立することが困難である。新型コロナウイルスの世界範囲での流行に伴い、ヒト宿主への更なる適応及び集団免疫などの選択圧で、変異株が既に生まれ、かつ生まれつつある。変異株は抗原部位の変化が発生することにより、以前に開発された中和抗体が効力を失ってしまう。

20

【0006】

新型コロナウイルス、SARS-CoV、及び新型コロナに関連する動物ウイルスはいずれもアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)を受容体として使用して標的細胞に感染、侵入する。新型コロナウイルスの表面は三量体の形式で存在する複数のSタンパク質を有し、かつACE2と高いアフィニティを有し、ウイルスを効果的に中和することはSタンパク質とACE2の多価高アフィニティの結合を同時に遮断する必要がある。ACE2細胞外領域と抗体固定領域を融合して形成された可溶性受容体は中和抗体と類似する作用メカニズムを有し、変異したが依然としてACE2を受容体とする突然変異したウイルス株の感染を遮断することができる。可溶性ACE2受容体融合タンパク質を治療薬物として開発し、天然広域スペクトル中和能力を有し、ウイルス変異に制限されず、新型コロナウイルス感染の治療薬物として用いられるだけでなく、将来発生する可能性のある類似疫病にも対応することができる。

30

【発明の概要】

【0007】

本発明の可溶性ACE2及び活性中心が突然変異した可溶性ACE2(NN)、並びに前記可溶性ACE2及び活性中心が突然変異した可溶性ACE2(NN)とヒトIgG1のFcセグメントとのACE2-Fc融合タンパク質はSARS-CoV2及びSARS-CoVを効率的に中和することができ、特にSARS-CoV2のスパイクタンパク質S(Furinプロテアーゼ切断部位を含む)がSARS-CoV2の受容体であるヒトACE2に結合することによって誘発される多核合胞体の形成を遮断することができる。

40

【0008】

50

第1の態様において、本発明は可溶性ACE2又はその欠失型(truncated form)を提供する。前記可溶性ACE2又はその欠失型はACE2の細胞外ドメインを含み、又はACE2の細胞外ドメインのアミノ酸配列で構成され、又はコロナウイルスとの結合能力を保持するフラグメントである。

【0009】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2の細胞外領域メタロプロテアーゼドメイン(19-615aa)を含む。いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2の細胞外領域メタロプロテアーゼドメイン(1-740aa)を含む。いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2のQ24、T27、F28、D30、K31、H34、E37、D38、Y41、Q42、L45、M82、Y83、Q325、E329、N330、K353、G354、D355、R357及びR393を含む。特に、K31及びK353を含む。

10

【0010】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2又はその任意のオーソログス・ホモログを含み、又はそれらのコロナウイルスとの結合能力を保持するフラグメントである。

【0011】

前記可溶性ACE2又はその欠失型はACE2を宿主結合受容体とするウイルスを効率的に中和することができる。前記ウイルスはSARS-CoV、HCoV-NL63又はSARS-CoV2であってもよい。

20

【0012】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型は活性中心が突然変異した可溶性ACE2又はその欠失型であってもよい。好ましくは、前記活性中心が突然変異した可溶性ACE2又はその欠失型は374番目及び/又は378番目にH374N及び/又はH378N突然変異したヒト可溶性ACE2又はその欠失型(ACE2-NN)である。

【0013】

前記可溶性ACE2又はその欠失型はACE2酵素活性を保持する可溶性ACE2又はその欠失型であってもよい。

30

【0014】

好ましくは、前記可溶性ACE2又はその欠失型はグリコシル化された可溶性ACE2又はその欠失型である。好ましくは、ヒトACE2のN-末端の53番目、90番目、103番目、322番目、432番目、546番目及び/又は690番目がグリコシル化された可溶性ACE2又はその欠失型である。

【0015】

好ましくは、前記可溶性ACE2又はその欠失型はSEQ ID NO: 1に示されるアミノ酸配列を有する。

【0016】

好ましくは、前記可溶性ACE2又はその欠失型はSEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸配列を有する。

40

【0017】

第2の態様において、本発明は可溶性ACE2又はその欠失型を抗体Fcドメインと融合することにより構築されたACE2-Fc融合タンパク質を提供する。

【0018】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はACE2の細胞外ドメインを含み、又はACE2の細胞外ドメインのアミノ酸配列で構成され、又はコロナウイルスとの結合能力を保持するフラグメントである。

【0019】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2の細

50

胞外領域メタロプロテアーゼドメイン (1 9 - 6 1 5 a a) を含む。前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型はヒト A C E 2 の細胞外領域メタロプロテアーゼドメイン (1 - 7 4 0 a a) を含む。前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型はヒト A C E 2 の Q 2 4、T 2 7、F 2 8、D 3 0、K 3 1、H 3 4、E 3 7、D 3 8、Y 4 1、Q 4 2、L 4 5、M 8 2、Y 8 3、Q 3 2 5、E 3 2 9、N 3 3 0、K 3 5 3、G 3 5 4、D 3 5 5、R 3 5 7 及び R 3 9 3 を含む。特に、K 3 1 及び K 3 5 3 を含む。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型はヒト A C E 2 又はその任意のオースログ・ホモログを含み、又はそれらのコロナウイルスとの結合能力を保持するフラグメントである。

10

【 0 0 2 1 】

前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型は A C E 2 を宿主結合受容体とするウイルスを効率的に中和することができる。前記ウイルスは S A R S - C o V、H C o V - N L 6 3 又は S A R S - C o V 2 であってもよい。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態において、前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型は活性中心が突然変異した可溶性 A C E 2 又はその欠失型であってもよい。好ましくは、前記活性中心が突然変異した可溶性 A C E 2 又はその欠失型は 3 7 4 番目及び / 又は 3 7 8 番目に H 3 7 4 N 及び / 又は H 3 7 8 N 突然変異したヒト可溶性 A C E 2 又はその欠失型 (A C E 2 - N N) である。

20

【 0 0 2 3 】

前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型は A C E 2 酵素活性を保持する可溶性 A C E 2 又はその欠失型であってもよい。

【 0 0 2 4 】

好ましくは、前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型はグリコシル化された可溶性 A C E 2 又はその欠失型である。好ましくは、ヒト A C E 2 の N - 末端の 5 3 番目、9 0 番目、1 0 3 番目、3 2 2 番目、4 3 2 番目、5 4 6 番目及び / 又は 6 9 0 番目がグリコシル化された可溶性 A C E 2 又はその欠失型である。

【 0 0 2 5 】

好ましくは、前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型は S E Q I D N O : 1 に示されるアミノ酸配列を有する。

30

【 0 0 2 6 】

好ましくは、前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型は S E Q I D N O : 2 に示されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 7 】

前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型は A C E 2 を宿主結合受容体とするウイルスを効率的に中和することができる。前記ウイルスは S A R S - C o V、H C o V - N L 6 3 又は S A R S - C o V 2 であってもよい。

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態において、前記抗体は I g G 抗体であり、ヒト I g G であってもよく、例えば I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 であり、好ましくは I g G 1 である。前記抗体 F c ドメインは抗体を含有する 2 つの重鎖 F c 領域の抗体 F c - ドメインである。好ましくは、各重鎖 F c 領域はその N 末端にヒンジ領域を有する。好ましくは、各重鎖 F c 領域は I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 に由来する C H 3 ドメインを含む。好ましくは、各重鎖 F c 領域は I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 に由来する C H 2 及び C H 3 ドメインを含む。前記 F c 領域は 2 つの A C E 2 ドメインの二量化を促進することができる。

40

【 0 0 2 9 】

前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型は重鎖 F c 領域の C 末端に接続され、又は重鎖 F c 領域の N 末端に接続される。

50

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態において、 $2n$ (n は1、2又は3である)個の前記可溶性ACE2又はその欠失型は2つの重鎖Fc領域のC末端に接続され及び/又はN末端に接続される。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態において、2つの前記可溶性ACE2又はその欠失型は2つの重鎖Fc領域の抗体Fc-ドメインのN末端に接続され二量体を形成する。又は、2つの前記可溶性ACE2又はその欠失型は2つの重鎖Fc領域のC末端に接続され二量体を形成する。

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態において、2つの前記可溶性ACE2又はその欠失型は2つの重鎖Fc領域の抗体Fc-ドメインのN末端に接続されると共に、他の2つの前記可溶性ACE2又はその欠失型は2つの重鎖Fc領域のC末端に接続されることにより、四量体ACE2-Fc融合タンパク質を形成する。さらに、前記四量体ACE2-Fc融合タンパク質のN末端の2つの前記可溶性ACE2又はその欠失型のN末端にさらにそれぞれ1つの可溶性ACE2又はその欠失型が直列接続されることにより、六量体ACE2-Fc融合タンパク質を形成する。前記2つの可溶性ACE2又はその欠失型はリンカーを介して直列接続される。前記リンカーはシステインAAAリンカーであってもよい。又は、前記四量体ACE2-Fc融合タンパク質のC末端の2つの前記可溶性ACE2又はその欠失型のC末端にさらにそれぞれ1つの可溶性ACE2又はその欠失型が直列接続されることにより、六量体ACE2-Fc融合タンパク質を形成する。前記2つの可溶性ACE2又はその欠失型はリンカーを介して直列接続される。前記リンカーはシステインAAAリンカーであってもよい。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態において、4つの前記可溶性ACE2又はその欠失型は2つずつ直列接続された後に2つの重鎖Fc領域のN末端に接続されることにより、四量体ACE2-Fc融合タンパク質を形成する。前記2つの可溶性ACE2又はその欠失型はリンカーを介して直列接続される。前記リンカーはシステインAAAリンカーであってもよい。さらに、前記四量体ACE2-Fc融合タンパク質のN末端の2つの前記可溶性ACE2又はその欠失型のN末端にさらにそれぞれ1つの可溶性ACE2又はその欠失型が直列接続されることにより、六量体ACE2-Fc融合タンパク質を形成する。前記2つの可溶性ACE2又はその欠失型はリンカーを介して直列接続される。前記リンカーはシステインAAAリンカーであってもよい。又は、前記四量体ACE2-Fc融合タンパク質の前記2つの重鎖Fc領域のC末端に2つの可溶性ACE2又はその欠失型が接続されることにより、六量体ACE2-Fc融合タンパク質を形成する。

【 0 0 3 4 】

又は、4つの前記可溶性ACE2又はその欠失型は2つずつ直列接続された後に2つの重鎖Fc領域のC末端に接続されることにより、四量体ACE2-Fc融合タンパク質を形成する。前記2つの可溶性ACE2又はその欠失型はリンカーを介して直列接続される。前記リンカーはシステインAAAリンカーであってもよい。さらに、前記四量体ACE2-Fc融合タンパク質の2つの重鎖Fc領域のN末端に2つの可溶性ACE2又はその欠失型が接続されることにより、六量体ACE2-Fc融合タンパク質を形成する。

【 0 0 3 5 】

好ましくは、前記ACE2-Fc融合タンパク質は、実際に、二量体ACE2-Fc融合タンパク質であり、ここで、単一のACE2欠失型及び単一の重鎖Fc領域はSEQ ID NO: 3に示されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 3 6 】

好ましくは、前記ACE2-Fc融合タンパク質における単一のACE2欠失型及び単一の重鎖Fc領域はSEQ ID NO: 4に示されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 3 7 】

好ましくは、前記ACE2-Fc融合タンパク質はさらにシグナルペプチドを含み、好ましくはCD33シグナルペプチドである。

【0038】

好ましくは、前記ACE2-Fc融合タンパク質における単一のACE2欠失型及び単一の重鎖Fc領域はSEQ ID NO: 5に示されるアミノ酸配列を有する。

【0039】

好ましくは、前記ACE2-Fc融合タンパク質における単一のACE2欠失型及び単一の重鎖Fc領域はSEQ ID NO: 6に示されるアミノ酸配列を有する。

【0040】

好ましくは、前記四量体ACE2-Fc融合タンパク質における単一のACE2欠失型には単一の重鎖Fc領域が接続されてから、さらに単一のACE2が接続され(ACE2-Fc-ACE2)、SEQ ID NO: 13に示されるアミノ酸配列を有する。

10

【0041】

好ましくは、前記四量体ACE2-Fc融合タンパク質における2つの直列接続されたACE2又はその欠失型には単一の重鎖Fc領域が接続され(ACE2-ACE2-Fc)、SEQ ID NO: 14に示されるアミノ酸配列を有する。

【0042】

前記ACE2-Fc融合タンパク質はACE2を宿主結合受容体とするウイルスを効率的に中和することができる。前記ウイルスはSARS-CoV、HCoV-NL63又はSARS-CoV2であってもよい。

20

【0043】

本発明のACE2-Fc融合タンパク質は可溶性ACE2の半減期及び収量を向上させ、迅速なプロセス開発及び緊急使用の需要を最大限に満たすことができる。

【0044】

第3の態様において、本発明は、n個のポリペプチド単量体単位を含み、各ポリペプチド単量体単位は2つの可溶性ACE2又はその欠失型と2つの重鎖Fc領域のN末端との接続により形成された二量体であり、前記n個のポリペプチド単量体単位は抗体FcドメインC末端に位置する尾部により多量体に組み立てられる、可溶性ACE2又はその欠失型のFc多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)を提供する。

【0045】

30

いくつかの実施形態において、各ポリペプチド単量体単位における各重鎖Fc領域のC末端に1つの尾部が接続されるため、各ポリペプチド単量体単位の2つの重鎖Fc領域のC末端に2つの尾部が接続され、n個のポリペプチド単量体単位は合計2n個の尾部を有し、互いに接続されて閉鎖環状多量体を構成する。

【0046】

前記尾部は任意の適切なアミノ酸配列であってもよく、天然に存在する抗体に発見された尾部であってもよく、又は選択的に、それは長さ及び/又は組成上で天然尾部と異なる修飾された尾部であってもよい。又は、前記尾部は人工的に合成された多量化に適する尾部であり、例えば、適切な長さの可撓性システインで構成された尾部である。又は、前記尾部は天然配列の変異体又はフラグメントを含むことができ、例えば、IgM尾部PTLYNVSLVMSDTAGTCY(SEQ ID NO: 15)又はIgA尾部PTHVNVSVVMAEVDGTCY(SEQ ID NO: 16)であり、又は、IgM又はIgA尾部の変異体は、通常、IgM尾部PTLYNVSLVMSDTAGTCY(SEQ ID NO: 15)又はIgA尾部PTHVNVSVVMAEVDGTCY(SEQ ID NO: 16)のうちの8つ、9つ、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個又は18個の位置におけるアミノ酸配列を有し、尾部はハイブリダイズしたIgM/IgA尾部であってもよい。好ましくは、尾部はTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY(SEQ ID NO: 17)である。

40

【0047】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はACE2の細胞外

50

ドメインを含み、又はACE2の細胞外ドメインのアミノ酸配列で構成され、又はコロナウイルスとの結合能力を保持するフラグメントである。

【0048】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2の細胞外領域メタロプロテアーゼドメイン(19-615aa)を含む。前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2の細胞外領域メタロプロテアーゼドメイン(1-740aa)を含む。前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2のQ24、T27、F28、D30、K31、H34、E37、D38、Y41、Q42、L45、M82、Y83、Q325、E329、N330、K353、G354、D355、R357及びR393を含む。特に、K31及びK353を含む。

10

【0049】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型はヒトACE2又はその任意のオーソログス・ホモログを含み、又はそれらのコロナウイルスとの結合能力を保持するフラグメントである。

【0050】

前記可溶性ACE2又はその欠失型はACE2を宿主結合受容体とするウイルスを効率的に中和することができる。前記ウイルスはSARS-CoV、HCoV-NL63又はSARS-CoV2であってもよい。

【0051】

いくつかの実施形態において、前記可溶性ACE2又はその欠失型は活性中心が突然変異した可溶性ACE2又はその欠失型であってもよい。好ましくは、前記活性中心が突然変異した可溶性ACE2又はその欠失型は374番目及び/又は378番目にH374N及び/又はH378N突然変異したヒト可溶性ACE2又はその欠失型(ACE2-NN)である。

20

【0052】

前記可溶性ACE2又はその欠失型はACE2酵素活性を保持する可溶性ACE2又はその欠失型であってもよい。

【0053】

好ましくは、前記可溶性ACE2又はその欠失型はグリコシル化された可溶性ACE2又はその欠失型である。好ましくは、ヒトACE2のN-末端の53番目、90番目、103番目、322番目、432番目、546番目及び/又は690番目がグリコシル化された可溶性ACE2又はその欠失型である。

30

【0054】

好ましくは、前記可溶性ACE2欠失型はSEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列を有する。

【0055】

好ましくは、前記可溶性ACE2欠失型はSEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を有する。

【0056】

前記可溶性ACE2又はその欠失型はACE2を宿主結合受容体とするウイルスを効率的に中和することができる。前記ウイルスはSARS-CoV、HCoV-NL63又はSARS-CoV2であってもよい。

40

【0057】

いくつかの実施形態において、前記抗体はIgG抗体であり、ヒトIgGであってもよく、例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4であり、好ましくはIgG1である。前記抗体Fcドメインは抗体を含有する2つの重鎖Fc領域の抗体Fc-ドメインである。好ましくは、各重鎖Fc領域はそのN末端にヒンジ領域を有する。好ましくは、各重鎖Fc領域はIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4に由来するCH3ドメインを含む。好ましくは、各重鎖Fc領域はIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4に由来するCH2及びCH3ドメインを含む。前記Fc領域は2つのACE2ドメインの二量化

50

を促進することができる。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態において、前記重鎖 F c 領域は 3 0 9 番目に L 3 0 9 C 突然変異が発生した重鎖 F c 領域であってもよい。

【 0 0 5 9 】

前記可溶性 A C E 2 又はその欠失型は重鎖 F c 領域の C 末端に接続され、又は重鎖 F c 領域の N 末端に接続される。

【 0 0 6 0 】

好ましくは、前記各ポリペプチド単量体単位における単一の A C E 2 欠失型及び単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 7 に示されるアミノ酸配列を有する。

10

【 0 0 6 1 】

好ましくは、前記各ポリペプチド単量体単位における単一の A C E 2 欠失型及び単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 8 に示されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 6 2 】

好ましくは、前記各ポリペプチド単量体単位における単一の A C E 2 欠失型及び単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 1 8 に示されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態において、前記多量体融合タンパク質 A C E 2 - h F c (n) は A C E 2 - h F c 5、A C E 2 - N N - h F c 5、又は A C E 2 - N N - h F c 5 L 3 0 9 C であり、ここで、

20

A C E 2 - h F c 5 とは、5つのポリペプチド単量体単位が5つの F c - ドメイン C 末端の 1 0 個の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体を意味し、各ポリペプチド単量体単位は2つの A C E 2 欠失型と2つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 7 に示されるアミノ酸配列を有し、

A C E 2 - N N - h F c 5 とは、5つのポリペプチド単量体単位が5つの F c - ドメイン C 末端の 1 0 個の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体を意味し、各ポリペプチド単量体単位は2つの A C E 2 欠失型と2つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 8 に示されるアミノ酸配列を有し、

30

A C E 2 - N N - h F c 5 - L 3 0 9 C とは、5つのポリペプチド単量体単位が5つの F c - ドメイン C 末端の 1 0 個の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体を意味し、各ポリペプチド単量体単位は2つの A C E 2 欠失型と2つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、尾部と共に S E Q I D N O : 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、ここで、重鎖 F c 領域は 3 0 9 番目に L 3 0 9 C 突然変異が発生した。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態において、前記多量体融合タンパク質 A C E 2 - h F c (n) は A C E 2 - h F c 6、A C E 2 - N N - h F c 6、又は A C E 2 - N N - h F c 6 L 3 0 9 C であり、ここで、

40

A C E 2 - h F c 6 とは、6つのポリペプチド単量体単位が6つの F c - ドメイン C 末端の 1 2 個の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた六量体を意味し、各ポリペプチド単量体単位は2つの A C E 2 欠失型と2つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、単一の尾部と共に S E Q I D N O : 7 に示されるアミノ酸配列を有し、

A C E 2 - N N - h F c 6 とは、6つのポリペプチド単量体単位が6つの F c - ドメイン C 末端の 1 2 個の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた六量体を意味し、各ポリペプチド単量体単位は2つの A C E 2 欠失型と2つの重鎖 F c 領域で構成された二量体であり、単一の A C E 2 欠失型と単一の重鎖 F c 領域は、単一の尾部と共に S E Q I D N O : 8 に示されるアミノ酸配列を有し、

50

ACE2 - NN - hFc6 L309Cとは、6つのポリペプチド単量体単位が6つのFc - ドメインC末端の12個の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた六量体を意味し、各ポリペプチド単量体単位は2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 18に示されるアミノ酸配列を有する。

【0065】

いくつかの実施形態において、前記多量体融合タンパク質は、

4つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた四量体であって、各ポリペプチド単量体単位が2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 7に示されるアミノ酸配列を有する、ACE2 - hFc4、

10

4つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体であって、各ポリペプチド単量体単位が2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列を有する、ACE2 - NN - hFc4、

4つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた四量体であり、各ポリペプチド単量体単位は2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 18に示されるアミノ酸配列を有し、ここで、重鎖Fc領域は309番目にL309C突然変異が発生した、ACE2 - NN - hFc4 - L309C、

20

5つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体であって、各ポリペプチド単量体単位は2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 7に示されるアミノ酸配列を有する、ACE2 - hFc5、

5つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体であって、各ポリペプチド単量体単位は2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列を有する、ACE2 - NN - hFc5、

30

5つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体であって、各ポリペプチド単量体単位は2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 18に示されるアミノ酸配列を有し、ここで、重鎖Fc領域は309番目にL309C突然変異が発生した、ACE2 - NN - hFc5 - L309C、

6つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた六量体であって、各ポリペプチド単量体単位が2つのACESARS - CoV22欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、単一の尾部と共にSEQ ID NO: 7に示されるアミノ酸配列を有する、ACE2 - hFc6、

40

6つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた六量体であって、各ポリペプチド単量体単位が2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、単一の尾部と共にSEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列を有する、ACE2 - NN - hFc6、

6つのポリペプチド単量体単位がFc - ドメインC末端の尾部を介して互いに接続され

50

て組み立てられた六量体であって、各ポリペプチド単量体単位は2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 18に示されるアミノ酸配列を有する、ACE2-NN-hFc6-L309C、といった多量体融合タンパク質から選択される1種又は複数種である。

【0066】

前記多量体融合タンパク質はウイルスSタンパク質とのアフィニティを大幅に強化しつつ、Fc分子の効果機能を強化することができる。

【0067】

第4の態様において、本発明は、第1の態様の可溶性ACE2又はその欠失型、第2の態様のACE2-Fc融合タンパク質、又は第3の態様の可溶性ACE2又はその欠失型のFc多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)を発現する遺伝子を含む発現ベクターを提供する。

10

【0068】

第5の態様において、本発明は、第1の態様の可溶性ACE2、第2の態様のACE2-Fc融合タンパク質、又は第3の態様の可溶性ACE2又はその欠失型のFc多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)を発現できる遺伝子の哺乳動物細胞株を提供する。前記細胞株はCHO細胞株、293細胞株及びVero細胞株及びその派生する細胞株を含むがそれらに限定されない。例えば、Vero E6細胞又はHEK293T細胞である。

20

【0069】

第6の態様において、本発明は、第1の態様の可溶性ACE2、第2の態様のACE2-Fc融合タンパク質、又は第3の態様の可溶性ACE2又はその欠失型のFc多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)の製造方法であって、

(1) 第4の態様の発現ベクターで哺乳動物細胞株をトランスフェクトし、第1の態様の可溶性ACE2、第2の態様のACE2-Fc融合タンパク質、又は第3の態様の可溶性ACE2又はその欠失型のFc多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)を発現する哺乳動物細胞株を構築するステップと、

(2) 培養条件下でステップ(1)の哺乳動物細胞株を培養して第1の態様の可溶性ACE2、第2の態様のACE2-Fc融合タンパク質、又は第3の態様の可溶性ACE2又はその欠失型のFc多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)を生成して組換えタンパク質を生成するステップと、及び

30

(3) ステップ(2)で発現された組換えタンパク質を精製するステップとを含む、方法を提供する。

【0070】

第7の態様において、本発明は、第1の態様の可溶性ACE2、第2の態様のACE2-Fc融合タンパク質、又は第3の態様の可溶性ACE2又はその欠失型のFc多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)、及び薬学的に許容される担体を含む、薬物組成物をさらに提供する。

【0071】

40

第8態様において、本発明は、第1の態様の可溶性ACE2、第2の態様のACE2-Fc融合タンパク質、又は第3の態様の可溶性ACE2又はその欠失型のFc多量体融合タンパク質ACE2-hFc(n)の、ACE2に関連する疾患を治療するか又は予防するための薬物の製造における適用を提供する。

【0072】

前記疾患はACE2を受容体とするウイルスの感染に起因する疾患から選択される。前記ウイルスはコロナウイルスであってもよく、例えばSARS-CoV、HCoV-NL63又はSARS-CoV2である。前記疾患は肺炎、重症急性呼吸器感染、腎不全、心不全、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、肝臓損傷、腸疾患、又は重症急性呼吸器症候群であってもよい。

50

【 0 0 7 3 】

本発明の第 1 の態様の可溶性 A C E 2、第 2 の態様の A C E 2 - F c 融合タンパク質、又は第 3 の態様の可溶性 A C E 2 又はその欠失型の F c 多量体融合タンパク質 A C E 2 - h F c (n) は緊急事態時での投与に用いることができ、それにより A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスの感染爆発による高い発病率及び致死率を回避する。

【 0 0 7 4 】

本発明の第 1 の態様の可溶性 A C E 2、第 2 の態様の A C E 2 - F c 融合タンパク質、又は第 3 の態様の可溶性 A C E 2 又はその欠失型の F c 多量体融合タンパク質 A C E 2 - h F c (n) は、医療従事者及び A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスに曝される可能性がある他の者の受動免疫にさらに用いることができる。

10

【 0 0 7 5 】

合胞体 (s y n c y t i a) は、ウイルスが宿主細胞に感染した後、細胞間の融合が発生し、最終的に形成された多核巨細胞である。S A R S - C o V 2 ウイルスに感染した重症患者は肺胞上皮にびまん性損傷が発生し、融合多核細胞 (合胞体) が形成され、これはウイルス S タンパク質と A C E 2 の結合によるものであり、細胞変性効果の重要な原因である。同時に、サイトカインストームも肺胞の損傷を引き起こすことができる。可溶性 A C E 2 の多量体 F c 融合タンパク質 (A C E 2 - N N - h F c n) はウイルス S タンパク質と A C E 2 との結合による融合多核細胞 (合胞体)、及びその後が発生する細胞変性効果を効果的に阻止することができる。

【 0 0 7 6 】

20

好ましくは、前記薬物は吸入、鼻内又は気道滴下注入薬物は吸入、鼻内又は気道滴下注入、点眼、中耳注射、点耳薬、局所、経皮、非経口、皮下、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、胸腔内滴下注入、腹膜内注射、病巣内、粘膜への適用又は徐放性担体の移植によって投与され、好ましくは、前記薬物は霧化吸入により投与される。第 9 の態様において、本発明は、A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスの感染に抵抗する薬物をスクリーニングする方法であって、第 1 の態様の可溶性 A C E 2、第 2 の態様の A C E 2 - F c 融合タンパク質、第 3 の態様の可溶性 A C E 2 又はその欠失型の F c 多量体融合タンパク質 A C E 2 - h F c (n)、第 4 の態様のベクター又は第 5 の態様の哺乳動物細胞株を用いて前記薬物をスクリーニングすることを含む方法を提供する。

【 0 0 7 7 】

30

第 1 0 の態様において、本発明は、A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスの感染に抵抗する薬物をスクリーニングする方法であって、F u r i n プロテアーゼ、又はコロナウイルスの S タンパク質の F u r i n 酵素切断部位を薬物スクリーニングの標的として利用することを含む方法を提供する。

【 0 0 7 8 】

前記薬物は F u r i n プロテアーゼ阻害剤であってもよい。

【 0 0 7 9 】

前記薬物は A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスの感染において、F u r i n 酵素切断部位を含む S タンパク質により合胞体が形成されることを遮断する。

【 0 0 8 0 】

40

第 1 1 の態様において、本発明は、F u r i n プロテアーゼ又はコロナウイルスの S タンパク質の F u r i n 酵素切断部位を標的とする試薬の、A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスの感染に対する薬物の製造における適用を提供する。

【 0 0 8 1 】

特に、本発明は、A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスの感染において F u r i n 酵素切断部位を有する S タンパク質により合胞体が形成されることを遮断する試薬の、A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスの感染に対する薬物の製造における適用に関する。

【 0 0 8 2 】

好ましくは、前記試薬は F u r i n プロテアーゼ阻害剤である。

50

【 0 0 8 3 】

前記コロナウイルスは S A R S - C O V 2 である。

【 0 0 8 4 】

第 1 2 の態様において、本発明は、突然変異した S タンパク質を提供し、前記 S タンパク質は欠失型、及び／又は F u r i n 酵素切断部位に突然変異が発生した形態である。

【 0 0 8 5 】

前記欠失型とは、S タンパク質は細胞外ドメイン (S 1 + S 2) のみを含み、つまり、膜貫通領域及び細胞内領域が欠失していることである。

【 0 0 8 6 】

前記 F u r i n 酵素切断部位に突然変異が発生したことは、1 つ又は複数のアミノ酸を欠失、置換又は添加することにより、F u r i n 酵素切断部位が F u r i n 酵素切断部位としての活性を有さなくなることである。

10

【 0 0 8 7 】

好ましくは、前記 F u r i n 酵素切断部位に突然変異が発生した形式とは、S タンパク質の F u r i n 酵素切断部位が R R A R から S R A S に突然変異したことである。

【 0 0 8 8 】

好ましくは、F u r i n 酵素切断部位が突然変異したことに加えて、前記突然変異した S タンパク質は細胞外ドメイン (S 1 + S 2) のみを含み、つまり、さらに膜貫通領域及び細胞内領域が欠失していることである。

【 0 0 8 9 】

20

前記突然変異した S タンパク質は S E Q I D N O : 1 0 、S E Q I D N O : 1 1 又は S E Q I D N O : 1 2 に示されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 9 0 】

前記 S E Q I D N O : 1 0 は S タンパク質の F u r i n 酵素切断部位が R R A R から S R A S に突然変異したアミノ酸配列である。前記 S E Q I D N O : 1 1 は欠失型の S タンパク質のアミノ酸配列であり、膜貫通領域及び細胞内領域が欠失している。前記 S E Q I D N O : 1 1 は、F u r i n 酵素切断部位が R R A R から S R A S に突然変異し、かつ膜貫通領域及び細胞内領域が欠失している欠失型の S タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 1 】

30

第 1 3 の態様において、本発明は、さらに、第 1 2 の態様の突然変異した S タンパク質の、A C E 2 に関連する疾患を治療するか又は予防するための薬物の製造における適用に関する。

【 0 0 9 2 】

前記疾患は A C E 2 を受容体とするウイルスの感染に起因する疾患であり、好ましくは、前記ウイルスはコロナウイルスであってもよく、好ましくは S A R S - C o V 、H C o V - N L 6 3 、又は S A R S - C O V 2 である。

【 0 0 9 3 】

前記疾患は肺炎、重症急性呼吸器感染、腎不全、心不全、急性呼吸窮迫症候群 (A R D S) 、肝臓損傷、腸疾患、又は重症急性呼吸器症候群から選択される。

40

【 0 0 9 4 】

前記薬物は医療従事者及び A C E 2 を受容体とするウイルス、特にコロナウイルスに曝される可能性がある他の者の受動免疫に用いることができる。

【 0 0 9 5 】

第 1 4 の態様において、本発明は、S A R S - C o V 2 の感染を予防するための組換えワクチンであって、第 1 2 の態様の S タンパク質を含む組換えワクチンを提供する。

【 0 0 9 6 】

S A R S - C o V 2 の S タンパク質における F u r i n 酵素切断部位及び F u r i n プロテアーゼは、薬物をスクリーニングするための標的である用途として用いられ、前記薬物は A C E 2 を受容体とするウイルスの感染による疾患の治療に用いることができる。

50

【0097】

本発明は、新型コロナウイルスSARS-CoV2のスパイクタンパク質におけるFurinプロテアーゼ切断部位が合胞体の形成に必須であることを判明し、具体的には、SARS-CoV2のスパイク(S)タンパク質は、681～685番目の残基の近傍(S1とS2の分離領域に隣接)にRRARモチーフを有し、該モチーフはFurin等のプロテアーゼによって切断される。配列比較により、該モチーフはSARS-CoV2の全ての既知のウイルス株の配列に存在するが、SARS-CoV2に最も近いRaTG13コウモリウイルス株に存在しない。データベース中のコウモリウイルス配列を比較すると、batSARS-HKU5ウイルスのみに近似配列(RRAT)がある。本発明者らは、野生型SARS-CoV2のSタンパク質及びFurinプロテアーゼ切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質発現プラスミドでトランスフェクトされた293T細胞はいずれもACE2-IgG1-Fcと結合することができ、空ベクターでトランスフェクトされたコントロール細胞はACE2-IgG1-Fcと結合しないことを発見した。野生型SARS-CoV2のSタンパク質及びFurinプロテアーゼ切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質は293T細胞の表面で正常に発現することができ、また、Furinプロテアーゼ切断部位が突然変異した後(すなわち、RRARからSRASに突然変異)、突然変異したSタンパク質は依然としてACE2-IgG1-Fcに結合することが可能であり、かつより強く結合する。

10

【0098】

合胞体の形成実験において、空ベクターのコントロール細胞と全長ヒトACE2(ヒト天然ACE2)を発現する細胞との間に細胞融合が発生せず、多核の合胞体の形成が観察されていないのに対して、野生型SARS-CoV2のSタンパク質の発現細胞グループにおいて、全長ヒトACE2を発現する細胞と3h共培養した後、大量の多核合胞体の形成が観察され、24h培養し続けた後、形成された合胞体が死亡する。しかし、SARS-CoV2のSタンパク質におけるFurin部位がRRARからSRASに突然変異した後、細胞融合の発生が完全に抑制され、多核合胞体の生成が観察されず、Sタンパク質が細胞融合を媒介誘導する能力を失ったことが示され、Sタンパク質におけるFurin部位が新型コロナウイルスSARS-CoV2の細胞への感染に関して非常に重要であることが明らかである。

20

【0099】

したがって、Sタンパク質のFurin部位(PRRAR)及びFurinプロテアーゼを標的とする薬物は新型コロナウイルスの感染確立を抑制する能力を有する。また、新型コロナウイルスが細胞に入る過程における融合ステップを抑制することによりSARS-CoV2を治療する抗ウイルス薬物を開発することができる。

30

【0100】

そして、SARS-CoV2 Sタンパク質におけるFurin部位RRARがSRASに突然変異した後、細胞融合の発生が完全に抑制され、多核合胞体の生成が観察されず、Sタンパク質が細胞融合を媒介誘導する能力を失ったことが示される。したがって、本発明のFurinプロテアーゼ切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質、特に、膜貫通領域及び細胞内領域が欠失しているFurinプロテアーゼ切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質は組換えタンパク質薬物としてウイルスの野生型Sと細胞受容体との結合を競争的に遮断することにより感染を遮断することができる。また、前記Furinプロテアーゼ切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質も組換えワクチンの候補分子とすることができ、野生Sタンパク質よりも安定である。

40

【0101】

新型コロナウイルスSARS-CoV2はβ属の新型コロナウイルスに属し、エンベロープを有し、粒子は円形又は楕円形であり、多形性を有し、直径は60～140nmであり、その表面のエンベロープスパイクタンパク質(Spike glycoprotein)(Sタンパク質)はコロナウイルスの主な抗原タンパク質であり、ウイルスの感染及

50

び伝播において非常に重要な役割を果たし、Sタンパク質は2つのサブユニットを有し、S1サブユニットは細胞表面受容体と結合し、S2サブユニットは膜融合過程に必要な基本的な要素を含む。

【0102】

新型コロナウイルスSARS-CoV2のエンベロープスパイクSpike(S)タンパク質のアミノ酸配列はSARS-CoVのSタンパク質と約76%の相同性を有し、相同性が高くないため、多くのSARS-CoVウイルスの中和抗体はSARS-CoV2ウイルスの感染を中和することができない。しかし、SARS-CoV2とSARS-CoVは同一の宿主細胞受容体タンパク質であるアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)を共用しており、SARS-CoVと同様に、SARS-CoV2ウイルス感染もACE2を標的細胞に侵入する受容体として利用しなければならない。つまり、SARS-CoV2のSタンパク質のアミノ酸配列はSARS-CoVのSタンパク質のアミノ酸配列に対して複数のアミノ酸の差異が存在するが、それらは依然として同一のACE2受容体タンパク質を利用して宿主細胞に入ることができ、ACE2タンパク質の表面がこの種のコロナウイルスのSタンパク質と構造上の高い相溶性を有し、配列に大きな差異があるウイルススパイクタンパク質に利用されやすい宿主タンパク質分子であることが示され、このため、ACE2は依然としてこの種のウイルスが将来ヒトに感染する導入点となる可能性がある。本発明により得られた可溶性ACE2及び活性中心が突然変異した可溶性ACE2(NN)は、ACE2を宿主受容体とするウイルスとACE2受容体との結合及びウイルス侵入を遮断することができ、今回の感染予防対策ひいては将来の可能な再爆発に対して、いずれも重要な意味を有する。

10

20

【0103】

そして、非常に重要なことは、新型コロナウイルスSARS-CoV2ウイルスの人々における流行に伴い、ヒト宿主への更なる適応及び人体免疫などの選択圧で、変異株が生まれることである。これらの変異株はウイルスの毒性及び抗原部位の変化を引き起こす可能性がある。類似する変更はSARS-CoVにおいて多くの観察及び記録がある。最新の新型コロナウイルスSARS-CoV2ウイルス配列決定データにより、そのSタンパク質の受容体結合ドメイン(RBD)の配列が依然として変異過程にあることが示されている。本発明により得られた可溶性ACE2及び活性中心が突然変異した可溶性ACE2(NN)の利点は、ウイルスがACE2を侵入受容体とすれば、ウイルスのタンパク質、特にSタンパク質がどのように突然変異しても、SARS-CoV2ウイルスをより強く中和できることにもある。継続的に進化するウイルスの防除に関しては、Sタンパク質のモノクローナル中和抗体と異なり、本発明の可溶性ACE2受容体は治療薬物として、天然の広域スペクトル中和能力を有し、ウイルスの変異に制限されず、かつ抗体スクリーニング作業を進める必要がないため、現在及び将来のしばらくの間での防疫の緊急需要に非常に適する。実験結果によると、本発明の五量体ACE2-NN-hFc5は現在出現した主な変異株のシュードウイルスの感染に対していずれも強い中和活性が示されている。

30

【0104】

また、抗体薬物と異なり、受容体が人体自身のタンパク質であるため、組織交差反応性アッセイを行う必要がない。急性伝染病の緊急使用及び受容体融合タンパク質の長半減期のために、通常1~2回投与して治療するため、抗薬物抗体の研究、長期毒性の研究が免除され、開発サイクルをスピードアップすることができる。

40

【0105】

本発明のACE2-Fc融合タンパク質、及び可溶性ACE2の多量体Fc融合タンパク質(ACE2-NN-hFcn)は新たな感染事態が爆発する時に選択可能な最も迅速で特異的な治療薬であり、その利点は主に以下のいくつかの側面で現れる。

(1) 中和抗体としてウイルスの逃走を回避すること。

(2) SARS-CoV2及びSARS-CoVウイルスによる合胞体の形成に抵抗することができること。

(3) Fcドメインのエフェクター機能が保留されたため、関連する受容体により補体、

50

樹状細胞、マクロファージ及びナチュラルキラー細胞を募集してウイルス粒子又は感染された細胞に抵抗することができること。

(4) 可溶性ACE2分子のサイクル半減期を延長すること。

(5) この前に、組換えヒトACE2(rhACE2)に対する第二相臨床試験があり、被験者の臨床症状が顕著に改善されていないが、耐性及び安全性が良好であることが示され、したがって、本発明のACE2-Fc、ACE2(NN)-Fc又はACE2-NN-hFcは現在の緊急事態でのコンパッショネート・ユースに適し、その後に正式な臨床試験を行うことが可能であることが示されること。

(6) 本発明のACE2-Fc、ACE2(NN)-Fc又はACE2-NN-hFcを利用して、ワクチンの前に、感染している患者に対して、将来の数ヶ月乃至数年間に
10 広く適用されることを助けることができること。

(7) 本発明により得られた可溶性ACE2を利用してウイルスの感染を遮断することはACE2の天然酵素活性に依存せず、患者の体内の天然ACE2の活性にも影響を与えず、さらに、活性中心が突然変異した可溶性ACE2(NN)はACE2酵素活性が体内にもたらず潜在的な副作用を回避したため、人体での使用の安全性を最大限に向上させること。

(8) 抗Sタンパク質抗体に比べて、可溶性ACE2の別の利点としては、ウイルスがACE2を侵入抗体とすれば、ウイルスの突然変異は、ウイルスの突然変異による受容体とのアフィニティの増強を含み、可溶性ACE2の有効性に影響を与えないこと。

【0106】

20

ACE2はメタロプロテアーゼの一種であり、その作用としては、アンジオテンシンIからアンジオテンシンノナペプチド(1-9)への分解、又はアンジオテンシンIIからアンジオテンシンヘプタペプチド(1-7)への分解を触媒するものであり、心血管機能の調整に関与するとともに急性肺損傷において保護作用を有する可能性があると考えられ、例えば、血管拡張、抗増殖、抗酸化ストレス等で機能する。ACE2は血管系及びほとんどの臓器で発現されるが、主に肺、心臓、肝臓、腎臓及び精巣で発現される。したがって、ACE2酵素活性を阻害する候補薬物は理想的な薬物ではない。

【0107】

ヒト天然ACE2(膜型ACE2と呼ばれる)の全長は805個のアミノ酸があり、なかでも、1~740番目のアミノ酸は細胞外セグメントであり、残りの65個のアミノ酸は短い膜貫通領域と細胞内領域とする。ACE2の酵素活性はいずれも細胞外セグメントに担われる。本発明の可溶性ACE2又はその欠失型は膜貫通ドメインを有しない。

30

【図面の簡単な説明】

【0108】

【図1】精製して得られたACE2-hFc-ACE2融合タンパク質、ACE2-ACE2-hFc融合タンパク質とACE2-hFc5融合タンパク質及びACE2-hFc5-L309C融合タンパク質のSEC-HPLCピーク図を示す。

【図2】新型コロナウイルスのスパイクタンパク質が合胞体の形成を誘導することができることを示す。

【図3】ACE2-hFc5融合タンパク質がインビトロで新型コロナウイルスのスパイクタンパク質によって媒介誘導される細胞間膜融合を顕著に抑制することを示す。

40

【図4】新型コロナウイルスSARS-CoV2のSpikeタンパク質(Sタンパク質)のアミノ酸配列(SEQ ID NO:9)及びFurin部位を示す。

【図5】Furin酵素切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質のアミノ酸配列(SEQ ID NO:10)を示す。

【図6】SARS-CoV2のSタンパク質の細胞表面発現及びFurin部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質の細胞表面分析結果を示す。

【図7】空ベクターのコントロール細胞(赤色標識)とヒトACE2が発現した細胞(緑色標識)との間に細胞融合が発生せず、多核の合細胞の形成が観察されていないが、野生型新型コロナウイルスのSタンパク質発現細胞(赤色標識)グループにおいて、ACE2
50

が発現した細胞（緑色標識）と3h共培養した後、大量の多核合胞体の形成が観察され、24h持続培養した後、形成された合胞体が死亡したこと、furin部位が突然変異したSタンパク質とACEが発現した細胞とを混合した後に合胞体が発生しないことを示す。

【図8】SARS-CoV2のSタンパク質野生型Ect domain(1-1208aa)(SEQ ID NO:11)、及びFurin酵素切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質のEct domain(1-1208aa)(SEQ ID NO:12)を示す。

【図9】ACE2-hFc及びACE2-hFc5融合タンパク質と新型コロナウイルススパイクタンパク質RBDとのアフィニティ及びアビディティを示す。

【図10】異なる形式のACE2融合タンパク質多量体が新型コロナウイルスのシュードウイルス(D614)の感染を抑制することを示す。

10

【図11】ACE2-hFc5融合タンパク質が新型コロナウイルスのD614、G614、サーズウイルス、パンゴリンコロナウイルスのシュードウイルスの感染を抑制することを示す。

【図12】ACE2-hFc5融合タンパク質が新型コロナウイルスの生ウイルスの感染を抑制することを示す。

【図13】SEC-HPLC分析によるACE2-hFc5の霧化前後の物理化学的性質を示す。

【図14】霧化前後のACE2-hFc5分子のインビトロでの新型コロナウイルスのシュードウイルスの感染中和活性の評価結果を示す。

20

【図15】RT-qPCR定量分析によるハムスターの肺中の新型コロナウイルスgRNA及びsgRNAの含有量を示す。

【図16】異なる形式のACE2-IgG1融合タンパク質の分子構造概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0109】

以下の実施例は本発明を説明するために用いられるが、本発明の範囲を限定するものではない。本発明の精神及び実質から逸脱することなく、本発明の方法、ステップ又は条件に対する修正又は置換は、いずれも本発明の範囲に属する。

【0110】

特に示さない限り、実施例に使用された化学試薬はいずれも一般的な市販試薬であり、実施例に使用された技術手段は当業者によく知られた一般的な手段である。実施例及び図面における全てのFcはIgG1に由来する。実施例及び図面において全てのACE2-hFcは、異なる形態のACE2-hFcとは全てのACE2-hFc及びACE2-hFc多量体及び突然変異体を意味することが特に示さない限り、いずれもACE2-NN-hFc(ここで、単一のACE2欠失型及び単一の重鎖Fc領域はSEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を有する)である。実施例及び図面において全てのACE2-hFc-ACE2はいずれも四量体ACE2(NN)-hFc-ACE2(NN)(ここで、単一のACE2欠失型に単一の重鎖Fc領域が接続されてさらに単一のACE2が接続されて(ACE2-Fc-ACE2)SEQ ID NO:13に示されるアミノ酸配列を有する)である。実施例及び図面において全てのACE2-ACE2-hFcはいずれも四量体ACE2(NN)-ACE2(NN)-hFc(ここで、2つの直列接続されたACE2又はその欠失型に単一の重鎖Fc領域が接続されて(ACE2-ACE2-Fc)SEQ ID NO:14に示されるアミノ酸配列を有する)である。全てのACE2-hFc5はいずれもACE2(NN)-hFc(5)であることは、5つのポリペプチド単量体単位が5つのFc-ドメインC末端の10個の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体であることを意味し、各ポリペプチド単量体単位は2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を有する。実施例及び図面における全てのACE2-hFc5-L309Cは、いずれもACE2(NN)-hFc(5)-L309Cであり、5つのポリペプチド単量体単位が5つのFc-ドメ

30

40

50

インC末端の10個の尾部を介して互いに接続されて組み立てられた五量体を意味し、各ポリペプチド単量体単位は2つのACE2欠失型と2つの重鎖Fc領域で構成された二量体であり、単一のACE2欠失型と単一の重鎖Fc領域は、尾部と共にSEQ ID NO: 18に示されるアミノ酸配列を有し、そのうち重鎖Fc領域は309番目にL309C突然変異が発生した。図16を参照する。

【0111】

実施例1 ACE2-hFc融合タンパク質発現プラスミド、SARS-CoV2スタンパク質発現プラスミド及びFurin部位が突然変異したSARS-CoV2のスタンパク質発現プラスミドの構築

表1に示されるプライマーを利用し、Overlap PCRにより、CD33シグナルペプチド、ACE2メタロプロテアーゼドメイン細胞外領域(H374N及びH378N酵素不活性化部位を含む)及びhIgG1FcをコードするDNA配列を取得する。具体的なクローニング手順は以下のとおりである。ACE2-hFc発現プラスミドを構築する場合、pCDNA3.0-ACE2-NEMGEをテンプレートとし、2-FrontIn及び4-MidRを利用してPCRによりACE2細胞外領域(19-615aa)をコードする、酵素活性不活性化部位H374N及びH378Nを含むDNAフラグメントを取得する。pCHOGS-HH009をテンプレートとし、プライマー3-MidF及び5-IgG1Ctermを利用してPCRによりhIgG1Fcをコードする領域を取得する。次に上記PCRにより取得された生成物をテンプレートとし、プライマー6-FrontOutXhoI及び5-IgG1Ctermを利用してOverlap PCRによりCD33シグナルペプチド-ACE2細胞外領域-hFcをコードする全長DNAを合成する。次にXhoI及びPacI酵素切断部位によりpCHOGS発現ベクターにクローニングし、pCHOGS-ACE2-NN-hIgG1発現プラスミドを取得する。

【0112】

表1 ACE2-IgG1融合タンパク質発現プラスミド構築プライマー

Primer ID	Sequence (5'-3')
6-FrontOutXhoI	aagCTCGAGgccaccATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGC
2-FrontIn	CTGCCCTGCTGTGGGCAGGGGCGCTCGCTaccattgaggaacaggccaag
3-MidF	gactggagtccatatgcagacgagcccaaatcttCtgacaaaactcacacatgcc
4-MidR	ggcatgtgtgagttttgtcaGaagatttgggctcgtctgcatatggactccagtc
5-IgG1Cterm	cccTTAATTAAAtcatattaccg
7-Oligomer (pentamer) In	CATCACCAGAGACACGTTGTAGAGGGTGGGCTTGCCGGTtagacagggagaggtcttc
8-Oligomer (pentamer) Out	cccTTAATTAAAtcaGTAGCATGTGCCGGCGGTGTCGCTCATCACCAGAGACACGTTGTA

【0113】

新型コロナウイルススパイクタンパク質発現プラスミドpCAGGS-SARS-CoV2 S-C9を構築する場合、pCMV3-2019-nCoV-Spike(S1+S2)-long(Sino Biological, Cat#: VG40589-UT)をテンプレートとし、SB-S-NheI:CGTGCTAGCcGTGAACCTGACCACCAAGGACCCAA及びSB-S-C9-XhoI:CGCCTCGAGCTAGGCGGGCGCCACCTGGCTGGTCTCGGTGGTGTAGTGCA GTTTCACCTCCをプライマーとし、PCRによりSARS-CoV2スパイクタンパク質をコードするDNA配列を取得する。次に、NheI及びXhoI酵素切断部位を用いてpCAGGSベクターにクローニングする。ここで、N末端シグナルペプチドはC

D4シグナルペプチドであり、C末端はC9タグであり、SARS-CoV2のSタンパク質発現プラスミドを取得する。

【0114】

このプラスミドに基づいて、SB-S-NheI、SB-S-C9-XhoI及びSB-Drs-f: CAGCCCAagcAGGGCAagcTCTGTGGCAAGCCAGとSB-Drs-r: CTGGCTTGCCACAGAgctTGCCCTgctTGGCTGプライマーを用いて、Overlap PCRによりSタンパク質中のFurinプロテアーゼ切断部位PRRARをPRASに突然変異させることにより、Furin部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質発現プラスミドを取得する。

【0115】

実施例2 ACE2-hFc-ACE2融合タンパク質、ACE2-ACE2-hFc融合タンパク質とACE2-hFc5融合タンパク質及びACE2-hFc5-L309C融合タンパク質発現プラスミドの構築

ACE2-hFc-ACE2融合タンパク質、ACE2-ACE2-hFc融合タンパク質、ACE2-hFc5融合タンパク質、及びACE2-hFc5-L309C融合タンパク質発現プラスミドの構築はACE2-hFc融合タンパク質発現プラスミドの構築と類似し、実施例1の方法で構築される。

【0116】

実施例3 ACE2-hFc融合タンパク質及びACE2-hFc5融合タンパク質の発現、精製及びSEC-HPLC分析

実施例1で構築されたACE2-hFc融合タンパク質を発現する発現プラスミド、及び実施例2で構築されたACE2-hFc5融合タンパク質を発現する発現プラスミドを、それぞれPEIにより293F細胞をトランスフェクトし、トランスフェクトしてから5日後に培養上清を収集し、それぞれProtein Aカラムにより一段階で精製し、それぞれ精製されたACE2-hFc融合タンパク質及びACE2-hFc5融合タンパク質を取得する。Nano drop2000タンパク質で定量した後、SEC-HPLC純度分析を行う(図1A及び図1Cを参照する)。図1Aから分かるように、得られたACE2-hFc融合タンパク質の純度分析には1つのピークのみを有し、主ピークは99.34%である。図1Cから分かるように、得られたACE2-hFc5融合タンパク質の純度分析には1つのピークのみを有し、主ピークは66.94%である。

【0117】

実施例4 ACE2-hFc-ACE2融合タンパク質、ACE2-ACE2-hFc融合タンパク質及びACE2-hFc5-L309C融合タンパク質の発現、精製及びSEC-HPLC分析

実施例2で構築されたACE2-hFc-ACE2融合タンパク質、ACE2-ACE2-hFc融合タンパク質及びACE2-hFc5-L309C融合タンパク質を発現する発現プラスミドをそれぞれPEIにより293F細胞にトランスフェクトし、トランスフェクトしてから5日後に培養上清を収集し、それぞれProtein A及び分子篩の二段階で精製した後それぞれ精製されたACE2-ACE2-hFc融合タンパク質、ACE2-hFc-ACE2融合タンパク質及びACE2-hFc5-L309C融合タンパク質を取得する。Nano drop2000タンパク質で定量した後、それぞれSEC-HPLC純度分析を行う(図1B、図1D及び図1Eを参照する)。図1Bから分かるように、ACE2-ACE2-hFc融合タンパク質の主ピークは98.96%であり、図1Dから分かるように、ACE2-hFc-ACE2融合タンパク質の主ピークは97.99%であり、図1Eから分かるように、ACE2-hFc5-L309C融合タンパク質の主ピークは97.99%である。

【0118】

実施例5 ACE2-hFc5融合タンパク質の発現、精製及びSEC-HPLC分析

実施例2で構築されたACE2-hFc5融合タンパク質を発現する発現プラスミドをPEIにより293F細胞にトランスフェクトし、トランスフェクトしてから5日後に培

10

20

30

40

50

養上清を収集し、複数の段階で精製した後に精製されたACE2-hFc5融合タンパク質を取得する。Nano drop 2000タンパク質で定量した後、SEC-HPLC純度分析を行う(図1Fを参照する)。図1Fから分かるように、ACE2-hFc5融合タンパク質の主ピークは99.2%である。

【0119】

実施例6 インビトロの細胞間膜融合抑制実験

6.1 方法 ACE2融合タンパク質の新型コロナウイルス(SARS-CoV2)による合胞体形成に対する抵抗実験 それぞれpCAGGS空ベクター、SARS-CoV2スパイクタンパク質及びSARSスパイクタンパク質を発現するプラスミドを、それぞれpEGFP-N1と共にPEIにより293T細胞に共トランスフェクトする。hACE2-C9(実験室に保存される)を発現するプラスミドをpmCherry-C1と共にPEIにより293T細胞に共トランスフェクトし、トランスフェクトしてから24h後、細胞を消化し、DMEM完全培地(10%FBS、1×PS)で細胞を一回洗浄してカウントし、その後にそれぞれ10µg/mlのコントロールタンパク質及びACE2-hFc5融合タンパク質を2.5E5/ウェルの空ベクターコントロール細胞、SARS-CoV2-S及びSARS-Sトランスフェクトされた細胞と37℃で30min共インキュベートし、その後に2.5E5/ウェルでhACE2-C9トランスフェクトされた細胞を添加し、37℃、5%CO2細胞インキュベータで3h共培養した後、蛍光顕微鏡でACE2-hFc5融合タンパク質の新型コロナウイルス(SARS-CoV2)による合胞体形成に対する抵抗状況を観察し、実験結果を撮影記録する。

【0120】

6.2 図2から分かるように、SARS-CoV2ウイルスグループ及びSARSウイルスグループにいずれも大量の合胞体の形成が見られ、そしてSARS-CoV2ウイルスグループに、合胞体の数が最も多く、空ベクターのコントロールグループに、細胞融合の現象が見られず、この結果はSARS-CoV2ウイルススパイクタンパク質とSARSウイルススパイクタンパク質が類似し、細胞が融合して合胞体を形成するように誘導する能力を有し、かつその誘導能力がSARSウイルススパイクタンパク質よりも強いことが示されている(図3の上図)。これはSARS-CoV2ウイルススパイクタンパク質と受容体hACE2とのアフィニティがSARSウイルススパイクタンパク質よりも強いことも間接的に証明されている。実験においてACE2-hFc5融合タンパク質を添加した後、本発明者らはコントロールタンパク質と比較して、ACE2-hFc5融合タンパク質がSARS-CoV2ウイルスのスパイクタンパク質の誘導による合胞体の生成を明らかに抑制することができ、抑制率が90%以上に達し、さらに、SARSウイルスによる合胞体の生成を完全に抑制することができることを観察した。

【0121】

また、本発明者らは、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質が発現した細胞と受容体ACE2発現細胞を共インキュベートする時、大量の合胞体が形成されることを観察した(図3の下図)。それは新型コロナのスパイクタンパク質が受容体ACE2と結合した後に膜融合過程を誘導することができ、20h時に多核合胞体がより明らかになることが説明される。実験系に10µg/mlのACE2-hFc5を添加して処理した後、合胞体の数を明らかに低減することができ、抑制率が90%以上に達する。同じ条件で、ACE2-hFc5抑制効果は明らかではない。さらに、本発明者らは、ACE2-hFc5分子が用量依存の方式で合胞体の形成を抑制し、0.3µg/mlの低濃度の条件で、ACE2-hFc5が依然として合胞体の形成を抑制する顕著な活性を有することを観察した。

【0122】

コロナウイルスを含むエンベロープウイルスのウイルス膜と細胞(内)膜の融合は感染の重要な一步であり、合胞体の形成はSARS-CoV2ウイルスが人体に感染した後に肺で発生した突出した病理変化である。本発明者らの実験結果によると、ACE2-hFc5融合タンパク質は強い合胞体形成抵抗活性を有し、コロナウイルス、特にSARS-CoV2の感染を遮断することができる。

10

20

30

40

50

【0123】

実施例7 野生型SARS-CoV2のSタンパク質及びFurinプロテアーゼ切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質の細胞表面発現分析及び合胞体形成実験

それぞれpCAGGS空ベクター、SARS-CoV2のSタンパク質及びFurin部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質（PRRARからPSRASに突然変異した）を発現するプラスミド及びpmCherry-C1をPEIにより293T細胞に共トランスフェクトする。全長ACE2（細胞外部分、膜貫通領域及び細胞内領域を有する）を発現するプラスミド及びpEGFP-N1をPEIにより293T細胞に共トランスフェクトし、トランスフェクトしてから24h後に、細胞を消化し、DMEM完全培地（10%FBS、1×PS）で細胞を一回洗浄してカウントし、その後一部空ベクターコントロール細胞を取り、SARS-CoV2のSタンパク質（SEQ ID NO:9）（図4参照）及びFurin部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質（SEQ ID NO:10）（図5参照）が発現した細胞はSARS-CoV2のSタンパク質の細胞表面発現の検出に用いられ、残りの一部の細胞は合胞体形成実験に用いられる。

10

【0124】

SARS-CoV2のSタンパク質細胞の表面発現の検出を行う場合、20µg/mlのACE2-NN-Fc融合タンパク質を取り、それぞれ上記細胞と氷上で45minsインキュベートし、その後FACS buffer（PBS、0.5%BSA）で細胞を三回洗浄し、その後1:300で希釈されたFITC-抗-ヒト-Fc-二次抗体（F9512、Sigma）を添加して氷上で30minsインキュベートし、FACS buffer（PBS、0.5%BSA）で細胞を三回洗浄した後、フローサイトメーターでSARS-CoV2 Sタンパク質の表面発現を分析し、及びFurin部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質の発現結果をFlowJo V10ソフトウェアで分析し、その結果は図6を参照する。

20

【0125】

合胞体の形成実験において、それぞれ2.5E5/ウェルで空ベクターコントロール細胞、SARS-CoV2 Sプラスミド及びFurin部位が突然変異したSARS-CoV2 Sプラスミドでトランスフェクトされた細胞をそれぞれ48ウェル細胞培養プレートに接種し、30min後、上記細胞を含有するウェルに2.5E5/ウェルでACE2トランスフェクトされた細胞を添加し、37℃で、5%CO2細胞インキュベータで3h共培養し続けた後、蛍光顕微鏡でウイルス合胞体の形成状況を観察し、実験結果を撮影記録する。図7に示されるように、空ベクターコントロール細胞（赤色標識）とヒト全長ACE2を発現する細胞（緑色標識）との間に細胞融合が発生せず、多核の合胞体の形成が観察されていないのに対して、野生型新型コロナウイルスSタンパク質発現細胞（赤色標識）グループにおいて、ヒト全長ACE2を発現する細胞（緑色標識）と3h共培養した後、大量の多核合胞体の形成が観察される。SARS-CoV2のSタンパク質中のFurin酵素切断部位RRARがSRASに突然変異した後、細胞融合の発生が完全に抑制され、多核合胞体の生成が観察されず、Sタンパク質が細胞融合を媒介誘導する能力を失ったことが示されている。したがって、SARS-CoV2のSタンパク質中のFurin部位が新型コロナウイルスSタンパク質によって媒介誘導される細胞融合に必要なことが分かる。

30

40

【0126】

そして、Furinプロテアーゼ切断部位が突然変異したSARS-CoV2のSタンパク質はウイルス細胞融合及び多核合胞体の形成を抑制する顕著な効果を有する（図7の最も右側の画像を参照する）。

【0127】

実施例8 異なる形式のACE2-hFc融合タンパク質のアフィニティ、アビディティ分析

50

8.1 方法

表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance、SPR) 技術及びバイオレイヤー干渉法 (Bio-Layer Interferometry、BLI) 技術を適用し、それぞれ ACE2-NN-hFc 及び ACE2-NN-hFc5 融合タンパク質と新型コロナウイルスのスパイクタンパク質 (SARS-CoV-2 S) 受容体結合領域 RBD (aa331-527) とのアフィニティ (Affinity、BIAcore T200 機器) 及びアビディティ (Avidity、Fortebio Octet RED384 機器) を測定する。

【0128】

アフィニティを測定する場合、まず ACE2-hFc と ACE2-hFc5 融合タンパク質を抗ヒトFc抗体で被覆されたCM5バイオセンサチップの表面に捕捉し、次に SARS-CoV-2 のRBDタンパク質 (C末端にHis6-Aviタグを有する) (200nM~6.25nMの間の2倍段階希釈サンプル) を30μl/minの速度でチップを流れ、タンパク質分子間の結合及び解離速度を測定する。1:1のLangmuir結合モデル (BIA Evaluationソフトウェア) を使用して結合定数 (Ka) 及び解離定数 (Kd) を算出し、解離定数 (KD) を平衡化する。アビディティ (avidity) の測定について、まず20μg/mlのC末端His6-Aviタグを有するSARS-CoV-2のRBDタンパク質をストレプトアビジンバイオセンサの表面に捕捉し、次に異なる濃度のACE2-hFc (0nM、1.65~105.3nMの間の2倍段階希釈) 及びACE2-hFc5融合タンパク質 (0nM、8.22~526.3nMの間の2倍段階希釈) を分析物とし、RBDが結合されたセンサの表面に180秒結合し、その後に300秒の解離を行う。1:1の結合モデル (Fortebio data Analysis 11.1-kneticsソフトウェア) を用いて結合定数Ka、Kd 及びKDを算出する。

【0129】

8.2 結果

単価結合のアフィニティを測定する方法 (BIAcore T200) (図9参照) を採用し、本発明者らはACE2-hFcとACE2-hFc5融合タンパク質が同様なSARS-CoV-2 RBDと結合するアフィニティを有し、それぞれ26.4nM及び29.1nMであることを発見した。本発明者らはFortebioを利用してACE2-NN-hFc 及びACE2-NN-hFc5融合タンパク質とスパイクタンパク質RBDとのアビディティを分析した。実験において20μg/mlのRBD-His-aviタンパク質をストレプトアビジンバイオセンサの表面に捕捉し、異なる濃度のACE2-NN-hFc 及びACE2-NN-hFc5融合タンパク質を移動相とし、実験結果はOctet Data Analysis 11.0ソフトウェアを利用してデータを分析し、ここで0nMを背景値として減算する。結果に示されるように (図9)、ACE2-hFc融合タンパク質に対して、多量化改造後のACE2-hFc5融合タンパク質はスパイクタンパク質RBD-His-aviとのアビディティが顕著に強化され、そのKD値 (<1.0E-12M) は機器の測定範囲を超えた。

【0130】

実施例9 インビトロ新型コロナウイルスのシュードウイルスの中和実験

9.1 方法

9.1.1 新型コロナウイルスのシュードウイルスの包装

新型コロナウイルス株 (D614) のシュードウイルスを包装する時、HEK293T細胞を10cmの細胞培養皿に接種し、細胞密度が80%に達した時、Lipofactamine 3000で新型コロナウイルスの全長スパイクタンパク質の発現プラスミドpSARS-CoV2 S-C9 (D614)、包装プラスミドpSPAX2 及びフルオレセイン発現プラスミドpHIV-Lucを共トランスフェクトし、1:3:4の比率で細胞にトランスフェクトし、細胞にトランスフェクトしてから6h後、培地を捨て、新鮮な2% FBS、ペニシリンを含有するDMEM培地を添加して48h培養し続け、シュード

ウイルスの粒子を含有する培養上清を収集し、遠心分離し、濾過して細胞のフラグメントを除去し、その後に - 80 の冷蔵庫に凍結保存して使用に備える。他の新型コロナ変異株及びサーズ、パンゴリンコロナウイルスを包装する場合、変異株のスパイクタンパク質を発現するプラスミドで p S A R S - C o V 2 S - C 9 (D 6 1 4) を取り替える以外、他の製造条件は同じである。本発明に使用された新型コロナウイルスのシュードウイルスは、新型コロナ初期ウイルス株 (D 6 1 4)、F u r i n 部位が突然変異した新型コロナ初期ウイルス株 (D 6 1 4)、新型コロナ主流行株 G 6 1 4、新型コロナ変異株 D 6 1 4 (L 1 8 F、A 2 2 V、V 3 6 7 F、N 4 3 9 K、Y 4 5 3 F、N 5 0 1 Y、T 4 7 8 I、P 1 2 6 3 L)、S A R S コロナウイルス、パンゴリンコロナウイルスを包含する。
【 0 1 3 1 】

10

9 . 1 . 2 新型コロナウイルスのシュードウイルスの中和実験

新型コロナウイルスのシュードウイルスの中和実験を行う場合、まずヒト A C E 2 を安定的に発現する 2 9 3 T - A C E 2 細胞を 1 E 5 / w e l l で不透明な 9 6 ウェル細胞培養プレートに敷き、C O 2 インキュベータに置いて 3 7 で 2 0 h 培養した後に中和実験を行う。実験当日、7 5 μ l の新型コロナウイルスのシュードウイルスと 2 5 μ l の段階希釈された異なる形式の可溶性 A C E 2 融合タンパク質とを均一に混合し、室温で 3 0 分間インキュベートし、9 6 ウェル細胞培養プレート中の細胞培養上清を捨て、その後、予め混合されたシュードウイルスと A C E 2 融合タンパク質との混合物を 2 9 3 T - A C E 2 細胞に添加し、C O 2 インキュベーター中で 3 7 で 2 4 h 培養した後、液体を交換して新鮮な 2 % F B S を添加し、D M E M 培地で培養し続け、2 4 h 培養した後、B r i g h t - G l o ールシフェラーゼ測定システムを用いてルシフェラーゼ活性を測定し、マイクロプレート発光装置を用いて測定する。実験において少なくとも 2 つのデュプリケートウェルが設置され、P B S コントロールウェルが設置されている。

20

【 0 1 3 2 】

9 . 2 結果

9 . 2 . 1 異なる形式の A C E 2 - h F c 融合タンパク質多量体による新型コロナウイルスのシュードウイルスの感染に対する中和

異なる形式の A C E 2 - h F c 融合タンパク質による新型コロナウイルスのシュードウイルスの感染に対する中和活性を比較する場合、ヒト A C E 2 が安定して発現した 2 9 3 T 細胞を宿主細胞とし、A C E 2 - N N - h F c 融合タンパク質を段階希釈して S A R S - C o V - 2 のシュードウイルスと均一に混合した後に 2 9 3 T - A C E 2 細胞に感染させ、感染させた後の 2 日目に細胞内のルシフェラーゼの活性 (R L U) を測定し、ウイルス感染された P B S コントロールグループの細胞内のルシフェラーゼの活性 (R L U) を基数として異なる A C E 2 - N N - h F c 融合タンパク質濃度での抑制百分率を算出する。図 1 0 に示されるように、異なる形式の A C E 2 - h F c 融合タンパク質はいずれも S A R S - C o V - 2 のシュードウイルス (D 6 1 4) 感染に対して中和活性を有し、なかでも、A C E 2 - h F c 5 及び A C E 2 - h F c 5 L 3 0 9 C のインビトロ中和活性が最も高く、I C 5 0 はそれぞれ 9 . 8 6 n g / m l 及び 1 2 . 4 n g / m l である。A C E 2 - h F c - A C E 2 T e t r a m e r (四量体) 及び A C E 2 - A C E 2 - h F c T e t r a m e r (四量体) がそれに次いで、I C 5 0 はそれぞれ 3 9 . 3 1 n g / m l 及び 2 6 0 . 8 n g / m l である。A C E 2 - N N - h F c の中和活性が最も低い。この結果により、A C E 2 融合タンパク質の新型コロナウイルス感染を中和する活性がそれと新型コロナスパイクタンパク質 R B D とのアビディティに正比例し、多量化程度が高いほど、中和効果が高く、多量化の改造が A C E 2 - h F c 融合タンパク質の中和活性を顕著に強化することが示されている。

30

40

【 0 1 3 3 】

9 . 2 . 2 A C E 2 - N N - h F c 5 は広域スペクトルの新型コロナウイルス感染に抵抗する中和活性を有する

A C E 2 - N N - h F c 5 の新型コロナ変異株及び関連するコロナウイルスに対する広域スペクトルの抗感染活性を評価するために、人々に現れた主な流行変異株に基づいて、

50

本発明者らは様々な一点突然変異の新型コロナシュードウィルスを包装し、293T-ACE2安定型細胞株感染モデルでACE2-NN-hFc5の中和活性を評価した。その結果によると、ACE2-NN-hFc5分子は新型コロナウイルスの初期ウイルス株D614、主な流行株G614及び他の変異株、並びにSARS及びパンゴリンコロナウイルスのシュードウィルスに対していずれも強い中和活性を有し、その広域スペクトルの抗ウイルス能力が示され、新型コロナウイルスの主な流行株G614のシュードウィルスに対する中和活性IC50は9.56 ng/mlに達した(図11、下記の表2)。新型コロナウイルスの主な変異株のシュードウィルス感染に対する中和活性の側面(表3)において、その結果はACE2-NN-hFc5多量体が依然として強いインビトロ中和能力を有することが示され、特にN501Y変異株に対して、ACE2-NN-hFc5の中和活性がより強く、IC50が0.036 ng/mlであった。以上の結果により、ACE2-NN-hFc5がインビトロで効率的で、広域スペクトルの抗新型コロナウイルス活性を有することが説明される。

10

【0134】

表2. ACE2-hFc5多量体の新型コロナウイルスD614、G614、サーズウイルス、パンゴリンコロナウイルスのシュードウィルスの感染に抵抗する中和活性

	D614	G614		
IC ₅₀ (ng/ml)	17.09±7.08	9.56±0.25	84.54±33.4	108.2

20

【0135】

表3. ACE2-hFc5多量体の新型コロナウイルスの主な変異株のシュードウィルスの感染に抵抗する中和活性

SARS-CoV-2 variants pseudovirus	L18F	A222V	V367F	N439K	Y453F	N501Y	T478I	P1263L
IC ₅₀ (ng/ml)	0.669	1.151	1.975	0.2668	0.8352	0.036	0.86	2.168

30

【0136】

実施例10 インビトロ新型コロナウイルス生ウイルス中和実験

10.1 方法

Ver o細胞を96ウェルプレートに接種し、細胞密度は約2×10⁴/ウェルである。翌日、細胞培養液を2%FBS-DMEM培地に変更する。2%FBS-DMEM培養液を用いて作業濃度が20μg/ml、2μg/ml、0.2μg/mlになるまでACE2-hFc融合タンパク質を希釈し、各サンプルに3つのデュプリケートウェルを設置する。2019-nCoV(ウイルス株:C-Tan-nCoV Wuhan strain 01)を2%FBS-DMEM培養液で200TCID₅₀/100μlに希釈する。希釈されたサンプル50μlを等量の200TCID₅₀ウイルスに添加し、37℃で1hインキュベートする。次に100μlの抗体-ウイルス複合体を細胞に添加し、37℃でインキュベートする。37℃で48hインキュベートした後にCPEを観察し、48h後に培養上清を100μl吸い取って核酸抽出を行い、最後に80μlの溶出液で溶出させる。核酸5μlを取って体系を調製し、ABIQ5蛍光定量PCR装置でリアルタイム蛍光RT-PCR反応を行う。測定されたサンプルCT値を検量線に代入してサンプル中のウイルスTCID₅₀を算出する。以下の式に基づいて算出する。

40

ウイルス複製抑制率(%)=(コントロールグループのTCID₅₀-融合タンパク質グ

50

ループのTCID₅₀)/コントロールグループのTCID₅₀×100%

以上の実験はバイオセーフティーレベル3の実験室で完了した。

【0137】

10.2 結果

Vero細胞を宿主細胞としてバイオセーフティー実験室でACE2-hFc5の新型コロナウイルス2019-nCoVの生ウイルス(C-Tan-nCoV Wuhan strain 01)に対する中和効果を評価した。実験結果によると(図12を参照)、ACE2-hFc5及びACE2-hFcは新型コロナウイルスの感染に対していずれも明らかな中和活性を有し、IC₅₀はそれぞれ0.02~0.06 µg/ml及び5.3~6.8 µg/mlである。中和能力において、ACE2-NN-hFc5のインビトロ中和効果がより優れ、ACE2-NN-hFcよりも数百倍高く、0.2 µg/mlの濃度で依然としてウイルスに対する80%の抑制作用が観察される。以上の結果により、ACE2-NN-hFc5分子がインビトロで効率的な抗新型コロナウイルス活性を有することが十分に示されている。

10

【0138】

実施例11 ACE2-hFc5融合タンパク質のハムスターにおける霧化吸入評価

11.1 方法

11.1.1 ACE2-NN-hFc5霧化吸入後の気道及び肺部での堆積分布分析

本発明者らは、小動物を選定してその全身を霧化投与システム(エアポンプ、質量流量計、曝露ボックスを含む)に曝露させ、Aerogen solo霧化器、アダプタ及び霧化収集装置を配置してACE2-hFc5の霧化投与実験を行った。気道堆積分布分析実験において、それぞれ霧化後の0h、6h及び24hに生理食塩水で灌流する方法でハムスターの鼻腔灌流液(Nasal Lavage Fluid、NLF)を収集する。主気管(trachea)、気管支(bronchus)及び肺胞(alveoli)についてそれぞれ収集した後に一定の割合を取って組織溶解液で溶解し、溶解した後に遠心分離して上清を取ってACE2-hFc5多量体の含有量を測定する。肺部堆積用量探索分析実験において、15分間、30分間、60分間で霧化吸入後に、各ハムスターについて4mLの生理食塩水を用いて灌流して肺胞灌流液(Bronchoalveolar Lavage Fluid、BALF)を収集し、残りの肺臓を取り出した後にホモジネートにし、一定の割合の肺ホモジネートを取って組織溶解液で溶解し、溶解した後に遠心分離して上清を取ってACE2-hFc5多量体の含有量を測定する。

20

30

【0139】

11.1.2 ELISAによるACE2-hFc5の含有量の分析

ACE2-hFc5多量体の含有量は、新型コロナウイルスRBDを用いてELISAの方法と組み合わせて分析した。2 µg/mLストレプトアビジンをコーティングし、2 µg/mLのBiotinで標識された新型コロナウイルスRBDを捕捉し、精製されたACE2-NN-hFc5を標準品として使用し、同時に、測定対象としての希釈された灌流液又は組織溶解液の上清を添加し、HRPで標識された抗hFcの二次抗体を使用して測定し、マイクロプレートリーダーでOD₄₅₀-OD₆₃₀の値を読み取る。

【0140】

40

11.1.3 SEC-HPLCによる霧化前後のACE2-hFc5の量体形態の分析

霧化前後のACE2-hFc5については、HPLCの方法で量体及び分解分析を行った。Agilent 1260高速液体クロマトグラフィー分析システムを使用し、G4000 TSK G4000 SWx1分析カラム及びTSK gel guard column SWx1保護カラムを使用した。緩衝液は50 mM PB、300 mM NaCl pH 6.7±0.1であり、分析時間は20分間又は25分間であり、流速は0.8 mL/分間である。

【0141】

11.2 結果 霧化投与方式により、ACE2-NN-hFc5はハムスターの肺胞に効果的に堆積することができる。

50

新型コロナの感染経路が主に気道伝播であり、かつ主な病巣が肺部であることを考慮し、本発明者らは霧化吸入による気道投与方式を検討した。本発明者らは、Aerogenの霧化器を用いてACE2-hFc5を霧化させ、対応するガラス試験管を用いて氷浴の条件下で霧化液滴を収集した。この収集方法の回収率は90%以上に達することができる。本発明者らはSEC-HPLCによりACE2-hFc5の霧化前後の物理化学的性質及び新型コロナウイルスのシュードウィルスの感染に抵抗する中和活性を分析した結果、霧化がACE2-NN-hFc5の凝集及び分解を引き起こさず（図13を参照）、かつ、新型コロナウイルスのシュードウィルスの感染に対して顕著な抑制活性を有し、その抗ウイルス能力は霧化前後に明らかな変化が発生しない（図14を参照）ことが示されている。

10

【0142】

さらに小動物への霧化曝露投与を用いてハムスターに50minの霧化吸入投与（5mg/mL ACE2-NN-hFc5）を行い、それぞれ霧化後の0h、6h及び24hにハムスターの鼻腔灌流液（Nasal Lavage Fluid、NLF）、主気管（trachea）、気管支（bronchus）及び肺胞（alveoli）を取ることで、気道の各成分におけるACE2-NN-hFc5の堆積分布状況を分析した。本発明者らは、投与終了後の0h、6h及び24hに、吸入後のACE2-hFc5が主に肺胞に分布している（約75%を占める）こと、鼻腔灌流液における分布が迅速に低下し、吸入後0hの17.33%から吸入後24hの0.7%まで低下すること、主気管における分布が少なく、0.35%～3.4%の間にあることを発見した。気管支内の分布は徐々に上昇し、5%から19%まで上昇する。この結果により、霧化吸入されたACE2-NN-hFc5は肺胞部位に効果的に到達することができ、かつ吸入後の24h以内にいずれも主に肺胞に分布することがわかる。

20

【0143】

本発明者らは、さらに、ハムスターにおけるACE2-hFc5の吸入用量と肺堆積との間の関係を研究するとともに、肺胞灌流液でのシュードウィルスの中和活性を分析した。濃度が5mg/mLのACE2-hFc5を使用し、霧化吸入させて15分間、30分間、60分間後、ハムスターの肺胞灌流液、及び肺ホモジネートを収集し、ELISA方式を使用してACE2-hFc5の含有量を測定し、肺胞灌流液及び肺ホモジネートにおけるACE2-NN-hFc5の合計を肺堆積総量として算出する。その結果によると、ACE2-hFc5霧化吸入後、ハムスターでの肺堆積量は投与量の増加に伴って増加することがわかる。吸入直後に、吸入時間が15分間、30分間、60分間にそれぞれ堆積量6.48μg、18.69μg、33.35μgに対応する。吸入が終了した後、ACE2-hFc5のハムスター肺部での堆積は迅速に低下し、吸入終了後12時間後、ハムスター肺部での堆積量は吸入直後の14.73%～46%に低下する。それにもかかわらず、霧化吸入時間が15分間及び30分間である条件下で、吸入終了後12時間後、4mLの生理食塩水で各ハムスターを灌流して得られた肺胞灌流液を4倍希釈した後に依然として90%以上の新型コロナウイルスのシュードウィルスの中和活性を保持することができる。

30

【0144】

実施例12 ACE2-NN-hFc5の新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）ハムスター感染モデルにおける薬効評価

12.1 方法

12.1.1 実験設計

全ての動物実験は、中国医学科学院昆明生物医学研究所の動物倫理委員会により承認され、中国雲南国家昆明高レベルバイオセーフティー実験室の操作仕様及びガイドに合致する。

【0145】

成年SPFレベルのハムスターを高レベルのバイオセーフティー実験室に移動した後、単独のケージで飼育する。ハムスターは、体重に応じて、未治療のコントロールグループ

40

50

、毎日2回の15分間の霧化治療グループ及び毎日2回の30分間の霧化治療グループという3つのグループに平均に分けられ、グループ毎に7匹である。実験において、ハムスターに鼻腔を介して104PFUのSARS-CoV-2ウイルス(GD108#)を接種し、2時間後、一回目の霧化吸入治療を行い、霧化時間はそれぞれ15分間(25mg ACE2-hFc5)及び30分間(50mg ACE2-hFc5)であり、その後12時間ごとに一回霧化治療し、合計6回であり、毎回の霧化前に秤量する。チャレンジした後に62h後は実験終点となり、肺臓組織を取ってSARS-CoV-2ウイルスのゲノム(gRNA)及びサブウイルスゲノム(sgRNA)量の分析を行う。100mgの肺組織(左肺)ごとに1mlのPBSを添加し、迅速にホモジネートにした後に200μlを取ってRNA抽出を行い、その後RT-qPCRでSARS-CoV-2ウイルスgRNA及びsgRNA量の分析を行う。統計学的分析はGraphPad Prism 8ソフトウェアを採用する。Two-tailed Mann-Whitney Uを用いて2つのグループの間の差異分析を行う。

10

【0146】

12.2 結果 ハムスター新型コロナウイルス感染モデルにおいて、ACE2-hFc5の霧化投与により、ウイルス量を効果的に低減することができる。

本発明者らが確立した霧化吸入投与方式に基づいて、本発明者らはハムスターSARS-CoV-2感染モデルを利用して、ACE2-NN-hFc5のインビボの抗ウイルス能力を評価した。実験は2つの用量グループを設定しており、それぞれ15分間の霧化吸入及び30分間の霧化吸入によりACE2-hFc5の薬効を評価した。ハムスターがSARS-CoV-2に感染した後、ウイルスの力価が3日目に最高に達し、時間の増加に伴ってウイルス血症が徐々に改善され、したがって、本発明者らはチャレンジした後の3日目を実験終点として選択する。ACE2-NN-hFc5で治療した後、ハムスターの体重の低下はわずかに改善される傾向がある。肺組織のgRNA及びsgRNAの定量結果から見ると、霧化吸入したACE2-hFc5は顕著な肺組織SARS-CoV-2ウイルス複製に対する抑制作用を有する(図15)。図15における実験終点のとき(チャレンジ後62時間後)、ハムスター肺臓におけるSARS-CoV-2ゲノム(gRNA)及びサブゲノム(sgRNA)の変化状況に対してqPCR分析を行った。

20

●未治療のコントロールグループ

■ACE2-hFc5-15min-BIDグループ

30

▲ACE2-hFc5-30min-BIDグループ

横線は中央値を示し、Mann-Whitney Uを用いて2つのグループの間の差異の統計学的分析を行った。したがって、霧化吸入したACE2-hFc5はハムスターSARS-CoV-2感染モデルのウイルス量を効果的に低減することができ、新型コロナ肺炎を予防治療する潜在的な能力を有する。

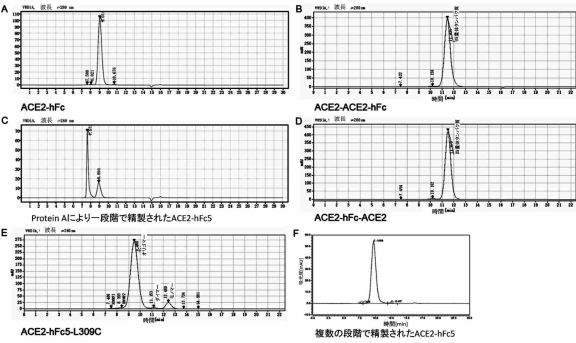
【0147】

以上において、一般的な説明、具体的な実施形態及び試験を用いて本発明を詳細に説明したが、本発明に基づいて、いくつかの修正又は改良を行うことができ、これは当業者にとって自明である。したがって、本発明の精神から逸脱することなく行われたこれらの修正又は改良は、いずれも本発明の保護範囲に属する。

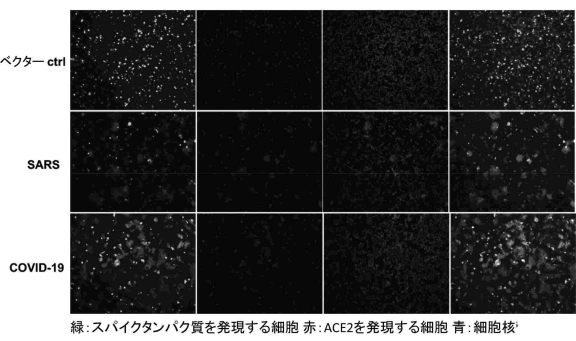
40

【図面】

【図 1】

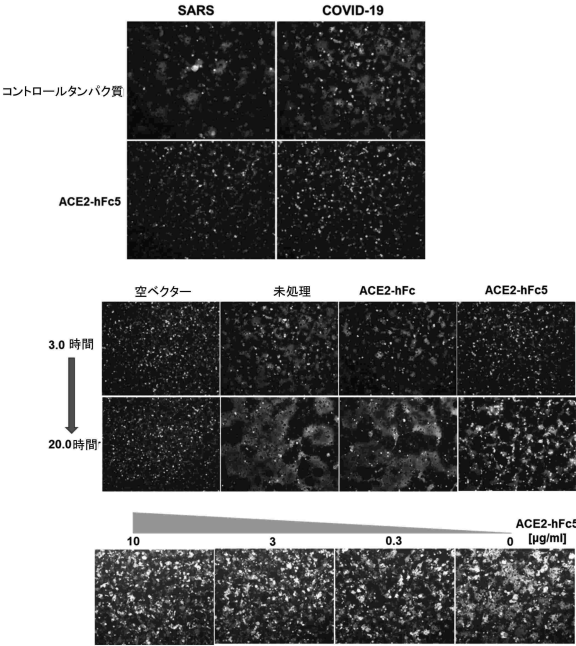


【図 2】



10

【図 3】



【図 4】

SARS-CoV2のSタンパク質及びFurin部位

MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDL
FLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGIKRFDNPVLPFNDGVYFAS TEKSNIRGWIFGT
TLDSTQSLIVNNATNVVIKVC EFQCNDFLGVYYHKNNKSWMSEFRVY
SSANNC TF EYVSQPF LMDLE GKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIY SKHTPINLV
RDL PQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGW TAGAAAYYV
GYLQPRIFLLKYNENGTTTDAVDCALDPLSE TKTLKSFTVEKGIYQTSNFRV
QPTESIVRFPNITNLC PFGEVFNATRFASVYAWNRRKRSNCVADYSVLYNSASF
TFKCYGVSPITKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKLPDD
FTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCN
GVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNL
VKNCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDI
TPCSFGGVSIIPTGNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
NVFQTRAGCLIGA EHVNNSEYCDIPIGAGICASYQTQTNSPRRAR
SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMKTSVDC TM
YICGDS TECSNLLQYGSFC TQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPI
KDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLG DIAARD
LICAQKFNGLTIVLPPLLTDEMI AQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQ
MAYRFNGIGV TQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQ
NAQALNTLVKQLSSNFGA ISSVLNDILSR LDKVEAEVQIDRLITGR LQSLQTYV
TQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFC GKGYHLM SFPQSAPHGV
VFLHVTVYVPAQEKNFTTAPAICH DGKAHFPREGVFVSN GTHWFTVQRNFYEP
QIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPD VDL
GDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLSLIDLQELGKYEQYKWPWYIWL G
FIAGLIAIVMVTIMLCMTSCCSC LKGCSCSGCCKFDEDDSEPV LKGVKLHY
T

20

30

40

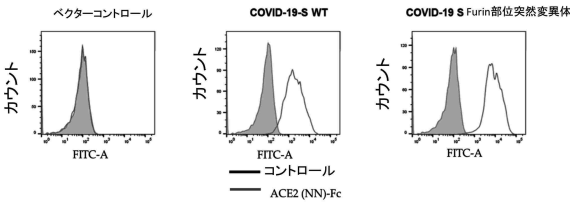
50

【図 5】

Furin酵素切断部位が突然変異したSARS-CoV2のスタンパク質

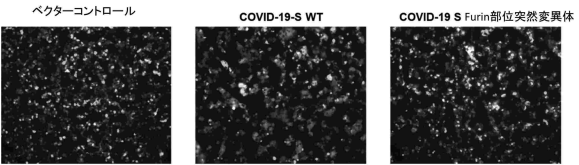
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDL
FLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGT
TLDSTQSLILVNNATNVVVKVCEFCNDPFLGVYHKNKNSWMESEFRVY
SSANNCTFEYVSQPFMDLEGGKQGNFKNLREFVFNKIDGYFKIYKSKHTPINLV
RDLPPQGSALPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSSSGWTAGAAAYV
GYLQPRITLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFVTEKGIYQTSNFRV
QPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLNYSASF
TFKCYGVSPITKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNKYLPDD
FTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCN
GVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNL
VKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDIT
TPCSFGGVSIVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
NVFQTRAGCLIGAHEVNNSYEDIPIGAGICASYQTQTNSPRASSVASQSIAY
TMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFITISVTTEILPVSMTKTSVDCITMYICGDS
TECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFS
QILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNG
LTVLPPLITDEMIQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFGIGV
VTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTL
VKQLSSNFGAIVSVLNDILSRIDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA
EIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYV
PAQEKNTTAPAICHGDKAHFREGVVFVSNGTWFWVTQRNFYEPQIITDNTFV
VSGNCDVVGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINA
SVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEYKWPWYIWLGFIAGLAIV
MVTIMLCCMTSCCCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLGKVKLHYT.

【図 6】



10

【図 7】



【図 8】

SARS-CoV2のスタンパク質野生型 Ectdomain(1-1208 aa)

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVS
GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSKTQSLILVNNATNVVVKVCEFCNDPFLG
VYHKNKNSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFMDLEGGKQGNFKNLREFVFNKIDGYFKIYKSKHTPIN
LVRLDLPQGSALPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRITLLKYNEN
GTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFVTEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWN
RRKRISNCVADYSVLNYSASFSTFKCYGVSPITKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNKY
LPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNVEGFNCYFPLQ
SYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ
FGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFSGGVSIVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWR
VYSTGSNVFQTRAGCLIGAHEVNNSYEDIPIGAGICASYQTQTNSPRASSVASQSIAYTMSLGAENSV
AYSNNSIAIPTNFITISVTTEILPVSMTKTSVDCITMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKN
TQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARD
LICAQKFNGLTVLPPLITDEMIQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFGIGVVTQNVLYE
NQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAIVSVLNDILSRIDKVE
AEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAP
HGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPAICHGDKAHFREGVVFVSNGTWFWVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNC
DVVGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESL
IDLQELGKYEQ.

Furin部位が突然変異したSARS-CoV2のスタンパク質のEctdomain(1-1208 aa)

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVS
GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSKTQSLILVNNATNVVVKVCEFCNDPFLG
VYHKNKNSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFMDLEGGKQGNFKNLREFVFNKIDGYFKIYKSKHTPIN
LVRLDLPQGSALPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRITLLKYNEN
GTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFVTEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWN
RRKRISNCVADYSVLNYSASFSTFKCYGVSPITKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNKY
LPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNVEGFNCYFPLQ
SYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ
FGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFSGGVSIVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWR
VYSTGSNVFQTRAGCLIGAHEVNNSYEDIPIGAGICASYQTQTNSPRASSVASQSIAYTMSLGAENSV
AYSNNSIAIPTNFITISVTTEILPVSMTKTSVDCITMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKN
TQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARD
LICAQKFNGLTVLPPLITDEMIQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFGIGVVTQNVLYE
NQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAIVSVLNDILSRIDKVE
AEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAP
HGVVFLHVTYVPAQEKNTTAPAICHGDKAHFREGVVFVSNGTWFWVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNC
DVVGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESL
IDLQELGKYEQ.

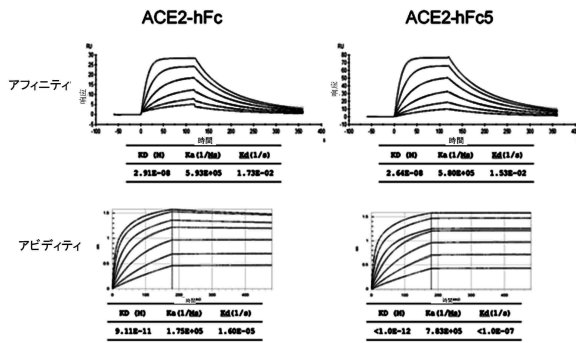
20

30

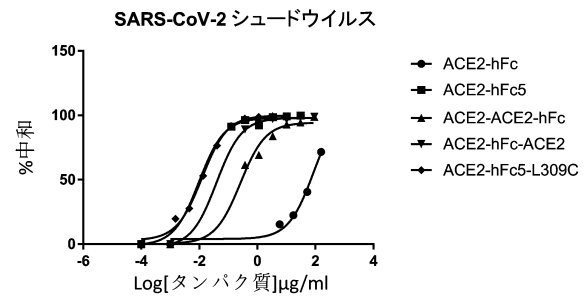
40

50

【図 9】

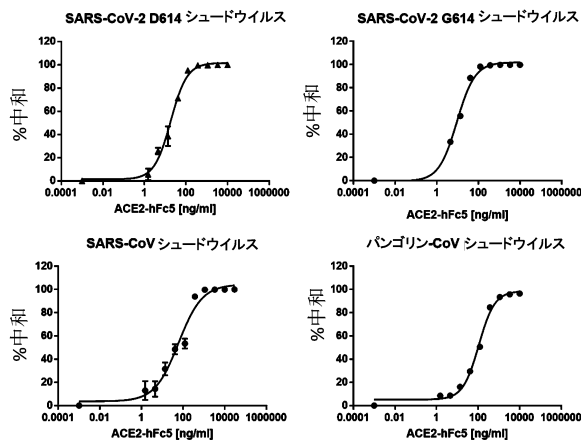


【図 10】

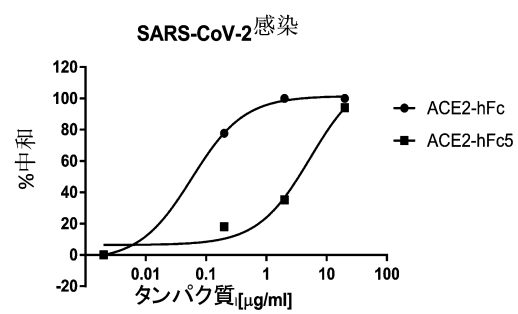


10

【図 11】

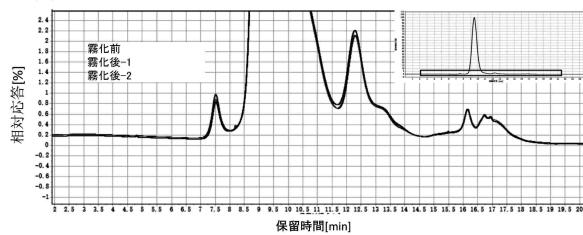


【図 12】

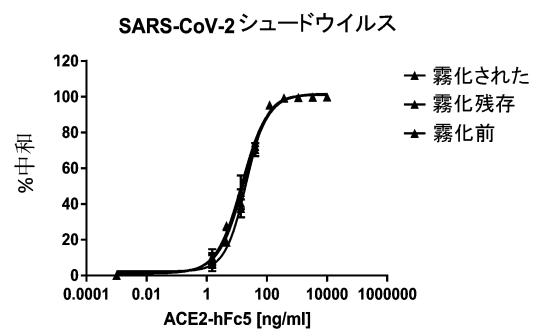


20

【図 13】



【図 14】

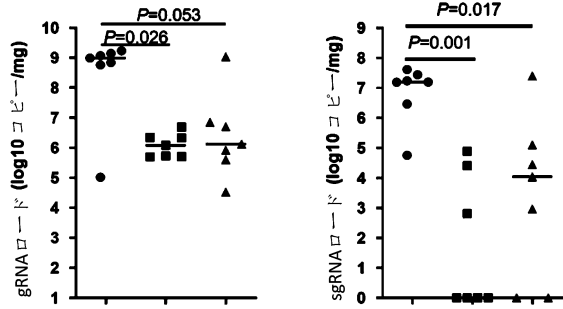


30

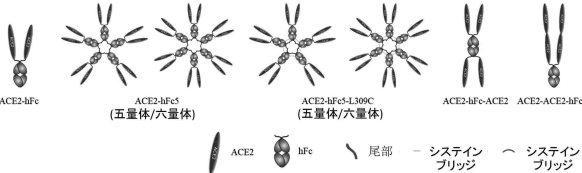
40

50

【図 15】



【図 16】



10

【配列表】

0007554837000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	Z
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	

Z G C L i f e S c i e n c e P a r k , C h a n g p i n g D i s t r i c t , B e i j i n g 1 0 2 2 0 6 C h i n a

(74)代理人

110000394

弁理士法人岡田国際特許事務所

(72)発明者

リー, ウェンウィ

中国, ベイジン 1 0 2 2 0 0 , チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフ サイエンス パーク, 2 0 サイエンス パーク ロード, ビルディング7 ルーム1 0 2

(72)発明者

チー, ヨンハ

中国, ベイジン 1 0 2 2 0 0 , チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフ サイエンス パーク, 2 0 サイエンス パーク ロード, ビルディング7 ルーム1 0 2

(72)発明者

チェン, ジャンハ

中国, ベイジン 1 0 2 2 0 0 , チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフ サイエンス パーク, 2 0 サイエンス パーク ロード, ビルディング7 ルーム1 0 2

(72)発明者

シー, ジェンホワ

中国, ベイジン 1 0 2 2 0 6 , チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフ サイエンス パーク, パークロード, ナンバー7

(72)発明者

リウ, ジュアン

中国, ベイジン 1 0 2 2 0 0 , チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフ サイエンス パーク, 2 0 サイエンス パーク ロード, ビルディング7 ルーム1 0 2

(72)発明者

マオ, フェンフェン

中国, ベイジン 1 0 2 2 0 0 , チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフ サイエンス パーク, 2 0 サイエンス パーク ロード, ビルディング7 ルーム1 0 2

(72)発明者

リウ, シーミン

中国, ベイジン 1 0 2 2 0 6 , チャンピン ディストリクト, ジョングァンツン ライフ サイエンス パーク, パークロード, ナンバー7

審査官 團野 克也

(56)参考文献

特表2 0 0 8 - 5 4 0 6 0 0 (J P , A)

国際公開第2 0 1 1 / 0 7 3 6 9 2 (W O , A 1)

特表2 0 1 5 - 5 0 1 2 9 1 (J P , A)

中国特許出願公開第1 1 2 3 7 5 1 4 9 (C N , A)

Therapeutic strategies in an outbreak scenario to treat the novel coronavirus originating in Wuhan, China, F1000Research, 9:72, 2020年02月18日

Potent neutralization of 2019 novel coronavirus by recombinant ACE2-Ig, bioRxiv, 2020年02月03日, 929976

EMBO Molecular Medicine, 2012年, 4, 1015-1028

Scientific Reports, 2011年, 1:124

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

I P C

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

D B 名

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E (S T N)

JSTPlus/JST7580/JMEDPlus(JDreamIII)
UniProt/GeneSeq