

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年3月3日(03.03.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/044573 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C07K 16/10* (2006.01)    *C12N 15/13* (2006.01)  
*A61K 39/215* (2006.01)    *C12P 21/08* (2006.01)
- (21) 国際出願番号:                    PCT/JP2021/026053
- (22) 国際出願日:                    2021年7月9日(09.07.2021)
- (25) 国際出願の言語:                    日本語
- (26) 国際公開の言語:                    日本語
- (30) 優先権データ:  
 特願 2020-143055    2020年8月26日(26.08.2020) JP  
 特願 2021-054387    2021年3月26日(26.03.2021) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人熊本大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目3番1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者: 松下 修三 (MATSUSHITA, Shuzo); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目3

9番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 郭 悠 (KAKU, Yu); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目3番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 桑田 岳夫 (KUWATA, Takeo); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目3番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 大澤 健一 (OSAWA Kenichi); 〒1620065 東京都新宿区住吉町1-1-1 O S K ビル605 大澤国際特許外国法事務所 弁護士事務所 Tokyo (JP).

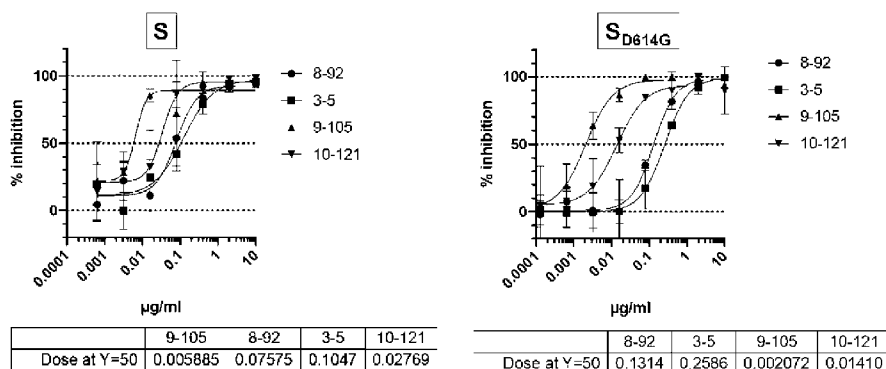
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

(54) Title: HUMAN ANTIBODY OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF AGAINST CORONAVIRUS SPIKE PROTEIN

(54) 発明の名称: コロナウイルススパイク蛋白に対するヒト抗体またはその抗原結合断片

AA

SARS-CoV-2のSpike蛋白を表面に持つpseudovirusに対する中和活性



AA Neutralization activity against pseudovirus expressing the spike protein from SARS-CoV-2 on the surface

(57) Abstract: One purpose of the present invention is to provide an antibody against a coronavirus (SARS-CoV-2). Another purpose of the present invention is to provide a pharmaceutical composition against the coronavirus using said antibody. The present invention provides: an antibody or an antigen-binding fragment thereof that binds to the receptor binding domain present in the spike protein of a coronavirus and that is capable of neutralizing the coronavirus; and a pharmaceutical composition containing said antibody or an antigen-binding fragment thereof, for prevention or treatment of coronavirus infection.



WO 2022/044573 A1

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, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

---

(57) 要約：本発明の目的は、コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対する抗体を提供することである。本発明の目的はまた、該抗体を用いたコロナウイルス感染に対する医薬組成物を提供することである。本発明により、コロナウイルスのスパイク蛋白に存在するリセプター結合ドメインに結合しかつコロナウイルスを中和する能力がある抗体またはその抗原結合断片、および、概抗体またはその抗原結合断片を含むコロナウイルス感染の予防または治療のための医薬組成物が提供される。

## 明 細 書

発明の名称：

コロナウイルススパイク蛋白に対するヒト抗体またはその抗原結合断片  
技術分野

[0001] 本発明は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の原因ウイルス（SARS-CoV-2）に対する抗体またはその抗原結合断片に関する。本発明はまた、該抗体を用いたコロナウイルスの治療および予防薬に関する。

### 背景技術

[0002] 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、2020年8月9日時点で、わが国で累計48,907人が感染、そのうち1,048人が死亡している。感染者数としては、14,953人と報告されている。世界においても1,946万人が感染し、72万人が死亡している。COVID-19は世界経済にも大きな影響を及ぼし、ウイズコロナ時代の出口が見えないことが大きな社会問題になっている。このように、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対するワクチンや治療法の開発は、世界規模の最重要課題である。

[0003] これまで、様々な抗ウイルス薬の研究が行われ、エボラ出血熱に対して開発されたレムデシビルがCOVID-19の治療薬として緊急に認可されたが、有効性の確立した治療法はない。一方、SARS-CoV-2に感染し、いったん重症化後に回復した症例の中には、血漿中に強力な中和抗体を持つ症例があり、このような回復期血漿を用いた治療法（回復期血漿療法）が模索されている（非特許文献1：Shen C. et al., JAMA, 2020;323(16):1582-1589、非特許文献2：Duan K. et al., Proc Natl Acad Sci, 2020;117(17):9490-9496）。そこで示されるように、中和抗体を含む血漿を投与された症例の多くが、数日のうちにウイルス量の減少、解熱、酸素濃度の改善、などの臨床的回復を示し、中和抗体の有用性が示唆されている。しかしながら、高

い中和抗体を含む回復期症例の血漿は限られ、多くの症例への応用は困難である。

[0004] 一方、COVID-19回復期症例のB細胞から中和抗体遺伝子を単離し、組換え抗体として大量に生産することにより、中和抗体を用いた重症化抑制の治療法が提案されている。このような取り組みは、中国、米国、欧州で行われ、複数の論文が発表されている。論文によって中和実験系が異なり、単純に比較することは困難であるが、高い中和活性をもつ抗体が複数報告されている。たとえば、抗体P2C-1F11、P2B-2F6やP2C-1A3（非特許文献3：Ju, B. et al. Nature, 584, 115-119(2020)）、抗体CB6（非特許文献4：Shi, R. et al. Nature, 584, 120-124(2020)）、および、抗体C121、C135やC144（非特許文献5：Robbiani, D. F. et al. Nature, 584, 437-442(2020)）が報告されている。

[0005] また、SARS-CoV-2のスパイク蛋白は、標的細胞のアンジオテンシン変換酵素2（ACE2）に結合したのち、細胞表面のプロテアーゼTMPRSS2の作用によってウイルス膜と細胞膜の融合が惹起され感染が成立することが報告されている（非特許文献6：Kai K. et al. Science, 2020;367:1412-1413）。さらに、スパイク蛋白の構造の研究から、そのレセプター結合領域（Receptor binding domain：RBD）が、ACE2に結合する領域であることが解明されており、スパイク蛋白の中でもRBDが中和抗体の最も重要な標的と考えられている（非特許文献7：Wrapp et al. Science, 2020;367:1260-1263）。

[0006] また、ヒト重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）のスパイク蛋白に結合し、ウイルスを中和する抗体が報告されている（例えば、特許文献1：特表2008-529504号公報、特許文献2：特表2009-537143号公報）。

[0007] 2020年に発生したCOVID-19パンデミックは、2020年の終わり頃から、SARS-CoV-2変異株の感染拡大という新たな局面に入っている。わが国でも、英国や南アフリカ共和国において報告された変異株

が確認されている（厚生労働省発表；令和3年3月03日）。これらの変異株は、現在用いられているワクチンが誘導する抗体や米国で緊急承認された中和抗体に対する抵抗性が報告されている（非特許文献8：Wang P. et al., bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.428137>）。変異株の代表的なものとして、英国の新規感染例の多くを占める変異株 B. 1. 1. 7、デンマークの変異株 m i n k c l u s t e r 5、南アフリカ由来の変異株 B. 1. 3 5 1、ブラジル由来の変異株 P. 1 株、インド由来の変異株 B. 1. 1 6 7. 1 や B. 1. 1 6 7. 2 などがよく知られている。これらの変異株の配列は公開されており、スパイク蛋白の変異を持っている。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0008] 特許文献1：特表2008-529504号公報

特許文献2：特表2009-537143号公報

### 非特許文献

[0009] 非特許文献1：Shen C. et al., JAMA, 2020;323(16):1582-1589

非特許文献2：Duan K. et al., Proc Natl Acad Sci, 2020;117(17):9490-9496

非特許文献3：Ju, B. et al. Nature, 584, 115-119(2020)

非特許文献4：Shi, R. et al. Nature, 584, 120-124(2020)

非特許文献5：Robbiani, D. F. et al. Nature, 584, 437-442(2020)

非特許文献6：Kai K. et al. Science, 2020;367:1412-1413

非特許文献7：Wrapp et al. Science, 2020;367:1260-1263

非特許文献8：Wang P. et al., bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.25.428137>

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の目的は、コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対する抗体またはその抗原結合断片を提供することである。本発明はまた、該抗体またはその抗原結合断片を用いたコロナウイルス感染に対する医薬組成物を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0011] 本発明は、COVID-19に感染し回復した患者ドナーから採取されたIgGメモリーB細胞からのヒトモノクローナル抗体（mAb）の単離に基づく。本発明者らは、COVID-19回復期症例のB細胞からSARS-CoV-2を中和する抗体を産生する抗体遺伝子を単離し、それを用いて組み換え抗体を作製することにより、中和抗体を用いた重症化抑制の治療法を開発することを目的として、鋭意研究を行った。その結果、コロナウイルス（SARS-CoV-2）に感染し、重症化後に回復した症例から、強力な中和活性を持つ抗体として4つの抗体：CTMA9-105、CSSA10-121、CSSA8-92、CSSA3-5を分離し、その遺伝子配列を同定し、本発明を完成した。本明細書に記載されるように、本発明者らにより、組み換え技術を用いて、改善された特性を有する抗体が作製された。本発明の抗体またはその抗原結合断片は、SARS-CoV-2スパイク蛋白のRBDに結合し、SARS-CoV-2ウイルスを中和するという特徴を有する。本発明の抗体またはその抗原結合断片は、優れたSARS-CoV-2ウイルスの中和活性を有し、従来の抗体よりも有用であり得る。本発明は以下の態様を含む。

[0012] [1] コロナウイルス（SARS-CoV-2）のスパイク蛋白に存在するリセプター結合ドメイン（Receptor Binding Domain（RBD））に結合し、かつSARS-CoV-2ウイルスを中和する能力がある、抗体またはその抗原結合断片であって、以下の重鎖CDR1～3および軽鎖CDR1～3：  
（1）重鎖CDR1であって、配列番号9（GITVSSNY）の重鎖CDR1、配列番号12（GLTVSRNY）の重鎖CDR1、配列番号14（EITVSRNY）の重鎖CDR1、配列番号17（GFTVSSNY）の

重鎖CDR1、配列番号9、12、14および17からなる群より選ばれる重鎖CDR1のいずれかにおいて1つまたは2つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる重鎖CDR1、ならびに、配列番号9、12、14および17からなる群より選ばれる重鎖CDR1のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ重鎖CDR1、からなる群より選ばれる重鎖CDR1、

(2) 重鎖CDR2であって、配列番号10 (IYSGGST) の重鎖CDR2、配列番号15 (IYSGGSR) の重鎖CDR2、配列番号10および15からなる群より選ばれる重鎖CDR2のいずれかにおいて1つまたは2つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる重鎖CDR2、ならびに、配列番号10および15からなる群より選ばれる重鎖CDR2のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ重鎖CDR2、からなる群より選ばれる重鎖CDR2、

(3) 重鎖CDR3であって、配列番号11 (ARDLEEAGGMDV) の重鎖CDR3、配列番号13 (ARPIVGARAGMDV) の重鎖CDR3、配列番号16 (ARDKNEGAMDV) の重鎖CDR3、配列番号18 (ARSYGDYFIDY) の重鎖CDR3、配列番号11、13、16および18からなる群より選ばれる重鎖CDR3のいずれかにおいて1つ、2つまたは3つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる重鎖CDR3、ならびに、配列番号11、13、16および18からなる群より選ばれる重鎖CDR3のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ重鎖CDR3、からなる群より選ばれる重鎖CDR3、

(4) 軽鎖CDR1であって、配列番号19 (QSVPSIY) の軽鎖CDR1、配列番号22 (QDISNY) の軽鎖CDR1、配列番号25 (QGISSY) の軽鎖CDR1、配列番号28 (QSVSSY) の軽鎖CDR1、配列番号19、22、25および28からなる群より選ばれる軽鎖CDR1のいずれかにおいて1つまたは2つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる軽鎖CDR1、ならびに、配列番号19、22、25および28からなる群より選ばれる軽鎖CDR1のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ軽鎖CDR1、

一性を持つ軽鎖CDR1、からなる群より選ばれる軽鎖CDR1、

(5) 軽鎖CDR2であって、配列番号20 (GAS) の軽鎖CDR2、配列番号23 (DAS) の軽鎖CDR2、配列番号26 (AAS) の軽鎖CDR2、ならびに、配列番号20、23および26からなる群より選ばれる軽鎖CDR2のいずれかにおいて1つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる軽鎖CDR2、からなる群より選ばれる軽鎖CDR2、および

(6) 軽鎖CDR3であって、配列番号21 (QQYGSSPGT) の軽鎖CDR3、配列番号24 (QQYDNL PVT) の軽鎖CDR3、配列番号27 (QHLNSYSYT) の軽鎖CDR3、配列番号29 (QQYGSSPWWT) の軽鎖CDR3、配列番号21、24、27および29からなる群より選ばれる軽鎖CDR3のいずれかにおいて1つまたは2つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる軽鎖CDR3、ならびに、配列番号21、24、27および29からなる群より選ばれる軽鎖CDR3のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ軽鎖CDR3、からなる群より選ばれる軽鎖CDR3、

を含む、抗体またはその抗原結合断片。

[0013] [2] 前記重鎖CDR1が配列番号9、12、14および17からなる群より選ばれる重鎖CDR1のいずれかであり、前記重鎖CDR2が配列番号10および15からなる群より選ばれる重鎖CDR2のいずれかであり、前記重鎖CDR3が配列番号11、13、16および18からなる群より選ばれる重鎖CDR3のいずれかであり、前記軽鎖CDR1が配列番号19、22、25および28からなる群より選ばれる軽鎖CDR1のいずれかであり、前記軽鎖CDR2が配列番号20、23および26からなる群より選ばれる軽鎖CDR2のいずれかであり、前記軽鎖CDR3が配列番号21、24、27および29からなる群より選ばれる軽鎖CDR3のいずれかである、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[3] 前記重鎖CDR1が配列番号9の重鎖CDR1であり、前記重鎖CDR2が配列番号10の重鎖CDR2であり、前記重鎖CDR3が配列番号1

1の重鎖CDR3であり、前記軽鎖CDR1が配列番号19の軽鎖CDR1であり、前記軽鎖CDR2が配列番号20の軽鎖CDR2であり、前記軽鎖CDR3が配列番号21の軽鎖CDR3である、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[4] 前記重鎖CDR1が配列番号12の重鎖CDR1であり、前記重鎖CDR2が配列番号10の重鎖CDR2であり、前記重鎖CDR3が配列番号13の重鎖CDR3であり、前記軽鎖CDR1が配列番号22の軽鎖CDR1であり、前記軽鎖CDR2が配列番号23の軽鎖CDR2であり、前記軽鎖CDR3が配列番号24の軽鎖CDR3である、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[5] 前記重鎖CDR1が配列番号14の重鎖CDR1であり、前記重鎖CDR2が配列番号15の重鎖CDR2であり、前記重鎖CDR3が配列番号16の重鎖CDR3であり、前記軽鎖CDR1が配列番号25の軽鎖CDR1であり、前記軽鎖CDR2が配列番号26の軽鎖CDR2であり、前記軽鎖CDR3が配列番号27の軽鎖CDR3である、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[6] 前記重鎖CDR1が配列番号17の重鎖CDR1であり、前記重鎖CDR2が配列番号10の重鎖CDR2であり、前記重鎖CDR3が配列番号18の重鎖CDR3であり、前記軽鎖CDR1が配列番号28の軽鎖CDR1であり、前記軽鎖CDR2が配列番号20の軽鎖CDR2であり、前記軽鎖CDR3が配列番号29の軽鎖CDR3である、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[7] 配列番号1に記載の重鎖可変領域および配列番号5に記載の軽鎖可変領域を有する、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[8] 配列番号2に記載の重鎖可変領域および配列番号6に記載の軽鎖可変領域を有する、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[9] 配列番号3に記載の重鎖可変領域および配列番号7に記載の軽鎖可変領域を有する、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[10] 配列番号4に記載の重鎖可変領域および配列番号8に記載の軽鎖可変領域を有する、上記[1]に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[11] シュードウイルスを用いた中和アッセイにおいて、SARS-CoV-2ウイルスの中和における抗体活性が、約0.001 $\mu$ g/mL~約1 $\mu$ g/mL（好ましくは、約0.002 $\mu$ g/mL~約0.5 $\mu$ g/mL、より好ましくは約0.002 $\mu$ g/mL~約0.1 $\mu$ g/mL）の範囲の50%阻害濃度（IC<sub>50</sub> $\mu$ g/mL）として表される高い中和能力を有する、上記[1]~[10]のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片。

[12] B.1.1.7変異株、mink cluster 5変異株、B.1.351変異株、P.1変異株、P.3変異株、B.1.617変異株（B.1.617.1変異株やB.1.617.2変異株を含む）、R.1変異株、およびB.1.427/B.1.429変異株からなる群より選ばれるSARS-CoV-2変異株の少なくとも一つに対し中和活性を示す、上記[1]~[10]のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片。

[13] K417T/N変異、E484K変異、N501Y変異、およびL452R変異からなる群より選ばれる一つ以上の変異を有するSARS-CoV-2変異株に対し中和活性を示す、上記[1]~[10]のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片。

[14] 免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、CDR-移植抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、単ドメイン抗体、ナノボディ抗体、ダイアボディ抗体、二重特異性抗体（bispecific antibody）、および多重特異性抗体（multi-specific antibody）からなる群から選択される、上記[1]~[10]のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片。

[0014] [15] 上記[1]~[14]のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸。

[16] 上記[15]に記載の核酸を含むベクター。

[17] 上記[15]に記載の核酸または上記[16]に記載のベクターを

含む宿主細胞。

[18] 上記 [1] ~ [14] のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片を製造するための方法であって、上記 [17] に記載の宿主細胞を、前記抗体またはその抗原結合断片の発現に適した条件下で培養する工程を含む、方法。

[19] 上記 [1] ~ [14] のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片、および薬理的に許容できる担体を含む医薬組成物。

[20] 上記 [1] ~ [14] のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片を含む、被験体におけるコロナウイルス感染（好ましくは、SARS-CoV-2ウイルス感染）の予防または治療のための医薬組成物。

[21] 被験体におけるコロナウイルス感染（好ましくは、SARS-CoV-2ウイルス感染）の予防または治療のための医薬組成物の製造における、上記 [1] ~ [14] のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片の使用。

[22] 他の抗コロナウイルス薬と組み合わせて投与されることを特徴とする、上記 [19] または [20] に記載の医薬組成物。

[23] 前記抗コロナウイルス薬が、レムデシビル、ファビピラビル、デキサメタゾン、シクレニソニド、ナファモスタット、カモスタット、イベルメクチン、バミラニビマブ、エテセビマブ、カシリビマブ、イムデビマブ、およびHIVプロテアーゼ阻害剤（例えば、ロピナビル、リトナビルまたはそれらの合剤、ネルフィナビル）から選ばれる少なくとも一つの抗コロナウイルス薬である、上記 [22] に記載の医薬組成物。

## 発明の効果

[0015] 本発明により、新規なSARS-CoV-2ウイルスに対する中和抗体が提供された。

## 図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、単離された4つの抗体（CTMA9-105HC、CSSA110-121HC、CSSA8-92HC、CSSA3-5HC）の重鎖可

変領域のアミノ酸配列、およびそれぞれの重鎖可変領域におけるフレーム領域およびCDR 1～3の領域を示したものである。

[図2]図2は、単離された4つの抗体（CTMA9-105HC、CSSA110-121HC、CSSA8-92HC、CSSA3-5HC）の軽鎖可変領域のアミノ酸配列、およびそれぞれの軽鎖可変領域におけるフレーム領域およびCDR 1～3の領域を示したものである。

[図3]図3は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白とEGFPを共発現するプラスミドを293T細胞にトランスフェクトして、細胞表面にスパイク蛋白を発現させる系を模式的に示したものである。

[図4]図4は、COVID-19に感染し回復した患者の血漿を用いたフローサイトメトリーによる解析結果を示したものである。上図が患者血漿を用いた結果、下図が感染していない健常人のIgGを用いた結果である。矢印がスパイク蛋白結合活性を示している。

[図5]図5は、AlphaScreenシステムを利用し、実施例2によりクローニングされた組換えIgG（rIgG）のSARS-CoV-2のスパイク蛋白リセプター結合ドメイン（RBD）への結合評価を行った結果の一部を示している。データは、本発明の4抗体を含む7抗体にRBD結合活性を認めている。10-121は培養上清、p10-121は精製したIgG（10ng）を示す。PGNはネガティブコントロールである。「CTMA」との表記が付されていない検体はCSSA由来である。

[図6]図6は、SARS-CoV-2中和活性を測定するためのシュードウイルス中和試験の概略を示した図である。

[図7]図7は、スクリーニングされた4つの中和抗体のSARS-CoV-2のスパイク蛋白への結合活性を測定した結果を示している。

[図8]図8は、スクリーニングされた4つの中和抗体を用いて、SARS-CoV-2のスパイク蛋白を細胞表面に発現したシュードウイルスに対する中和活性を測定した結果を示している。

[図9]図9は、細胞融合活性測定の概略を示している。エフェクター細胞の表

面に発現したSARS-CoV-2のスパイク蛋白と、標的細胞の表面に発現したACE2が結合することにより細胞融合が起こる。細胞融合が起こると各細胞のDSPが結合して活性を示す。

[図10]図10は、図9に記載のエフェクター細胞と2種類の標的細胞を用いてSARS-CoV-2のスパイク蛋白を介した細胞融合の阻害活性を測定し結果である。

[図11]図11は、スパイク蛋白に変異を有しているSARS-CoV-2変異株であるB. 1. 1. 7変異株、mink cluster 5変異株、B. 1. 351変異株、およびP. 1変異株のアミノ酸変異を示している。

[図12]図12は、中和抗体を用いて、SARS-CoV-2変異株（B. 1. 1. 7株、B. 1. 351株、P. 1株、Mink cluster 5株）のスパイクをもったシュードウイルスを細胞に感染させた場合の中和活性を測定した結果を示している。

[図13]図13は、SARS-CoV-2野生株とSARS-CoV-2変異株に対する中和活性を比較した結果である。中和活性は、 $IC_{50}$  [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] で示している。括弧内は、野生株に対する中和活性と比較した場合の倍率変化を示している。

[図14]図14は、中和抗体9-105と10-121を用いて、SARS-CoV-2のインド変異株（B. 1. 617. 2株）に対する中和活性を測定した結果を示している。

[図15]図15は、中和抗体9-105を用いて、SARS-CoV-2変異株（B. 1. 1. 7株、B. 1. 351株、P. 1株、B. 1. 617. 1株およびB. 1. 617. 2株）に対する中和活性を測定した結果を示している。

[図16]図16は、中和抗体10-121を用いて、SARS-CoV-2変異株（B. 1. 1. 7株、B. 1. 351株、P. 1株、B. 1. 617. 1株およびB. 1. 617. 2株）に対する中和活性を測定した結果を示している。

## 発明を実施するための形態

- [0017] 以下、本発明を、さらに詳細に、本発明の実施において使用することができる好ましい方法および材料とともに説明するが、本発明は以下に記載の態様に限定されるものではない。なお、文中で特に断らない限り、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味をもつ。また、本明細書に記載されたものと同等または同様の任意の材料および方法は、本発明の実施において同様に使用することができる。また、本発明に関連して本明細書中で引用されるすべての刊行物および特許は、例えば、本発明で使用できる方法や材料その他を示すものとして、本明細書中に引用されそして本明細書の一部を構成するものである。
- [0018] 本明細書において、数値範囲を示す「A～B」の記載は、端点であるAおよびBを含む数値範囲を意味する。また、「AないしB」についても同様である。また本明細書において、「約」とは、±10%を許容する意味で用いる。本明細書において、「1つまたはそれ以上の」とは、明確にその意味が示されている場合あるいは前後の文脈よりその意味が明らかである場合を除き、「1つの、2つの、3つの、4つのまたはそれ以上の」を意味する。
- [0019] 本明細書においては、任意のアミノ酸残基を示すためのコード「X a a」または「X」を含む、3文字コードまたは1文字コードが使用される。
- [0020] 「新型コロナウイルス」とも呼ばれる、「SARS-CoV-2」は、2020年に中国武漢において最初に単離され、重篤な急性呼吸器系疾患の大流行の原因として同定された、新たに出現したコロナウイルスを指す。それは、ウイルスのスパイク蛋白を介してヒト宿主細胞受容体アンジオテンシン変換酵素2（ACE2）に結合する。SARS-CoV-2スパイク蛋白は、武漢型（武漢型S）やヨーロッパ型（ヨーロッパ型S<sub>D614G</sub>）などいくつかの亜種が報告されている。本明細書において、SARS-CoV-2のスパイク蛋白との表現を用いる場合は、明示されていない限りあるいは前後の文脈より明らかでない限り、武漢型（武漢型S）およびヨーロッパ型（ヨーロッ

パ型S<sub>D614G</sub>)に限らず、いずれの型のスパイク蛋白を含む意味で用いられる。

[0021] 「SARS-CoV-2のスパイク蛋白」、「スパイク蛋白」または「SARS-CoV-2(S)」は、SARS-CoV-2コロナウイルスのスパイク蛋白を意味する。SARS-CoV-2のスパイク蛋白は3量体を形成し、SARS-CoV-2のウイルス粒子の表面から突き出たスパイク(ペプロマー)として存在する1273個のアミノ酸のタイプI膜糖タンパク質である。SARS-CoV-2のスパイク蛋白は、宿主受容体結合および膜融合の機能を有し、S1サブユニットに存在する約215アミノ酸長の受容体結合ドメイン(RBD)を介して、ACE2に結合する。全長SARS-CoV-2スパイク蛋白のアミノ酸配列(配列番号30)は、受託番号YP\_009724390としてGeneBankに登録されている。本明細書において、SARS-CoV-2のスパイク蛋白は、組換えSARS-CoV-2スパイク蛋白またはその断片を含む。

[0022] 「ACE2」は、アンジオテンシン変換酵素2であり、SARS-CoV-2が結合する受容体である。ACE2は、細胞表面上に存在する805個のアミノ酸のI型膜貫通型糖タンパク質であり、アンジオテンシンIIをアンジオテンシン1-7ポリペプチドに分離する。分離されたポリペプチドは、心臓の保護、血管拡張などの作用をもつ。本明細書において用いられるACE2は、特に断りにない限り、ヒトACE2を意味する。ACE2は、SARS-CoV-2ウイルスの機能受容体として作用する。ウイルスは自身のRBDを介してACE2と結合する。ACE2とウイルスの結合および膜融合を介した細胞内侵入には、宿主細胞膜上に存在するセリン膜貫通プロテアーゼであるTMPRSS2が必要であると報告されている。

[0023] 以下に、本発明の態様を記載するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

[0024] 本発明のひとつの態様は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合する抗体またはその抗原結合断片(フラグメント)であり、SARS-CoV-2スパイク蛋白に結合してウイルスを中和するのに有用である。以下、本

明細書において、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合する抗体およびその抗原結合断片をまとめて、「SARS-CoV-2に対する抗体等」、「SARS-CoV-2のスパイク蛋白に対する抗体等」、「抗SARS-CoV-2(S)抗体等」、または単に本発明の「抗体等」もしくは「抗体」と表現するが、文中で明確に抗体またはその抗原結合断片のいずれかを示している場合、あるいは、前後の文脈より、それらのいずれかであるかが明確に理解できる場合は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合する抗体またはSARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合する断片のいずれかを意味していると理解される。

[0025] 本明細書において「抗体」という用語は、完全抗体およびその断片を含む意味で用いられるが、文中で明確に完全抗体または抗体の断片のいずれかを示している場合、あるいは、前後の文脈より、それらのいずれかであるかが明確に理解できる場合は、抗体または抗体の断片のいずれかを意味していると理解される。抗原結合断片（抗原に結合する抗体の断片）はインタクトな抗体と抗原との特異的結合を競合し、抗体と同様の効果を示しうることは当業者に明らかである。Fundamental Immunology, 第7章 (Paul, W. 編, 第2版, Raven Press, N.Y. (1989)) を参照。

[0026] ある実施形態において、本発明の抗体は、ウイルスのその宿主細胞受容体であるアンジオテンシン変換酵素2 (ACE2) への結合を阻害し、SARSコロナウイルスの宿主細胞への侵入を防ぐのに有用である。ある実施形態において、本発明の抗体は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白を介した細胞融合を阻害することにより、抗ウイルス活性を示す。ある別の実施形態において、本発明の抗体は、対象（好ましくはヒト）におけるSARS-CoV-2ウイルスの感染の少なくとも1つの症状を予防するか、処置するか、または改善する。ある別の実施形態において、本発明の抗体は、SARS-CoV-2ウイルスに感染しているか、もしくは感染するリスクのある対象（好ましくはヒト）に予防的にまたは治療的に投与される。

[0027] 本発明の抗体は、全長（例えば、IgG1、IgG2またはIgG4）で

あり得、またはその抗原結合部位（例えば、F a b、F a b'、F ( a b' ) 2、F d、F v、ジスルフィドF v、s c F v、単ドメイン、ナノボディ、ダイアボディ）を含み、機能性を改善するようにまたは必須でないエフェクター機能を除去するように修飾され得る。またある実施形態において、本発明の抗体は二重特異性または多重特異性であり得る。

[0028] 一つの態様において、本発明は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に特異的に結合する、単離された組換えモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある実施形態において、本発明の抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。本発明の抗体等は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白の受容体結合ドメイン（RBD）内のエピトープに結合する。ある実施形態において、本発明の抗体等は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白（受託番号YP\_009724390としてGenBankに登録されている）（配列番号30）のアミノ酸322～536（実施例で用いた、九州大学 橋口隆生先生より供与されたビオチン化RBDの配列に相当する）から選択される1または複数のアミノ酸に結合する。また、SARS-CoV-2ウイルスの全ゲノム情報は、Genome Reference Sequence: NC\_045512としてGeneBankに登録されている。ある実施形態において、本発明の抗体等は、武漢型SARS-CoV-2のスパイク蛋白（武漢型S）に結合する。別の実施形態において、本発明の抗体等は、ヨーロッパ型SARS-CoV-2のスパイク蛋白（ヨーロッパ型S<sub>D614G</sub>）に結合する。さらに別の実施形態において、本発明の抗体等は、様々な変異株のSARS-CoV-2のスパイクタンパク質に結合する。代表的な変異株としては、これに限定されないが、例えば、イギリス由来の変異株B. 1. 1. 7系統、南アフリカ由来の変異株B. 1. 351系統、日本でブラジルからの渡航者から発見された変異株P. 1系統、フィリピン由来の変異株P. 3系統、インド由来の変異株B. 1. 617系統（例えば、B. 1. 617. 1変異株やB. 1. 617. 2変異株）、E484K変異を有する変異株R. 1系統、および米国由来のB. 1. 427/B. 1. 429系統を挙げることができる。

変異株としてはまた、E484K変異を有するB.1.1.316系統、日本国内で主流のB.1.1.214系統およびB.1.1.214系統、並びにそれらにさらに変異（例えば、E484K変異）が生じた系統を挙げることができる。変異株としてはさらには、RBDの2～3箇所の特徴的な変異を有する株を挙げることができ、これに限定されないが、特徴的な変異としては、E484K、N501Y、K417T/N、およびL452R変異を挙げることができる。また、発生した地域や国を基に報告されている変異株として、インド型（デルタ株）、イギリス型（アルファ株）、南アフリカ型（ベータ株）、ブラジル型（ガンマ株）、カリフォルニア型（イプシロン株）、ブラジルで検出（ゼータ株）、イギリスで検出（イータ株）、フィリピンで検出（シータ株）、ニューヨークで検出（イオタ株）、インドで検出（カッパ株）、ペルー、アルゼンチンなど南米検出（ラムダ株）などがあるが、これらの変異株に対しても本発明の抗体等を用いることができる。

[0029] 本発明の代表的な抗SARS-CoV-2抗体としては、例えば、配列番号1、2、3または4に記載のアミノ酸配列を重鎖可変領域に有する抗体を挙げることができる。本発明の代表的な抗SARS-CoV-2抗体としては、例えば、配列番号5、6、7または8に記載のアミノ酸配列を軽鎖可変領域に有する抗体を挙げることができる。本発明のより代表的な抗SARS-CoV-2抗体としては、例えば、重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列のセットとして、配列番号1と5、配列番号2と6、配列番号3と7、または配列番号4と8の組合せを有する抗体を挙げることができる。

[0030] 本発明の代表的な4つの抗SARS-CoV-2抗体の重鎖可変領域（HCVR）、軽鎖可変領域（LCVR）、重鎖相補性決定領域（HCDR1、HCDR2、およびHCDR3）、並びに軽鎖相補性決定領域（LCDR1、LCDR2、およびLCDR3）のアミノ酸配列を以下の表に記載する。

[0031]

[表1]

抗体名称	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CTMA9-105 HC	配列番号1	配列番号9	配列番号10	配列番号11	配列番号5	配列番号19	配列番号20	配列番号21
CSSA10-121 HC	配列番号2	配列番号12	配列番号10	配列番号13	配列番号6	配列番号22	配列番号23	配列番号24
CSSA8-92 HC	配列番号3	配列番号14	配列番号15	配列番号16	配列番号7	配列番号25	配列番号26	配列番号27
CSSA3-5 HC	配列番号4	配列番号17	配列番号10	配列番号18	配列番号8	配列番号28	配列番号20	配列番号29

[0032] 本発明は、表1に挙げられるHCVRアミノ酸配列のいずれか、またはそれに対して、少なくとも70%、75%または80%の実質的同一性、好ましくは少なくとも90%、92%または95%の実質的同一性、およびより好ましくは少なくとも98%または99%の実質的同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含むHCVRを含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。

[0033] 本発明はまた、表1に挙げられるLCVRアミノ酸配列のいずれか、またはそれに対して、少なくとも70%、75%または80%の実質的同一性、好ましくは少なくとも90%、92%または95%の実質的同一性、およびより好ましくは少なくとも98%または99%の実質的同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含むLCVRを含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。

[0034] 本発明はまた、表1に挙げられるHCVRアミノ酸配列のいずれか、およびそれと対形成される表1に挙げられるLCVRアミノ酸配列のいずれかを含む、HCVRとLCVRアミノ酸配列対(HCVR/LCVR)を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。

[0035] 本発明はまた、表1に挙げられる4つのHCDR1アミノ酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%の実質的同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1(HCDR1)を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。

[0036] 本発明はまた、表1に挙げられる2つのHCDR2アミノ酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%の実質的同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2(HCDR2)を含む抗体また

はその抗原結合断片を提供する。

[0037] 本発明はまた、表1に挙げられる4つのHC DR 3アミノ酸配列のいずれか、またはそれと少なくとも90%の実質的同一性、好ましくは少なくとも95%の実質的同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CD R 3 (HC DR 3) を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。

[0038] 本発明はまた、表1に挙げられる4つのLC DR 1アミノ酸配列のいずれか、またはそれと少なくとも90%の実質的同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CD R 1 (LC DR 1) を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。

[0039] 本発明はまた、表1に挙げられる3つのLC DR 2アミノ酸配列のいずれかを有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CD R 2 (LC DR 2) を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。

[0040] 本発明はまた、表1に挙げられる4つのLC DR 3アミノ酸配列のいずれか、またはそれと少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の実質的同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CD R 3 (LC DR 3) を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。

[0041] 本発明はまた、表1に挙げられる4つのHC DR 3アミノ酸配列、およびそれらのいずれかと対形成される表1に挙げられる4つのLC DR 3アミノ酸配列のいずれかを含む、HC DR 3とLC DR 3アミノ酸配列対 (HC DR 3 / LC DR 3) を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある実施形態によると、本発明は、表1に挙げられる4つの代表的な抗SARS-CoV-2 (S) 抗体のいずれかに含有されるHC DR 3 / LC DR 3アミノ酸配列対を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある実施形態において、HC DR 3 / LC DR 3アミノ酸配列対は、配列番号11 / 21 (CTMA9-105HC)、13 / 24 (CSSA10-121HC)、16 / 27 (CSSA8-92HC) および18 / 29 (CSSA3-5HC) からなる群より選択される。

[0042] 本発明はまた、表1に挙げられる代表的な抗SARS-CoV-2 (S)

抗体のいずれかに含有される6つのCDRのセット（すなわち、HCDR1-HCDR2-HCDR3+LCDR1-LCDR2-LCDR3のセット）を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある種の実施形態において、HCDR1-HCDR2-HCDR3+LCDR1-LCDR2-LCDR3アミノ酸配列セットは、配列番号9-10-11+19-20-21（CTMA9-105HC）、12-10-13+22-23-24（CSSA10-121HC）、14-15-16+25-26-27（CSSA8-92HC）および17-10-18+28-20-29（CSSA3-5HC）からなる群より選択される。

[0043] 別の実施形態において、本発明は、表1に挙げられる代表的な抗SARS-CoV-2抗体のいずれかにより定義される、HCVRアミノ酸配列に含有される3つのCDRのセット（すなわち、HCDR1-HCDR2-HCDR3）のいずれかと、LCVRアミノ酸配列対に含有される3つのCDRのセット（すなわち、LCDR1-LCDR2-LCDR3のセット）のいずれかの組合せを含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある種の実施形態において、HCDR1-HCDR2-HCDR3のセットは、配列番号9-10-11、12-10-13、14-15-16および17-10-18のセットからなる群より選択され、LCDR1-LCDR2-LCDR3のセットは、配列番号19-20-21、22-23-24、25-26-27および28-20-29のセットからなる群より選択される。

[0044] HCVRおよびLCVRのアミノ酸配列内のCDRを同定する方法は、当該技術分野において周知であり、これを用いて、特定されたHCVRおよび/またはLCVRのアミノ酸配列内のCDRを同定することができる。CDRの境界を同定するために用いられる典型的な例は、例えば、IMGT定義、Kabat定義、Chothia定義、AbM定義、Martin定義、Gelfand定義、およびHonneger定義（Aho's定義）を含む。公的データベースも、抗体内のCDR配列を同定するために利用可能である。

- [0045] 本発明は、修飾されたグリコシル化パターンを有する抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等を含む。ある実施形態において、望まないグリコシル化部位を取り除くための修飾が可能であり、例えば、フコース部分を欠く抗体は抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) が増強される。またある実施形態においては、ガラクトシル化修飾は、補体依存性細胞傷害 (CDC) を改善できる。このような糖鎖上に修飾を持つ抗体等も本発明に含まれる。
- [0046] 本発明はまた、SARS-CoV-2 のスパイク蛋白への特異的結合について、表1に挙げられる配列から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRのCDRおよびLCVRのCDRを含む抗体等と競合する抗体等も提供する。
- [0047] 本発明はまた、ACE2へのSARS-CoV-2のスパイク蛋白の結合を遮断または軽減（好ましくは完全に遮断）する抗体を提供する。ACE2へのSARS-CoV-2のスパイク蛋白の結合を遮断または軽減（好ましくは完全に遮断）する抗体は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白のACE2への結合部位またはその近傍に結合し得る。ある実施形態において、本発明は、哺乳動物、好ましくはヒトのACE2へのSARS-CoV-2のスパイク蛋白の結合を遮断または軽減（好ましくは完全に遮断）する抗体を提供する。
- [0048] 本発明の別の態様において、本発明は、抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等をコードする核酸分子を提供する。例えば、本発明は、表1に記載のHCVRアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、ある実施形態においては、核酸分子は、表1に記載のHCVRアミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。本発明はまた、例えば、表1に記載のLCVRアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、ある実施形態においては、核酸分子は、表1に記載のLCVRアミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なく

とも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

[0049] 本発明はまた、表1に記載のHC DR 1アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、核酸分子は、表1に記載のHC DR 1アミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。本発明はまた、表1に記載のHC DR 2アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、核酸分子は、表1に記載のHC DR 2アミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。本発明はまた、表1に記載のHC DR 3アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、核酸分子は、表1に記載のHC DR 3アミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

[0050] 本発明はまた、表1に記載のLC DR 1アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、核酸分子は、表1に記載のLC DR 1アミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。本発明はまた、表1に記載のLC DR 2アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、核酸分子は、表1に記載のLC DR 2アミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。本発明はまた、表

1に記載のLCDR3アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、核酸分子は、表1に記載のLCDR3アミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

[0051] 本発明はまた、HCVRアミノ酸配列をコードする核酸分子を提供し、ここで、HCVRアミノ酸配列は、3つのCDRアミノ酸配列のセット（すなわち、HCDR1-HCDR2-HCDR3）を含み、HCDR1-HCDR2-HCDR3アミノ酸配列セットは、表1に記載の4つの代表的な抗SARS-CoV-2（S）抗体のいずれかにより定義される。本発明はまた、LCVRアミノ酸配列をコードする核酸分子を提供し、ここで、LCVRアミノ酸配列は、3つのCDRアミノ酸配列のセット（すなわち、LCDR1-LCDR2-LCDR3）を含み、LCDR1-LCDR2-LCDR3アミノ酸配列セットは、表1に記載の代表的な抗SARS-CoV-2（S）抗体のいずれかにより定義される。

[0052] 本発明はまた、HCVRおよびLCVRの両方をコードする核酸分子も提供し、ここで、核酸分子は、表1に記載のHCVRアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸配列、および、表1に記載のLCVRアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸配列を含む。核酸分子は、表1に記載のHCVRアミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列、および表1に記載のLCVRアミノ酸配列をコードする核酸配列のいずれか、またはそれに対して少なくとも90%、92%または95%の配列同一性、および少なくとも98%または99%の配列同一性を有する配列から選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

[0053] 本発明の抗体等は、実施例に記載されている4つの抗体から得られるSARS-CoV-2のスパイク蛋白に特異的に結合する表1に記載のHCVR

およびLCVRのアミノ酸配列をもつ抗体のいずれかと、同一のエピトープまたはそのエピトープの少なくとも一部分に結合する抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等を含む。このような抗体は、表1に記載のHCVRおよびLCVRのアミノ酸配列をもつ抗体の何れかと交差競合するSARS-CoV-2のスパイク蛋白に対する抗体およびその抗原結合断片を含む。

[0054] 当該技術分野において公知の方法を用いることにより、抗体（完全抗体およびその断片を含む）が、参照抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等と同一のエピトープに結合するか、または結合について参照抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等と競合するかどうかを容易に決定することができる。例えば、試験抗体が、本発明の参照抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等と同一のエピトープに結合するかを決定するために、参照抗体等を飽和条件下でSARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合できる条件におく。次に、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合する試験抗体の能力を評価する。試験抗体は、参照抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等との飽和結合後にSARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合することができるなら、試験抗体は、参照抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等とは異なるエピトープに結合すると結論付けられる。他方、試験抗体は、参照抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等との飽和結合後にSARS-CoV-2スパイク蛋白に結合することができないなら、試験抗体は、参照抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等により結合されるエピトープと同一のエピトープに結合すると結論づけられる。試験抗体が、結合について参照抗SARS-CoV-2 (S) 抗体と競合するかを決定するためには、互いの競合を試験することにより確認できる。第1の試験において、参照抗体等を飽和条件下でSARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合させた条件で、続いて、試験抗体のSARS-CoV-2のスパイク蛋白への結合が評価される。第2の試験において、試験抗体を飽和条件下でSARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合させた条件で、続いて、参照抗体等のSARS-CoV-2のスパイク蛋白への結合が評価される。両方の試験において、第1の試験における（飽和）抗体のみが、SARS-Co

○V-2のスパイク蛋白に結合する能力があるなら、試験抗体と参照抗体等は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白への結合について競合すると結論付けられる。当業者により理解される通り、結合について参照抗体等と競合する抗体は、参照抗体と一致するエピトープに必ずしも結合しないが、重複または隣接するエピトープに結合することにより、参照抗体等の結合を立体的に遮断する。よって、2つの抗体は、それぞれが、他方の抗原への結合を競合的に阻害（遮断）するなら、同一または重複するエピトープに結合すると結論づけられる。本発明の抗体等と競合する抗体も本発明に含まれる。

[0055] ある態様において、本発明は、抗SARS-CoV-2（S）抗体等を発現する能力を有する組換え発現ベクターを提供する。別の態様において、本発明は、抗SARS-CoV-2（S）抗体の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現する能力を有する組換え発現ベクターを提供する。例えば、本発明は、上述の核酸分子、すなわち、表1に記載のHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターを含む。発現ベクターは、本技術分野で用いられているベクターを制限なく用いることができ、そのようなベクターは当業者に公知である。かかるベクターが導入された宿主細胞を抗体または抗体フラグメントの産生が可能となる条件下で培養すること、ならびに産生される抗体および抗体フラグメントを回収すること、により本発明の抗体等を製造することができる。かかる方法もまた本発明の範囲に含まれる。

[0056] さらに別の態様において、本発明は、治療有効量の、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に特異的に結合する少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片、および薬学的に許容し得る担体を含む医薬組成物を提供する。一つの実施形態において、本発明は、抗SARS-CoV-2（S）抗体等および他の治療剤の併用、並びに抗SARS-CoV-2（S）抗体等と他の治療剤の配合剤である組成物も含む。本発明の抗体等と併用または配合される、第2の治療剤は、抗SARS-CoV-2（S）抗体と有利に併用また

は配合される任意の剤である。有利に併用または配合される典型的な剤は、SARS-CoV-2に結合するが本発明の抗体等と交差競合しないSARS-CoV-2の活性を阻害する他の剤（他の抗体またはその抗原結合断片などを含む）、および／またはSARS-CoV-2に直接的に結合しないが、それにもかかわらず、宿主細胞の感染性を含むウイルス活性を阻害する剤を含むが、これに限定されない。ある実施形態において、第2の治療剤は、本発明の抗体等に関連する何らかの副作用が生じる場合は、かかる潜在的副作用に対抗するかまたは低減するのを助ける剤である。第2の治療剤は、例えば、抗炎症薬（例えば、コルチコステロイドおよび非ステロイド系抗炎症薬）、抗感染症薬、抗ウイルス薬、抗酸化剤のような栄養補助剤、ならびに当該技術分野において公知の任意の他の薬物および治療からなる群から選択され得る。例えば、好ましくは、レムデシビル、ファビピラビル、デキサメタゾン、シクレニソニド、ナファモスタット、カモスタット、イベルメクチン、バミラニビマブ、エテセビマブ、カシリビマブ、イムデビマブ、およびHIVプロテアーゼ阻害剤（例えば、ロピナビル、リトナビルまたはそれらの合剤、ネルフィナビル）を挙げることができる。

[0057] 他の別の態様において、本発明は、本発明の抗SARS-CoV-2（S）抗体または抗体の抗原結合部位を用いた、対象（好ましくはヒト）においてSARS-CoV-2と関連する疾患を治療するまたは予防する方法を提供する。ここで、治療または予防方法は、治療または予防上有効量の本発明の抗体等を含む医薬組成物を、それを必要とする対象（好ましくはヒト）に投与することを含む。ある実施形態において、本発明は、治療または予防上有効量の本発明の抗SARS-CoV-2（S）抗体等を、それを必要とする対象（好ましくはヒト）に投与することを含む、SARS-CoV-2感染の少なくとも1つの症状を予防するか、治療するか、または改善する方法を提供する。ある実施形態において、本発明は、本発明の抗SARS-CoV-2（S）抗体等を投与することにより、対象におけるSARS感染の少なくとも1つの症状または徴候の重症度を改善するかまたは低減する方法を

提供する。少なくとも1つの症状または徴候は、肺における炎症、肺胞の損傷、発熱、呼吸器障害（鼻閉、鼻汁、咽頭痛、咳、息切れ）、頭痛、倦怠感、味覚不全、嗅覚障害、下痢、嘔吐、血液凝固の亢進、血栓症、川崎病様血管炎、腎機能障害（例えば腎炎）、臓器不全、肺炎、敗血性ショックおよび死からなる群より選択される。ある別の実施形態において、本発明の抗体等は、SARS-CoV-2に感染しているかもしくは感染するリスクのある対象に治療的にまたは予防的に投与される。リスクのある対象（患者）は、免疫不全状態の人、高齢者（年齢65歳以上）、肺の感染症、心臓疾患、呼吸器疾患、糖尿病若しくは透析患者のような基礎疾患を持つ者、医療労働者、SARS感染が確認された若しくは感染が疑われる人と密接に接触した者、またはそれらの者との接触が予測される者を含むが、これらに限定されない。本発明の抗体等は、皮内、経皮、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、または経口で投与される。1つの好ましい実施形態において、本発明の抗体等は、対象（患者）の血漿中の抗体の最大濃度を考慮し、1回の静脈内注射として投与される。ある一つの実施形態において、本発明の抗体等は、対象の体重1kg当たり、約0.1mg～約100mgの用量で投与される。ある別の実施形態において、本発明の抗体等は、対象の体重1kg当たり、約0.1mg～約100mgを含む用量で、1回または複数回、投与される。

[0058] 本発明はまた、医薬の製造における本発明の抗SARS-CoV-2（S）抗体またはその抗原結合断片の使用も含む。

[0059] 抗体とは、4つのポリペプチド鎖、ジスルフィド結合により相互結合された2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む免疫グロブリン分子（すなわち、「完全抗体分子」）、その多量体（例えば、IgAやIgM）、またはその抗原結合断片を含む意味で用いられ得る。抗体のそれぞれの重鎖は、重鎖可変領域（HCVRまたはVH）、および重鎖定常領域（ドメインCH1、CH2、およびCH3を含む）を含む。抗体のそれぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（LCVRまたはVL）、および軽鎖定常領域（CL）を含む。

H C V RおよびL C V Rは、フレームワーク領域（F R）と相補性決定領域（C D R）とにさらに細分される。それぞれのH C V RならびにL C V Rは、3つのC D Rおよび4つのF Rを含み、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4の順序にてアミノ末端からカルボキシ末端まで配置される。本発明の抗体等の実施形態において、抗体（またはその抗原結合断片）のF Rは、ヒト生殖系列配列と同一であるか、または天然若しくは人工的に修飾され得る。

[0060] 抗体は、その結合特性を失うことなく、1つ若しくはそれ以上のC D R残基の置換、または1つ若しくはそれ以上のC D Rの除外も可能である。また、1つまたは2つのC D Rを省いても結合する抗体が報告されている。抗原と接触しないC D R残基は、分子モデリングによりまたは実験的に同定できる。C D R残基の置換が行われる場合は、好ましくは抗原と接触しない残基で行われ得る。置換されるアミノ酸残基およびC D R内の置換のための位置は、種々の要因に基づき実験的に選択される。置換は、保存的または非保存的アミノ酸置換であり得る。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基により置換されるものであり、一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性（例えば、抗原への結合活性や結合特性）を実質的に変化させない。類似の化学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸の群の例は、1）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン；2）脂肪族-ヒドロキシル側鎖：セリンおよびスレオニン；3）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；4）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；5）塩基性側鎖：リジン、アルギニンおよびヒスチジン；6）酸性側鎖：アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩、並びに7）硫黄含有側鎖：システインおよびメチオニン、を含む。保存的アミノ酸置換は、同じクラス内でのアミノ酸間の置換を意味し、非保存的アミノ酸置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを意味する。好ましい保存的アミノ酸置換

基は：バリニンーロイシンーイソロイシン、フェニルアラニンーチロシン、リジンーアルギニン、アラニンーバリン、グルタミン酸塩ーアスパラギン酸塩、およびアスパラギンーグルタミン間での置換である。

[0061] 本明細書において開示されるヒト抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等は、対応する配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび／またはCDR領域における、1つまたはそれ以上のアミノ酸が置換、付加および／または欠失したものを含む。本発明は、本明細書において開示されるアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体およびその抗原結合断片を含み、1つまたはそれ以上のフレームワークおよび／またはCDR領域内の、1個またはそれ以上のアミノ酸が、抗体が由来する生殖系列配列の対応する残基に、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基に、保存的置換あるいは変異されうる（かかる配列変更は、本明細書において「保存的変異」としていう場合がある）。当業者は、本明細書において開示される重鎖および軽鎖可変領域配列から出発して、1つもしくはそれ以上の個々の変異またはその組み合わせを含む、多数の抗体および抗原結合断片を作製することができる。得られた抗体および抗原結合断片は、結合特異性の改善、結合親和性の増大、免疫原性の低減などの1つまたはそれ以上の所望の特性について容易に確認できまた選択できる。このような一般的な方法において得られる抗体および抗原結合断片も本発明に含まれる。

[0062] ある態様において、本発明の抗SARS-CoV-2 (S) 抗体等に対するアミノ酸置換は、(1) タンパク質分解に対する感受性を低下、(2) 酸化に対する感受性を低下、(3) タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変更、および(4) その他の物理化学的または機能的特性を付与または改変、のいずれか一つ以上を与えるが、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に対する特異的結合を保持するアミノ酸置換である。例えば、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換、好ましくは保存的アミノ酸置換が、好ましくは抗原と抗体間の分子間接触を形成するドメインの外側のポリペプチドの部分でなされてもよい。保存的アミノ酸置換は親配列の構造的特徴を実質的に変

化させるべきではなく；例えば、置換アミノ酸は、親配列で生じる免疫グロブリン結合ドメインを構成する逆平行 $\beta$ シートを変化させるべきではなく、または親配列を特徴付けるその他の二次構造を破壊するべきではない。当業者に公知のポリペプチドの二次および三次構造の例は、例えば、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))；Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, 編, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))；およびThornton et al., Nature 354:105 (1991)に記載されており、これらは引用することにより本明細書の一部である。

[0063] 本発明はまた、1つまたはそれ以上の保存的置換を有する、本明細書において開示されるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のいずれかの変異体を含むヒト抗SARS-CoV-2(S)抗体等も含む。例えば、本明細書において開示されるHCVR、LCVR、および／またはCDRアミノ酸配列のいずれかに関連する、10以下、8以下、6以下、4以下、または2以下の保存的アミノ酸置換を有する、抗SARS-CoV-2(S)抗体等を含む。

[0064] 本発明における抗体は、好ましくはヒト抗体である。ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体を意味する。本明細書において例示される抗体は、SARS-CoV-2に感染し回復した患者ドナーから採取されたB細胞をインビトロ活性化し、作製しているヒト抗体である。本明細書において用いられる「ヒト抗体」は、別の哺乳類種（例えば、マウス）の生殖系列に由来するCDR配列がヒトFR配列に移植されているモノクローナル抗体を含むことは意図しないが、非ヒト哺乳類において、または非ヒト哺乳類の細胞において組換え的に産生される抗体を含む意味である。本明細書の実施例において記載された抗体は、ヒト抗体である。

[0065] 本明細書において「組換え体」は、例えば、遺伝子導入発現を含む、組換えDNA技術として当該技術分野において公知の技術もしくは方法により、

作製されるか、発現されるか、単離されるか、若しくは得られる、本発明の抗体等を意味し、非ヒト哺乳類（遺伝子導入非ヒト哺乳類、例えば、遺伝子導入マウスを含む）、若しくは哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）発現系において発現されるか、または組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体またはその抗原結合断片を含む。

[0066] 本明細書において「特異的に結合する」または「に特異的に結合する」などの表現は、抗体若しくはその抗原結合断片が、生理的条件下で抗原と結合し複合体を形成することを意味する。特異的結合は、少なくとも約  $1 \times 10^{-8}$  M またはそれ以下の平衡解離定数により特徴付けられる。2つの分子が特異的に結合するかどうかを決定する方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などを挙げることができ、これらの方法を適宜用いて確認できる。表面プラズモン共鳴は、例えば、BIACORE（商標）により同定される。

[0067] 本明細書において、抗体の「抗原結合断片」、抗体の「その抗原結合断片」、抗体の「フラグメント（断片）」などの用語は、任意の天然に生じる、酵素的若しくは生化学的手法を用いて得られる、合成された、または遺伝子操作により得られた、抗原であるSARS-CoV-2のスパイク蛋白に特異的に結合して複合体を形成するポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。本明細書においてその用語は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合する能力を保持する抗体の1つまたはそれ以上のフラグメントを意味し、例えば、組換えDNA技術でまたは完全な抗体の酵素的若しくは化学的な切断で産生してもよい。本明細書においてその用語は、これに限定されないが、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、ジスルフィドFv、dAbフラグメント、相補性決定領域（CDR）を含むフラグメント、単離されたCDR断片などの単一ドメイン、限定されたFR3-CDR3-FR4ペプチド、一本鎖抗体（scFv）、ミニボディ、ナノボディ（例えば、1価のナノボディ、2価のナノボディなど）、ダイアボディ（diabody）、ドメインが欠損した抗体、キメラ抗体、CDRが移植された抗体

、二重特異性抗体、多重特異性抗体（例えば、三重特異性抗体、四重特異性抗体）、特異的な抗原結合能を有する抗体の少なくとも一部を含むポリペプチド、および小モジュラー免疫薬のような他の操作された分子を含む。

[0068] 抗体の抗原結合断片は、例えば、タンパク質消化、または抗体の可変および（場合により）定常ドメインをコードするDNAの操作および発現を伴う組換え遺伝子操作技術のような任意の適切な標準的技術を用いて、完全抗体分子またはそのアミノ酸若しくは遺伝子情報から得ることができる。DNAは、配列決定され、化学的または分子生物学的技術を用いることにより、例えば、1つもしくはそれ以上の可変および／または定常ドメインを適切な配置に配置させる、あるいは、例えば、任意のコドンを導入して、システイン残基を作製するまたはアミノ酸を修飾・付加・欠損される、等の操作により、任意の抗原結合断片を作製できる。

[0069] 抗体の抗原結合断片は、典型的には、少なくとも1つの可変ドメインを含む。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成であり、少なくとも1つのCDRを一般的に含み、それは1つまたはそれ以上のフレームワーク配列に隣接されるかあるいはインフレームに配置される。VLドメインと繋がったVHドメインを有する抗原結合断片において、VHおよびVLドメインは、任意の適切な配置で相対的に位置する。抗体の抗原結合断片は、例えば、二量体である可変領域、VH-VH、VH-VLまたはVL-VL二量体を含む。あるいは、抗体の抗原結合断片は、単量体VHまたはVLドメインを含む。

[0070] ある実施形態において、抗体の抗原結合断片は、少なくとも1つの定常ドメインに共有結合した少なくとも1つの可変ドメインを含有する。本発明の抗体の抗原結合断片内の可変および定常ドメインの典型的配置は、これに限定されないが、(i) VH-CH1；(ii) VH-CH2；(iii) VH-CH3；(iv) VH-CH1-CH2；(v) VH-CH1-CH2-CH3；(vi) VH-CH2-CH3；(vii) VH-CL；(viii) VL-CH1；(ix) VL-CH2；(x) VL-CH3；(xi)

) VL-CH1-CH2 ; (x i i) VL-CH1-CH2-CH3 ; (x i i i) VL-CH2-CH3 ; および (x i v) VL-CL を含む。上記の典型的な配置のいずれかを含む、可変および定常ドメインの任意の配置において、可変および定常ドメインは、互いに直接的に結合されるか若しくはリンカー領域により結合されるかのいずれかである。リンカー領域は、少なくとも2個（例えば、5個、10個、15個、20個、40個、60個もしくはそれ以上）のアミノ酸からなり、隣接する可変および／または定常ドメイン間を結合する。さらに、本発明の抗体の抗原結合断片は、1つの若しくはそれ以上の単量体VH若しくはVLドメインが非共有結合的に会合した、上記の可変および定常ドメイン配置のいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体（あるいは他の多量体）を含む。

[0071] 完全抗体分子と同様に、抗原結合断片は、単特異性または多特異性（例えば、二重特異性）であり得る。抗体の多特異性抗原結合断片は、典型的には、少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、それぞれの可変ドメインは、別々の抗原または同一抗原上の異なるエピトープに特異的に結合する能力を有する。本明細書における二重特異性抗体を含む、任意の多特異性抗体は、当該技術分野において利用可能な慣例的技術を用いて作製でき、本発明の目的において抗体の抗原結合断片として使用することができる。

[0072] 本発明の抗体は好ましくは単離された抗体である。本明細書において「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体が実質的に存在しない状態にある抗体を意味する。

[0073] 本明細書において、「中和抗体」、「SARS-CoV-2ウイルス活性を中和する抗体」、「SARS-CoV-2ウイルス活性を中和する能力がある抗体」などは、抗体のSARS-CoV-2のスパイク蛋白への結合が、SARS-CoV-2の少なくとも1つの生物学的活性の阻害をもたらす抗体を意味し、本発明の抗体等は、SARS-CoV-2のACE2への結合を防ぐか（軽減するか）若しくは遮断する、またはSARS-CoV-2のACE2への結合を介した細胞への感染を防ぐか（軽減するか）若しくは

遮断する（すなわち、細胞の膜融合を阻害する）、ことを含む。好ましくは、発明の抗体等は、SARS-CoV-2のACE2への結合を完全に遮断する。

[0074] 本発明の抗体等は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に免疫特異的に結合し、かつSARS-CoV-2ウイルス感染を中和する能力がある。本発明の抗体等の活性は、インビトロまたはインビボアッセイにより決定される。活性は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白、好ましくはスパイク蛋白のRBDへの結合活性に基づいて確認および測定できる。活性はまた、SARS-CoV-2ウイルスに対する中和活性により確認および測定ができる。好ましくは、活性は中和活性により測定される。SARS-CoV-2に結合し、SARS-CoV-2の活性を中和する本発明の抗体等の能力は、本明細書において記載される、結合アッセイまたは中和アッセイを含む、当業者に公知の任意の標準的方法を用いて測定される。結合および遮断活性を測定するための代表的なインビトロアッセイは、本明細書における実施例において説明されている。用語「阻害濃度50%」（「 $IC_{50}$ 」として略記）は、SARS-CoV-2ウイルスの50%中和に要求される本発明の抗体の濃度を表す。より低い $IC_{50}$ 値がより強力な中和活性をもつ。

[0075] 「 $TCID_{50}$ 」という用語は、組織培養中の細胞の50%に感染するのに必要なウイルスの量を指す。100×および200×は、 $TCID_{50}$ と比較したウイルスの濃度の100または200倍を指す。

[0076] ある実施形態において、本発明の抗体等は、シュードウイルスを用いた中和アッセイでのSARS-CoV-2ウイルスの中和において、抗体濃度が、約0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内で、50%阻害濃度（ $IC_{50}$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）として表される中和能力を有する。シュードウイルスを用いた中和アッセイにおいて使用される標的細胞の種類は特に限定されず、ウイルスの感染を検出できる限り任意の細胞を用いることが

できる。これに限定されないが、例えば、本明細書の実施例に示された人工的に作成した細胞（293F/ACE2/TMPRSS2細胞）、ヒトの肺がん細胞（肺胞上皮細胞、Calu-3）、消化管粘膜上皮細胞（Caco-2）をあげることができる。標的細胞に応じて、中和活性は差が生じ得るので、例えば、上記50%阻害濃度は、293F/ACE2/TMPRSS2細胞を用いた場合の中和能力と定義することができる。本明細書の実施例に記載の中和アッセイにおいて使用された抗体は、活性が低い抗体でも約0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で50%阻害濃度を示し、活性が高い抗体は、約0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で50%阻害濃度を示した。これは、本発明の抗体が非常に高いSARS-CoV-2ウイルスの中和活性を持つことを示している。

[0077] ある実施形態において、本発明の抗体等は、好ましくは、SARS-CoV-2ウイルスの少なくとも一つの変異株に対しても中和能力を有する。SARS-CoV-2ウイルスの変異株は、SARS-CoV-2ウイルスの配列の何れかの場所に変異が生じたものであり、特に、スパイク蛋白の配列に変異が生じたものを例示することができる。変異株としては、これに限定されないが、例えば、B. 1. 1. 7変異株、mink cluster 5変異株、B. 1. 351変異株、P. 1株変異株、P. 3変異株、B. 1. 617変異株（例えば、B. 1. 617. 1変異株やB. 1. 617. 2変異株）、R. 1変異株、およびB. 1. 427/B. 1. 429変異株をあげることができる。変異株としてはまた、スパイク蛋白に、417N/T、E484K、N501Y、L452Rからなる群より選ばれる少なくともひとつの変異をもつ変異株をあげることができ、例えば、K417Nおよび/またはE484Kの変異を有する変異株をあげることができる。本発明の抗体等は、好ましくは、シュードウイルスを用いた中和アッセイで、SARS-CoV-2ウイルスの変異株のいずれか一つに対し、約0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約0.002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～約0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内で、50%阻害濃度（I

$C_{50} \mu g / ml$ ) として表される中和能力を有する。

[0078] 本明細書において「エピトープ」とは、抗体分子の可変領域における特異的抗原結合部位と相互作用する、抗原決定因子である抗原上の部位または領域を意味する。エピトープは、構造的または機能的なものとして定義される。機能的エピトープは、一般に構造的エピトープのサブセットであり、相互作用の親和性に直接的に関与するその残基を含む。エピトープはまた立体構造でもあり得、非直線状のアミノ酸の位置関係をも含む。ある実施形態において、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、リン酸基またはスルホニル基のような分子の化学的に活性な表面基である決定因子を含み、例えば、特異的な3次元の構造的特徴および／または特異的な残基の修飾を有する。本発明の抗体等において、アミノ酸置換を行う場合は、抗体またはその抗原結合断片のエピトープへの結合活性が影響を受けないあるいは結合活性に少ない影響を与える置換が好ましい。

[0079] 本明細書において用いられる「交差競合する」とは、抗体若しくはその抗原結合断片が、抗原に結合し、別の抗体若しくはその抗原結合断片の結合を阻害するか、または遮断することを意味する。ある実施形態において、第1および第2の抗体は、同一のエピトープに結合する。あるいは、第1および第2の抗体は、異なるがオーバーラップするエピトープに結合することで、ある抗体の結合が、他の抗体の結合を、例えば立体障害を介して阻害するかまたは遮断するようになる。抗体間の交差競合は、当該技術分野において公知の方法により測定でき、例えば、表面プラズモン共鳴やバイオレイヤーインターフェロメトリーアッセイを挙げることができる。

[0080] 本明細書において抗体またはその抗原結合断片のアミノ酸配列の「実質的同一性」または「同一性」に言及している場合、それは、2つのアミノ酸配列が、例えば、デフォルトギャップウェイトを用いたプログラムGAPまたはBESTFITにより、最適に整列された場合の同一性を意味する。比較する配列における非同一なアミノ酸残基は、好ましくは保存的アミノ酸置換によって配列間において異なる。アミノ酸配列の同一性は、配列解析ソフト

ウェアを用いて測定できる。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む、様々な置換、欠損、および他の修飾に割り当てられる類似性の測定を用いて、類似の配列を一致させる。例えば、GCGソフトウェア（例えば、GCG Version 6.1）、FASTA（例えば、FASTA2やFASTA3）、BLASTPまたはTBLASTNを用いて解析される。

[0081] 核酸配列において「配列同一性」または「同一性」に言及している場合、それは、適切なヌクレオチド挿入または欠損を伴うかたちで別の核酸（もしくはその相補鎖）と最適に整列されて比較され、例えば、FASTA、BLAST、またはGAPのような、配列同一性の任意の周知のアルゴリズムにより測定される。

[0082] 本明細書において「対象」とは、ウイルスに感染したまたは感染するリスクがある対象であって、ウイルス感染症のような疾患や症状を改善、予防、および／または治療が必要な動物、好ましくは、哺乳類、より好ましくは、ヒトを意味する。ある実施形態において、対象は、SARS-CoV-2に感染しているかまたは感染するリスクのあるヒトである。

[0083] 本発明の抗体等は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に特異的に結合する。よって、本発明の抗体等は、抗原であるSARS-CoV-2ウイルスまたはSARS-CoV-2のスパイク蛋白を検出するためにも用いることができる。

[0084] 抗体と抗原の結合活性を表す「結合親和性」は、一般に、分子（例えば抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有相互作用を合計した力を意味する。「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体および抗原）間の1:1の相互作用を反映する固有の数値として表される。分子XのそのパートナーYとの親和性は、一般に、 $k_{off}/k_{on}$ 比として計算される平衡解離定数（ $K_d$ ）によって表すことができる。例えば、Chen, et al. (1999) J. Mol Biol 293:865-881を参照。親和性は、当該技術分野で公知の一般的方法により測定することができる。低親和性

抗体は、一般に抗原に緩徐に結合し、容易に解離する傾向があり、他方で、高親和性抗体は、一般に抗原により迅速に結合し、結合状態をより長く維持する傾向がある。測定方法の例として、これに限定されないが、放射標識抗原結合アッセイ（RIA）、ELISAベースのイムノアッセイ、およびBiacore（登録商標）を用いる表面プラズモン共鳴アッセイを挙げることができる。本発明の抗体またはその抗原結合断片あるいはその改変／変異誘導体の結合特性の判定に適した方法および試薬は、当該技術分野で公知であり、また市販されている。さらに、このような分析のために設計された機器およびソフトウェアも市販されている（例えば、Biacore（登録商標）A100、およびBiacore（登録商標）2000）。

[0085] ある実施形態において、抗体・抗原結合アッセイは、直接結合アッセイとしてまたは競合結合アッセイとしてのいずれで行ってもよい。結合は、標準ELISAまたは標準フローサイトメトリーアッセイを用いて検出することができる。直接結合アッセイでは、試験抗体は、その抗原への結合について試験され、他方、競合結合アッセイでは、試験抗体がSARS-CoV-2のスパイク蛋白に結合する公知の抗体と競合する能力が評価される。これらの方法は、所望される特性を提供するものについてスクリーニングするために利用される。

[0086] SARS-CoV-2のスパイク蛋白に特異的な抗体は、さらに標識することもできる。標識は、抗体のN末端またはC末端に、あるいは任意のアミノ酸残基の側鎖に付加することができる。標識は、例えば、アビジン-ビオチン、放射性核種、蛍光色素、またはMRIで検出可能な標識である。ある実施形態において、標識された抗体は、画像化アッセイを含む診断アッセイにおいて用いられる。

[0087] 本明細書に記載の本発明の抗体等のアミノ酸配列に加えて、本発明はまた、該アミノ酸配列に対応しかつそれをコードするヌクレオチド配列を提供する。よって、本発明はまた、本発明の抗体等をコードするヌクレオチド配列をもつ単離核酸を含む。単離核酸は、好ましくはcDNAである。これらの

核酸配列は、本発明の抗体の軽鎖および重鎖並びにCDRの一部または全部をコードする核酸配列を含み、それらも本発明に含まれる。従って、本発明はまた、本明細書に記載された抗体のCDRおよびFRを含むVHおよびVLフレームワーク領域をコードするポリヌクレオチド配列、並びに細胞（例えば、哺乳類細胞）でのその効率的発現のための発現ベクターを含む。ポリヌクレオチドを使用して抗体を作製する方法は当該技術分野において公知であり、それらの方法を適宜使用できる。これらの方法を用いて本発明の抗体を作製する方法も本発明に含まれる。

[0088] 本発明において用いることができる、抗体の産生のための例示的技術を以下に説明する。本発明の抗体等は、遺伝子組換え技術、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせを含めた、当該技術分野において公知の幅広い技術を用いて調製することができる。

[0089] 遺伝子組換え技術を用いた特異的抗体の産生およびスクリーニング方法は、当該技術分野において周知・慣用の技術である。本発明の抗体等のアミノ酸配列をコードするDNAは、公知の技術を用いて容易に調製できる。例えば、これに限定されないが、表1に記載の配列番号の配列を参照し、各CDRのアミノ酸をコードするDNA配列を化学的に合成し、それらを任意に組み合わせることができる。その際、VHやLVのFRのアミノ酸配列をコードする任意のDNAと組合せることもできる。

[0090] 抗体またはその抗原結合断片、あるいはその変異体の発現のためには、抗体等をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを構築する。よって、プロモーターに作動可能に連結された、抗体分子、抗体の重鎖若しくは軽鎖、抗体若しくはその一部分の重鎖若しくは軽鎖的可変ドメイン、または重鎖若しくは軽鎖の任意のCDRをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能ベクターが提供され、これも本発明に含まれる。このようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むことができ、また、抗体等の可変ドメインが、重鎖全体、軽鎖全体、または重鎖および軽鎖全体の双方の発現用のベクターにクローニングされてもよい。発現ベクターは

宿主細胞に移入され、次いで、トランスフェクトされた細胞が培養され、抗体が産生される。従って、本発明は、本発明の抗体等のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体を発現させる場合は、重鎖および軽鎖の双方をコードするベクターを、免疫グロブリン分子全体の発現用の宿主細胞で同時に発現させてもよい。

[0091] 組換え抗体の発現用宿主として利用可能な哺乳類細胞株としては、当該技術分野において公知であり、ATCCから入手可能な多くの不死化細胞株、例えばこれに限定されないが、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒーラー細胞、ベビーハムスター腎（BHK）細胞、サル腎細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、HepG2）、ヒト腎上皮細胞（HREPC）、ヒト胎児腎細胞（HEK）、および数多くの他の細胞株を挙げることができる。発現させた抗体またはその一部分の正しい修飾およびプロセッシングが確実となるように、適切な細胞株または宿主系を選択することができる。このため、適切な一次転写物のプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核生物宿主細胞が好ましく用いられる。かかる哺乳類宿主細胞としては、これに限定はされないが、CHO、VERY、BHK、ヒーラー、COS、MDCK、HEK293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0（いかなる機能性免疫グロブリン鎖も内因的に産生しないマウス骨髄腫細胞株）、SP20、CRL7030およびHsS78Bst細胞が挙げられる。また、遺伝子組換え技術を用いて、ヒトリンパ球を不死化することにより開発されたヒト細胞株を使用して抗体等を産生することができ、また、ヒト細胞株PER.C6.を使用して抗体等を産生することもできる。

[0092] また、組換え抗体の発現用宿主として用いることができる他の細胞株としては、例えば、昆虫細胞（例えばSf21/Sf9、イラクサギンウワバ（*Trichoplusia ni*）Bti-Tn5b1-4）または酵母細胞（例えばS.セレビスエ（*S. cerevisiae*）、ピキア属（*Pichia*）他）、植物細胞、およびニワトリ細胞を挙げることができる。

[0093] トランスフェクトされた細胞株は、抗体の発現および産生をもたらす当該技術分野において公知の細胞培養培地および条件で維持される。本技術分野において公知の培地および培養技術を制限なく用いることができる。抗体産生は、当該技術分野において公知の流加法、バッチ法、灌流法または連続供給バイオリアクター法を用いるバイオリアクタープロセスによって大量に行うことができ、かかる技術により抗体の大量製造が可能である。

[0094] 本発明は、本発明の抗体等を製造するための方法でもある。本発明の製造方法においては、本発明の宿主細胞を、抗体またはその抗原結合断片の発現に適した条件下で培養するステップを含む、方法である。かかる方法は、さらに、抗体またはその抗原結合断片を宿主細胞培養物から単離するステップと、場合により、単離抗体またはそのフラグメントを組成物に配合するステップと、を含んでもよい。

[0095] 抗体またはその抗原結合断片あるいはそのアミノ酸置換体は、いわゆるファージディスプレイ技術を用いて作製することもできる。本明細書に記載の配列を参照してファージディスプレイライブラリーを作成し、SARS-CoV-2のスパイク蛋白への結合を指標として本発明の抗体またはその抗原結合断片を作製することができる。ファージディスプレイ法では、機能性抗体ドメインが、それをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面に提示される。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージを、例えば標識された抗原または固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕捉されている抗原を使用して、選択または同定することができる。

[0096] 抗体の精製および単離

遺伝子組換え技術を用いて、発現による産生後、抗体分子は、当該技術分野において公知の免疫グロブリン分子を精製する任意の方法により、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、特に特異的抗原プロテインAまたはプロテインGに対する親和性によるもの、およびサイズ排除カラムクロマトグラフィー）、遠心、溶解度の差を利用し、または任意の他の標準的なタンパク質精製技術により精製され得る。さらに、本発明の抗体

等は、精製を促進することが知られる異種ポリペプチド配列（一般に「タグ」と称される）に融合されてもよい。

[0097] 組換え技術を用いて、抗体は細胞内に産生されるか、細胞膜周辺腔に産生されるか、または培地中に直接分泌され得る。抗体が細胞内に産生される場合、最初の工程として、宿主細胞または溶解した断片のいずれかである粒子状デブリが、例えば遠心または限外ろ過により除去される。抗体が培地中に分泌される場合、発現系からの上清が、タンパク質濃縮フィルター、例えば、限外ろ過ユニットを使用して濃縮される。

[0098] 細胞から調製された抗体含有調製物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、および／またはアフィニティークロマトグラフィーを、単独で、或いは他の精製工程と組み合わせて用いて、精製することができる。抗体がC H 3 ドメインを含む場合、精製にはB a k e r b o n d A B X樹脂が有用である。他のタンパク質精製技術、例えば、イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相H P L C、シリカクロマトグラフィー、ヘパリンクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）セファロースクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E、および硫酸アンモニウム沈殿もまた、回収する抗体に応じて利用可能である。

[0099] ある実施形態において、実質的に精製または単離された本発明の抗体が提供される。ある実施形態において、このような精製または単離された組換え発現抗体は患者に投与可能であり、それにより予防または治療効果が達成され得る。

[0100] ヒト抗体は、当該技術分野で周知の方法を用いて作製することができる。ヒト抗体は、マウスまたはラット可変および／または定常領域を有する抗体に付随する問題の一部を回避する。かかるマウスまたはラット由来のタンパク質が存在すると、抗体の急速なクリアランスが引き起こされ得るか、または患者による抗体に対する免疫応答の発生が引き起こされ得る。

- [0101] ヒト抗体は、インビトロ方法によって得ることもできる。例えば、ファージディスプレイ法、リボソームディスプレイ法、酵母ディスプレイ法が挙げられる。ファージディスプレイ技術（例えば、米国特許第5,969,108号明細書を参照）を用いることにより、未免疫ドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーからインビトロでヒト抗体または抗体断片を作製することができる。あるいは、ヒト抗体はまた、インビトロ活性化B細胞により作製してもよい（例えば、米国特許第5,567,610号明細書および同第5,229,275号明細書を参照）。
- [0102] 免疫グロブリン遺伝子は、可変領域におけるV、DおよびJ遺伝子セグメント間の組換え、アイソタイプスイッチング、および超突然変異を含め、免疫応答が成熟する間に様々な修飾を受ける。組換えおよび体細胞超突然変異により抗体多様性および親和性成熟を生じるが、それらはまた抗体の免疫原性リスクを増加し得る。一般に、CDR領域における突然変異は親和性および機能の向上に寄与するものと思われる一方、フレームワーク領域における突然変異は免疫原性リスクを増加させ得る。よって、フレームワーク配列は生殖系列に類似させることによってリスクを低減できる。作製された抗体の不安定性、凝集、不均一性、または免疫原性の増加をもたらす潜在的な構造的な要因は除去することが望ましい。望ましくない構造的要因の例としては、不對のシステイン（これは望まないジスルフィド結合の形成、または変化し得るスルフヒドリル付加物の形成を引き起こし得る）、N-結合型グリコシル化部位（構造および活性の不均一性をもたらす）、並びにアミド分解（例えばNG、NS）、異性化（DG）、酸化（露出したメチオニン）、および加水分解（DP）部位が挙げられる。従って、免疫原性のリスクを低減し、且つ薬学的特性を向上させるため、フレームワーク配列を生殖系列に復帰させ、CDRを生殖系列に復帰させ、および／または構造的な要因を除去することが望ましい。従って、ある実施形態において、特定の抗体がその各々の生殖系列配列とアミノ酸レベルで異なる場合、抗体配列は、生殖系列配列に逆突然変異され得る。かかる修正的な突然変異は、標準的な分子生物学

的技術を用いて、1つ、2つ、3つ若しくはそれより多くの位置で、または突然変異した位置のいずれかの組み合わせにおいて発生し得る。よって、このような変異を起こしうる配列をもつ抗体またはその抗原結合断片も本発明に含まれる。また、本発明の抗体等は、このような観点において変異やアミノ酸置換を行うことができ、それらも本発明に含まれる。

[0103] 一つの実施形態において、本発明の抗体は、抗体断片またはそれらの断片を含む抗体である。抗体断片は、完全抗体のうち、その抗原結合領域または可変領域である一部分を含む。抗体断片の例には、これに限定されないが、F a b、F a b'、F ( a b' ) 2、F d、F v断片、ジスルフィドF v、一本鎖抗体 ( S c F v )、単一ドメイン抗体、ナノボディ、ダイアボディを挙げることができる。

[0104] これらの断片は、当該技術分野において公知の技術を用いて作製することができる。例えば、完全な抗体のタンパク質消化によって得ることができる。また、遺伝子技術を用い、組換え宿主細胞に直接産生させることができる。これに限定されないが、F a b、F vおよびs c F v抗体断片は全て、大腸菌で発現させて、そこから分泌させることができるため、これらの断片は大量産生が容易に可能である。或いは、F a b' - S H断片を大腸菌に発現させて回収し、化学的にカップリングすることにより、F ( a b' ) 2断片を作製することもできる。また、F ( a b' ) 2断片を組換え宿主細胞で発現させ、培養物から単離することもできる。また、他の報告されている技術を用い、F v断片や一本鎖F v ( s c F v ) を作製することもできる。F vおよびs c F vは、定常領域を欠いた完全な抗原結合部位を有する抗体断片である。また、s c F vのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにエフェクタータンパク質を融合させてs c F v融合タンパク質を作製することもできる。抗体断片を産生するための種々の技術が公知であり、本発明においてそれらの技術を制限なく用いることができる。

[0105] 別の実施形態において、本発明の抗体は、ドメイン抗体、例えば、ヒト抗体の重鎖可変 ( V H ) または軽鎖可変 ( V L ) 領域に対応する抗体の小さい

機能的結合単位を含む抗体である。ドメイン抗体の例としては、これに限定はされないが、例えば、Domantis社の技術を用いて作製する抗体を挙げることができる（例えば、国際公開第04/058821号パンフレット；国際公開第04/081026号パンフレット；国際公開第04/003019号パンフレット；国際公開第03/002609号パンフレットを参照）。

- [0106] ある実施形態において、本発明の抗体は、線状抗体である。線状抗体は、一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFdセグメント（VH-CH1-VH-CH1）を含む。
- [0107] ある実施形態において、本発明の抗体は、単特異性、二重特異性、または多重特異性であり得る。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であるか、または複数の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有する。本発明の多重特異性抗原結合分子のいずれか、またはその変異体は、当業者に公知の分子生物学的技術（例えば、組換えDNA、およびタンパク質発現技術）を用いて構築できる。
- [0108] ある実施形態において、二重特異性抗体であるSARS-CoV-2のスパイク蛋白特異的抗体は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白の別個のドメインに結合する可変領域が、単一の結合分子内に二重ドメイン特異性となるように結合して作製することができる。適切に設計され作製された二重特異性抗体は、特異性および結合活性の増大を通じて、全体的にSARS-CoV-2のウイルスの阻害活性を増強させることができる。二重特異性の1つの例において、単一のVLセグメント（例えば、VL1）は、2つの異なるVHドメイン（例えば、VH1およびVH2）と組み合わせられて、2つの結合「アーム」（VH1-VL1、およびVH2-VL1）を含む二重特異性を生じる。単一のVLセグメントを使用することにより、システムの複雑さを低減してクローニング、発現、および精製方法における効率を増大させることができる。
- [0109] 他の典型的な二重特異性のフォーマットとしては、これに限定されないが

、 s c F v - ベースの二重特異性のフォーマットを挙げることができる。二重特異性抗体の二重特異性フォーマットは、例えば、 I g G - s c F v 融合体、二重可変ドメイン ( D V D ) - I g 、クアドローマ、 k n o b s - i n t o - h o l e s 、共通軽鎖 (例えば、 k n o b s - i n t o - h o l e s を有する共通軽鎖など)、 C r o s s M a b 、 C r o s s F a b 、 ( S E E D ) b o d y 、ロイシンジッパー、 D u o b o d y 、 I g G 1 / I g G 2 、二重作用 F a b ( D A F ) - I g G 、および M a b 2 二重特異性フォーマットを含む。二重特異性抗体はまた、ペプチド/核酸結合を用いても構築できる。

[0110] 本発明はまた、可変軽鎖 ( V L ) ドメインおよび/または可変重鎖 ( V H ) ドメインおよび/または F c 領域における 1 つまたはそれ以上のアミノ酸残基および/またはポリペプチドの置換、付加および/または欠失、および翻訳後修飾を含む、本発明の抗体等のさらなる修飾体、並びにその変異体およびその断片も包含する。抗体に他の物資、例えば、タンパク質、ペプチド、薬物、または標識が共有結合している抗体コンジュゲートも修飾体に含まれる。このような抗体の改変および修飾を用い、 S A R S - C o V - 2 感染症の治療および/または診断に適するように抗体の生化学的なおよび/または機能的な特性を改変できる。このような改変および修飾を行う技術は、当該技術分野において公知であり、本発明において制限なく用いることができる。

[0111] ある実施形態において、抗体の改変は、抗体の可変領域の 1 つ以上に導入された 1 つ以上のアミノ酸改変 (例えば、置換、欠失および/または付加) により作製できる。別の実施形態において、アミノ酸改変はフレームワーク領域に導入されうる。改変された抗体は、本明細書に記載の方法を用いて、その活性を指標にスクリーニングできる。アミノ酸置換については、上記した保存的置換または非保存的置換を行うことができる。また、必要に応じて、非天然のアミノ酸またはアミノ酸類似体を置換または付加して抗体配列に導入することができる。このようなアミノ酸の例としては、これ限定はされ

ないが、天然アミノ酸のD-異性体、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 $\gamma$ -Abu、 $\epsilon$ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、 $t$ -ブチルグリシン、 $t$ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 $\beta$ -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナアミノ酸、例えば $\beta$ -メチルアミノ酸、 $C\alpha$ -メチルアミノ酸、 $N\alpha$ -メチルアミノ酸、および、その他のアミノ酸類似体を挙げるができる。

[0112] 別の実施形態において、本発明の抗体等において、抗体またはその抗原結合断片の適切なコンホメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基を、例えばセリンと置換してもよく、それにより分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋を防止することができる。また、1つまたは複数のシステイン結合を抗体に加えることで、その安定性を向上させることもできる。特に、抗体等がFv断片などの抗体断片である場合には有用である。

[0113] ある実施形態において、本発明の抗体等は、当該技術分野において公知の方法を用いて他の物質と結合（コンジュゲートまたは共有結合）させることができる。結合される物質としては、治療剤、治療補助剤、検出可能標識または固体支持体を含む。抗体と結合される物質は、これに限定はされないが、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、多糖、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、ハプテン、薬物、ホルモン、脂質、脂質集合体、合成高分子、マイクロパーティクル、生体細胞、ウイルス、フルオロフォア、発色団、色素、毒素、ハプテン、酵素、抗体、抗体断片、放射性同位元素、固体マトリックス、半固体マトリックスおよびそれらの組み合わせが挙げられる。これらの他の物質を抗体に結合する方法は、当該技術分野において公知であり、本発明において制限なく用いることができる。

[0114] 一つの実施形態において、本発明の抗体等は固体支持体に結合される。固体支持体に結合された抗体は、例えば、スクリーニング、精製、製造プロセスの一部、診断方法または組成物の一部として用いることができる。固体支

持体は、一般には液相に対して実質的に不溶性である。多数の支持体が当業者に周知であり、本発明において用いることができる。固体支持体には、これに限定されないが、固体および半固体マトリックス、例えばエアロゲルおよびハイドロゲル、樹脂、ビーズ、バイオチップ（薄膜被覆バイオチップを含む）、マイクロ流体チップ、シリコンチップ、マルチウェルプレート（マイクロタイタープレートまたはマイクロプレートとも呼ばれる）、膜、導電性および非導電性金属、ガラス（顕微鏡スライドを含む）および磁気支持体が含まれる。より具体的な固体支持体の例としては、シリカゲル、高分子膜、粒子、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲル、多糖、例えばセファロース、ポリアクリレート、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリオール、アガロース、寒天、セルロース、デキストラン、デンプン、フィコール（F I C O L L）、ヘパリン、グリコーゲン、アミロペクチン、マンナン、イヌリン、ニトロセルロース、ジアゾセルロース、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン（ポリエチレングリコールを含む）、ナイロン、ラテックスビーズ、磁気ビーズ、常磁性ビーズ、超常磁性ビーズなどを挙げることができる。

[0115] ある実施形態において、固体支持体は、本発明の抗体等と結合するための反応官能基、例えば、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基、アルデヒド基、ハロゲン基、ニトロ基、シアノ基、アミド基、尿素基、カーボネート基、カルバメート基、イソシアネート基、スルホン基、スルホネート基、スルホンアミド基、スルホキシド基等を含んでもよい。

[0116] 一つの実施形態において、本発明の抗体は、診断および他の測定（例えば、SARS-CoV-2ウイルスの検出）を目的として、標識に結合させることができる。抗体に結合して使用される標識としては、これに限定はされないが、発色団、フルオロフォア、蛍光タンパク質、リン光色素、タンデム色素、粒子、ハプテン、酵素および放射性同位元素が挙げられる。抗体のこれらの標識物質への結合技術は、当該技術分野において周知であり、それらを本発明においても用いることができる。また、標識された抗体を用いた診

断および他の測定において、標識の種類に基づく検出方法も同様に当該技術分野において公知であり、かかる検出方法も本発明において用いることができる。

[0117] 本発明の抗体等は、SARS-CoV-2ウイルス感染の治療、SARS-CoV-2ウイルス感染の予防、および／またはSARS-CoV-2ウイルス感染の検出、診断および／または予後の診断に使用することができる。本発明の抗体等は、他のコロナウイルスに対しても抗原特異的に結合する限り、それら他のコロナウイルスの治療および予防、または診断においても用いることができる。

[0118] 一つの実施形態において、本発明は、対象に、本発明の抗体等を有効量で投与することにより、対象を治療する方法である。ある実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、実質的に精製されたものが用いられる。ある実施形態において、本発明の抗体またはその抗原結合断片は、SARS-CoV-2に感染した、あるいは感染の疑いがある対象に投与される。ある実施形態において、本発明の抗体等は、SARS-CoV-2に感染するリスクのある対象に、予防的に投与される。別の実施形態において、本発明の抗体等は、感染後または症状発症後に、あるいは予防的に感染前に対象に投与される。ある実施形態においては、本発明の抗体等は、感染しているが無症状の対象に投与される。

[0119] ある実施形態において、本発明の抗体またはその抗原結合断片、あるいはそれを含む医薬組成物、およびそれらを対象に投与する本発明の方法は、対象におけるSARS-CoV-2ウイルスの感染を治療しまたはウイルス感染を低下させる。別の実施形態において、本発明の医薬組成物および本発明の方法は、対象において、SARS-CoV-2ウイルス感染を予防し、感染のリスクを低下させるかまたは感染を遅延させる。

[0120] 本発明の抗体等が投与される対象は、哺乳類であり、好ましくはヒトである。より特定の実施形態において、対象は、例えば、SARS-CoV-2ウイルスに対して易感染性対象、感染に対して特にリスクがあるかまたは感

受性が高い対象である。リスクのある対象（患者）は、免疫不全状態の人、高齢者（年齢65歳以上）、肺の感染症、心臓疾患、呼吸器疾患、糖尿病、若しくは透析患者のような基礎疾患を持つ者、医療労働者、SARS-CoV-2感染が確認された若しくは感染が疑われる人と密接に接触した者、またはそれらの者に接触することが予測される者を含むが、これらに限定されない。

[0121] 治療のための投与は、単回用量スケジュールまたは複数回用量スケジュールが可能であり、また本発明の抗体またはその抗原結合断片は、受動免疫で使用することができる。

[0122] ある実施形態において、本発明の抗体等は、1つ以上の他の薬剤、例えば抗ウイルス薬と組み合わせて対象に投与できる。他の薬剤としては、これに限定されないが、例えば、レムデシビル、ファビピラビル、デキサメタゾン、シクレニソニド、ナファモスタット、カモスタット、イベルメクチン、バミラニビマブ、エテセビマブ、カシリビマブ、イムデビマブ、およびHIVプロテアーゼ阻害剤（例えば、ロピナビル、リトナビルまたはそれらの合剤、ネルフィナビル）を挙げることができる。ある実施形態において、本発明の抗体等は、本発明の抗体等に関連する何らかの副作用が生じる場合は、かかる潜在的副作用に対抗するかまたは低減するのを助ける治療薬と組み合わせて対象に投与することができる。また、SARS-CoV-2の感染において重症化するリスクがあるまたは合併症を引き起こす疾患、例えば、糖尿病や心臓血管病、腎臓病、およびCOPDのような慢性呼吸器疾患に対する治療薬も組み合わせて対象に投与することができる。このような薬剤としては、例えば、抗炎症薬（例えば、コルチコステロイドおよび非ステロイド系抗炎症薬）、抗感染症薬、抗酸化剤のような栄養補助剤、ならびに対象の身体的または精神的状態を改善する当該技術分野において公知の任意の他の薬物を挙げることができる。

[0123] 本発明はまた、医薬組成物を製造する方法であって、本発明の抗体等を1つ以上の薬学的に許容できる担体と混合するステップを含む、医薬組成物の

製造方法を提供する。

[0124] 本発明はまた、有効成分として本発明の抗体等を含む医薬組成物を提供する。かかる医薬組成物は、本発明の抗体等を治療有効量で含み、さらに、薬学的に許容できる担体を含む。本明細書において「薬学的に許容できる担体」は、動物、特にヒトで使用するため、規制機関によって使用が認可されている、または一般に使用が認められている薬局方に収載されている担体を意味する。担体は、有効成分と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または媒体を含む。かかる担体は、滅菌液体、例えば水および油、例えば石油、動物、植物または合成起源のもの、例えばピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油等を含む。水は、医薬組成物が静脈内投与される場合に好ましい担体である。生理的食塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、特に注射可能溶液用に、液体担体として使用することができる。好適な薬学的賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等を含む。医薬組成物はまた、必要に応じて、少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤も含み得る。

[0125] 本発明の医薬組成物は、いずれの形態、例えば、溶液、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性製剤等の形態をとることができる。医薬組成物を、それぞれの形態に製剤化する技術は、当該技術分野において公知であり、本発明の医薬組成物の製造においてもそれを参照でき、投与方法に適合した製剤化が行われる。

[0126] 本発明の抗体等の投与量は、投与対象の症状、年齢、状態、投与経路等により適宜選択される。本発明の抗体が、成人患者における疾患の治療のために、またはかかる疾患の予防のため用いられる場合、これに限定されないが、通常、体重1kg当たり、下限として、約0.01mg、好ましくは約0.05mg、より好ましくは約0.1mg、一方、上限としては、約100

mg、好ましくは約50mg、より好ましくは約20mg、さらに好ましくは約10mgの単回用量にて投与される。本発明の抗体の抗原結合断片を用いる場合は、前記用量より多くの用量を投与するのが通常であり、これに限定されないが、例えば、約1.5倍～約50倍、好ましくは約1.5倍～約20倍、より好ましくは約1.5倍～約10倍の量が投与される。状態の重症度に依存して、投与の頻度および投与間隔は調節される。ある実施形態において、本発明の抗体等は、少なくとも約1mg～約1000mgの開始用量として投与される。ある実施形態において、開始用量に続き、開始用量のものとおよそ同一であるか、またはそれ未満である量における第2または多数の続く用量の抗体またはその抗原結合断片が投与され、ここで、続く用量は、少なくとも1日～3日；少なくとも1週；少なくとも2週；少なくとも3週；少なくとも4週；少なくとも5週；少なくとも6週；少なくとも7週；少なくとも8週；少なくとも9週；少なくとも10週；または少なくとも12週により隔てられる。

[0127] 投与用量および投与スケジュールを含む投与治療計画は、投与対象の症状、年齢、状態、投与経路等を考慮し、対象（患者）を診断した医師が適宜判断して、必要に応じ、様々な機関から提示されたガイドラインを参照して、決めることができる。

[0128] 本発明の医薬組成物の投与経路は、対象の症状、状態その他の条件を考慮して任意に定めることができる。投与経路は、皮内、経皮、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および経口経路を含むが、これらに限定されない。医薬組成物は、任意の好都合な経路により、例えば、注入若しくはボラス注射により、または上皮若しくは皮膚粘膜裏層（例えば、経口粘膜、直腸、および腸粘膜など）を通じた吸収により投与され、また、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与してもよい。投与は全身または局所であり得る。

[0129] 医薬有効成分の投与においては、種々のデリバリーシステムが公知であり、これらを用いて、本発明の医薬組成物を投与できる。例えば、リポソーム

におけるカプセル封入、微粒子、ナノ粒子、マイクロカプセを挙げることができる。また、ある実施形態において、医薬組成物は、制御放出システムにおいてデリバリーすることもできる。制御放出システムは、組成物が標的の近くに置かれ、従って、少量の全身性用量のみが必要とされる。

[0130] 本発明の医薬組成物を注射で投与する場合、注射可能な調製物は、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、腹腔内および筋肉注射用形態、または点滴注入用形態などを含む。これらの注射可能な調製物は、公知の方法を参照して調製できる。注射可能な調製物は、例えば、注射のため通常用いられる無菌の水性媒体もしくは油性媒体に、本発明の抗体等またはその塩を溶解、懸濁、または乳化することにより、調製できる。注射用水性媒体として、例えば、生理的食塩水、グルコースを含有する等調溶液、および他の補助剤などを挙げることができる。アルコール（例えば、エタノール）、多価アルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤 [例えば、ポリソルベート 80、HCO-50（硬化ヒマシ油のポリオキシエチレン（50 mol）付加物）] などの適切な溶解剤と併用で用いることもできる。油性媒体として、例えば、ゴマ油、大豆油などが利用され、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどのような溶解剤と併用して用いることができる。また、調製される注射は、好ましくは適切なアンプルに充填される。

[0131] 本発明の医薬組成物が注射剤である場合、用時調製注射剤としてまたはプレフィルシリンジ剤として調製できる。本発明の医薬組成物は、標準的な針およびシリンジで皮下または静脈内に投与される。また、皮下投与のためにペンデリバリー装置を用いることもできる。ペンデリバリー装置は、再利用可能であるか、または使い捨てである。

[0132] 医薬組成物は、経口または非経口のいずれにおいても、有効成分の目的用量に適合するように単位用量に調製された投薬剤形にて調製される。単位用量を含む投薬剤形は、例えば、錠剤、ピル、カプセル剤、注射（アンプル剤）、坐剤などを含む。含有される抗体の量は、一般に、単位用量において、

一つの投薬形態当たり約5～約1000mg、の抗体等が含有されることが好ましい。

[0133] 本発明の抗体等を含む医薬組成物は、SARSコロナウイルス感染症、特にSARS-CoV-2感染症のようなSARSコロナウイルスと関連する疾患、障害、若しくは状態の治療、および／または予防に有用である。本発明の医薬組成物はまた、SARSコロナウイルス感染症、特にSARS-CoV-2ウイルス感染症と関連する少なくとも1つの症状を改善するのに有用である。かかる症状は、これに限定されないが、肺における炎症、肺胞の損傷、発熱、呼吸器障害（鼻閉、鼻汁、咽頭痛、咳、息切れ）、頭痛、倦怠感、味覚不全、嗅覚障害、下痢、嘔吐、血液凝固の亢進、血栓症、川崎病様血管炎、腎機能障害（例えば腎炎）、臓器不全、肺炎、敗血性ショックおよび死を含む。ある実施形態において、本発明の抗体は、SARS-CoV-2ウイルスにより引き起こされる重篤かつ急性の呼吸器系感染症に罹患している対象を処置するのに有用である。ある実施形態において、本発明の抗体は、宿主におけるウイルスタイトーの低減において有用である。1つの実施形態において、本発明の抗体は、SARS-CoV-2に感染した対象の肺の炎症の予防または低減において有用である。1つの実施形態において、本発明の抗体は、SARS-CoV-2に感染した対象における間質性、細気管支周囲もしくは血管周囲の炎症、肺胞の損傷、および胸膜の変化の予防または低減において有用である。

[0134] 本発明の抗体等は、他の薬剤と併用して、あるいは他の薬剤との配合剤として用いることができる。あるいは、本発明の抗体等の2種以上を組み合わせ用いることができるが、かかる場合は、異なるエピトープを認識する抗体またはその抗原結合断片を組み合わせることが好ましい。本発明の抗体等と併用してまたは本発明の抗体等と組み合わせ用いることができる第2の治療剤は、上記したものを挙げるることができる。これらの併用または組合せにより、相乗的効果が期待される。また、本発明の抗体またはその抗原結合断片を、他の抗SARS-CoV-2抗体と併用して用いること（「カクテ

ル療法」)も可能である。

[0135] 本発明の抗体等を用いた診断方法においては、対象から採取した試料に、抗体等を接触させる工程を含む。かかる試料は、対象から採取され、その中にウイルスまたはウイルスの一部の混入が疑われる試料であれば特に制限がなく、例えば、鼻道、洞腔、唾液腺、肺、肝臓、脾臓、腎臓、耳、目、胎盤、消化管、心臓、卵巣、下垂体、副腎、甲状腺、脳、皮膚、または血管（好ましくは末梢血管）から採取された試料を含む。代表的には、唾液、血液、鼻・咽頭ぬぐい液をあげることができる。

[0136] 本発明の抗SARS-CoV-2(S)抗体を用いて、例えば、診断の目的のため、試料中のSARS-CoVの検出または測定を行うことができる。ある実施形態においては、ウイルス感染症のような疾患もしくは障害を検出するためのアッセイにおいて、1つまたはそれ以上の本発明の抗体等を使用することができる。SARS-CoV-2の典型的な診断アッセイは、例えば、患者から得た試料（好ましくは、唾液、血液、または鼻・咽頭ぬぐい液）を、本発明の抗SARS-CoV-2(S)抗体と接触させる工程を含み、ここで、抗SARS-CoV-2(S)抗体は、検出可能な標識もしくはレポーター分子で標識されるか、または患者試料からSARS-CoV-2を選択的に単離するための捕捉リガンドとして用いられる。あるいは、未標識の抗SARS-CoV-2(S)抗体は、それ自体が検出可能に標識された2次抗体と組み合わせて用いることもできる。検出可能な標識またはレポーター分子は、ラジオアイソトープ；フルオレセインイソチオシアネート、またはローダミンのような蛍光若しくは化学発光部分；またはアルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、若しくはルシフェラーゼのような酵素である。試料中のSARS-CoV-2を検出または測定するために用いられるアッセイ方法として、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および蛍光活性化細胞分取(FACS)を挙げることができる。これらを含む抗体を用いた診断および検出方法は、当該技術分野において公知であり、か

かる公知の方法を本発明において用いることができる。

- [0137] 本発明の抗体等はまた、SARS-CoV-2ウイルス感染の診断用のキットとして用いることもできる。さらに、本発明の抗体等は、SARS-CoV-2のスパイク蛋白のRBDに特異的に結合するので、ワクチン製造の品質管理においても用いることもできる。

## 実施例

- [0138] 以下、実施例により、本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

本研究計画は、熊本大学大学院生命科学研究部および熊本市民病院で倫理審査を受け、承認済である（倫理第2013号）。COVID-19回復期症例の選定、同意の取得と血液検体の採取は、熊本市民病院の担当医師（岩越 一部長ら）が行い、本発明者らに提供され、検討が行われた。

- [0139] （実施例1）中和単クローン抗体のスクリーニング

COVID-19感染回復期症例の中でも、血漿中に強力な中和活性を持つと考えられる2例を選定し、以下のスクリーニングを行った。選定した2例の血漿からB細胞を分離し、抗体を回収した。要約すると以下のようにして行った。Boehmerら（Nature protocols. Published online 15 September 2016; doi:10.1038/nprot.2016）の報告を参考にして、血液検体より分離した末梢血単核球より、7AAD<sup>-</sup>、CD19<sup>+</sup>、IgG<sup>+</sup>、IgM<sup>-</sup>、CD27<sup>+</sup>のB細胞をFACS Aria IIIを用いてシングルセルソーティングを行った。Tillerら（J Immunol Methods. 329: 112-124, 2008）の報告を参考にして、以下のようにして抗体を回収した。得られた細胞からmRNAを回収し、回収したmRNAからRT-PCRによりIgG的可変領域を増幅し、重鎖および軽鎖のペア遺伝子を選別した。重鎖および軽鎖のそれぞれの遺伝子を発現ベクターに組み込んでHEK293T細胞にトランスフェクションし抗体を発現させ、上清に産生された組み換え抗体（組換えIgG；rIgG）を回収した。この方法により、総数1102クローンを回収した。

- [0140] （実施例2）SARS-CoV-2のスパイク蛋白結合抗体のスクリーニン

グ

実施例1により得た総数1102個のクローンを用い、SARS-CoV-2のスパイク蛋白と結合する抗体を以下のようにしてスクリーニングした。

図3に示すように、SARS-CoV-2のスパイク蛋白とEGFPを共発現するプラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクトして、細胞表面にスパイク蛋白を発現させた。トランスフェクトの2日後に、トリプシンで細胞を剥がして0.2% BSA-PBSで懸濁してスパイク蛋白およびEGFP発現細胞として用いた。50 $\mu$ Lのスパイク蛋白およびEGFP発現細胞懸濁液に対し、抗スパイク抗体を含むと想定される実施例1で得たクローンの細胞培養上清(50 $\mu$ L)または、コントロール血漿(感染者血漿および正常人血漿)(1:500倍希釈、50 $\mu$ L)のサンプルと混合し、15分室温で静置した。遠心によって細胞を分離して上清を捨て、0.2% BSA-PBSで細胞を懸濁して洗浄後、200倍に希釈したAPC-コンジュゲート抗ヒトIgG(ヤギ抗体)抗体50 $\mu$ Lで懸濁して15分室温で静置した。0.2% BSA-PBSで細胞を洗浄後、4% パラホルムアルデヒド-PBSで固定した。染色した細胞をフローサイトメトリーによって解析し、EGFP陽性細胞をスパイク蛋白発現細胞としてゲートし、EGFP<sup>+</sup>細胞集団のAPC陽性率によって抗体のスパイク蛋白結合活性を判定した。図4は患者血漿を用いたフローサイトメトリーによる解析結果を示しており、矢印がスパイク蛋白結合活性を示している。フローサイトメトリー分析の結果、総数1102個のクローンから、合計88個のスパイク蛋白結合抗体を発現するクローンをスクリーニングした。

[0141] (実施例3) RBD結合抗体のスクリーニング

実施例2でスクリーニングされた88個のクローンを用い、スパイク蛋白のリセプター結合ドメイン(RBD)に結合する抗体を以下のようにしてスクリーニングした。

2種類の蛍光標識したビーズを用いて抗原と抗体を標識し、抗原・抗体結

合反応をそれぞれのビーズ間の距離と発光強度の相関を利用して測定可能としたLOC1法をベースとしたAlphaScreenシステムを利用し、クローニングされたrlgGのSARS-CoV-2のスパイク蛋白リセプター結合ドメイン(RBD)への結合評価を行った。九州大学 橋口隆生先生より供与されたビオチン化RBD(Hisタグ付)とrlgGとの結合を、抗6xHisアクセプタービーズとプロテインAドナービーズを用いて、AlphaScreen scoreを計測した。抗体が含まれる各クローンの培養上清 5  $\mu$ L、ビオチン化RBD (20  $\mu$ g/mL in PBS) 5  $\mu$ L、アクセプタービーズ (5 mg/mL) 5  $\mu$ L、およびプロテインAドナービーズ (5 mg/mL) 5  $\mu$ Lを混合して反応液 (20  $\mu$ L) とし、反応を行った。抗スパイク蛋白抗体の88クローンのうち11クローンにおいて、ポリグロブリン-NとRBDとの反応に比べscoreの上昇(平均: 13, 372 対 2, 723)がみられた。図5にAlphaScreenシステムを用いた、結合活性データの一部を示す。図5に示されるように、クローンCSSA10-121、CSSA8-92、CSSA12-71、CSSA5-76、CSSA3-5、CSSA3-23、およびCTMA9-105が顕著なRBD結合活性を示した。

実施例1から実施例3において、選定した2例(CSSA 0504およびCTMA 0430)からスクリーニングされたクローン数をまとめたものを以下の表に示す。

[0142] [表2]

Date	Donor ID	clones	S binding abs	RBD binding abs
200504	CSSA 0504	658	55	6
200430	CTMA0430	444	33	5
	total	1102	88	11

上記のように、これらの検討から、CTMAとCSSAという2症例より計1102のrlgGが得られ、その内88抗体がSARS-CoV-2の

スパイク蛋白と結合した。さらに88抗体中11クローンにスパイク蛋白のRBD結合活性が確認された。

[0143] (実施例4) 中和活性を持つ抗体のスクリーニング

抗体の重鎖、軽鎖を発現するプラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクトし、その細胞培養上清中に含まれる組換え抗体のSARS-CoV-2中和活性をシュードウイルス中和試験にて検討した。概略を図6に示す。シュードウイルスは、パッケージング・プラスミドpsPAX2-IN/HiBiT、トランスファー・プラスミドpWPI-Luc2、SARS-CoV-2 Spike発現プラスミドpCMV3-SARS2-Sを2:2:1の割合でHEK293T細胞にトランスフェクションして作製した。トランスフェクション2日後に培養上清を回収し、0.22 $\mu$ Mフィルターを通して-80度で保存し、以下の試験に用いた。中和試験には293FT-DSP1-7-ACE2-TMPRSS2細胞(東大医科研:井上教授より分与)を用い、前日に $1 \times 10^5$  cells/mLの細胞懸濁液を100 $\mu$ L/wellで96 wellプレートに播いた。別の96 wellプレートに、組換え抗体を含んだ各クローンの細胞培養上清を培養液で2倍に薄めて110 $\mu$ L/wellで加え、次いで、200 TCID<sub>50</sub>のシュードウイルスを110 $\mu$ L/wellにて加えて1時間、37度で培養した(以下、「培養上清とウイルスの混合液」という。)。実験は各サンプル2 wellで行った。前日に準備していた細胞の培養上清を捨て、培養上清とウイルスの混合液を加えて培養した。5時間後に培養上清とウイルスの混合液を捨て、新しい培養液を200 $\mu$ L加えてさらに培養した。感染2日後に細胞上清を捨て、lysis bufferを30 $\mu$ L加えて10分間攪拌して細胞を溶解した。細胞溶解液10 $\mu$ Lを白色の96 wellプレートに移してルシフェラーゼ基質を50 $\mu$ Lえて蛍光を測定した。ウイルスだけを加えたサンプルのRLU(relative light unit)を100%感染、ウイルスを含まないサンプルのRLUを0%感染とし、各クローンの細胞培養上清による中和活性は100%感染からRLUを何%減らしたかによって判定した。SARS-

C o V - 2 スパイク蛋白への結合活性を示したクローンの細胞培養上清の中和活性を測定し、50%以上の中和活性を示したクローンを中和抗体として選んだ。確認できた73クローンから6個のクローン（6-74、3-5、5-92、8-92、10-121、および9-105）が選択された。

[0144] （実施例5）調製した精製抗体を用いた中和試験

選択した各クローンから精製抗体を調製し、精製抗体を用いた中和試験を行なった。細胞培養上清からの精製抗体の調製は、常法に従って行った。精製抗体による中和試験は培養上清を用いた中和試験と同様に行ったが、各サンプル3wellで5倍階段希釈した精製抗体を用いた。抗体の $IC_{50}$ （50%阻害濃度）を計算し、中和活性の指標とした。その結果、確認できたクローンから以下の4つのクローンにおいて強い中和活性が確認された。

[0145] 以上の結合試験および中和試験の結果より、RBDに結合する11クローンから、中和活性が確認できたクローン中、CTMA 9-105、CSSA 10-121、CSSA 8-92、CSSA 3-5の4つの抗体は、強力な中和活性を示すことが確認できた。これらの抗スパイク蛋白抗体の重鎖・軽鎖の可変領域の塩基配列をThe international immunogenetics Information system (IMG T) にて解析し、それぞれのクローンが別個であることを確認した。強力な中和能を持つ4抗体について重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ図1および図2に示す。また、これらの4抗体は、精製抗体を用いたスパイク蛋白結合試験において、4抗体とも強力な結合活性を示したが、特にCTMA 9-105は、低濃度で強力な結合活性を示した。結果を図7に示す。さらに、4抗体の精製抗体を用いたシュードウイルス中和試験の結果を図8に示す。2種類のスパイク（武漢型S、ヨーロッパ型S<sub>D614G</sub>）のウイルスに対して、4抗体とも強力な中和活性を示した。中でもCTMA 9-105は $IC_{50}$  : 0.002-0.006  $\mu$ g/mLと驚異的に強力な活性を示した。

[0146] （実施例6）細胞融合阻止試験

図9に示すように、細胞融合活性は、GFPとルシフェラーゼタンパク質

を基にしたDSP (Dual split protein) を用い、細胞融合が起こると各細胞のDSPが結合して活性を示すことを指標にして測定した。SARS-CoV-2のスパイク蛋白とDSP8-11を発現するエフェクター細胞(東大医科研:井上教授より分与)を $3 \times 10^3$  cells/mLに調製し、 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ で96 wellプレートに撒いた。標的細胞として用いる293FT-DSP1-7-ACE2-TMPRSS2、またはCalu-3-DSP1-7(東大医科研:井上教授より分与)を $3 \times 10^3$  cells/mLに調製し、 $3 \text{ mL}/\text{well}$ で6 wellプレートに撒いた。一晚培養後、標的細胞のプレートを新しい培養液で洗浄し、ルシフェラーゼ基質を含んだ培養液を加えて2-4時間培養した。エフェクター細胞を新しい培養液で洗浄し、細胞培養上清、精製抗体などのサンプルを $50 \mu\text{L}$ 加えて1時間培養した。その後、標的細胞の懸濁液を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ で、エフェクター細胞に加えた。経時的に蛍光を測定し、RLUの上昇によって細胞融合を検出した。サンプルを含まない培地だけのRLUを100%細胞融合とし、サンプルによる細胞融合阻止活性は100%からRLUを何%減らしたかによって判定した。2種類の標的細胞を用いてSARS-CoV-2のスパイク蛋白を介した細胞融合の阻害活性を測定し結果を図10に示す。上記の4つの抗体とも強力な活性を示した。中でも9-105は低濃度で細胞融合を阻止した。

[0147] (実施例7) SARS-CoV-2変異株シュードウィルスの作成

SARS-CoV-2変異株、B. 1. 1. 7、B1. 351、P. 1、Mink cluster 5のSpike蛋白を発現する発現プラスミドは、野生型のSpike(614G)発現プラスミドを基にPCRによる変異挿入によって作成した。それぞれの変異株のSpike蛋白のアミノ酸変異を図11に示す。SARS-CoV-2変異株のSpike発現プラスミドと、レンチウイルス・パッケージング・プラスミドpsPAX2-IN/HiBiT、トランスファー・プラスミドpWPI-Luc2とを一緒に293T細胞にトランスフェクションして、2日後の上清を回収して冷凍し、シ

ュードウイルスとして使用した。

[0148] (実施例8) 中和活性の測定 (1)

スクリーニングした5つのモノクローナル抗体 (6-74、3-5、8-92、10-121、および9-105) を用い、中和活性を測定した。希釈した抗体 (100  $\mu$ L) に200 TCID<sub>50</sub> (100  $\mu$ L) のシュードウイルスを加えて1時間インキュベートし、96 well plateの293FT/DSP/ACE2/TMPRSS2細胞に加えた。2時間のインキュベート後、抗体とウイルスが混合した溶液を捨て、新しい培地を加えた。48時間のインキュベート後、ルシフェラーゼ活性を luciferase assay system (Promega) と EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer) で測定した。

測定された中和データを図12に示す。また、計算して求めたIC<sub>50</sub>の結果を図13に示す。

[0149] 上記の結果より、今回解析した変異株のうち、英国由来の変異株B. 1. 1. 7株とデンマーク由来のmink cluster 5株は、ほぼ野生型と同程度の中和感受性を示しており、モノクローナル抗体6-74、3-5など弱い中和活性の抗体に対しては抵抗性を示したが、強い中和活性を持つモノクローナル抗体9-105、120-121、8-92は、野生型と同様にそれらの変異株に対し有効であることが示された。一方、南アフリカ由来のB. 1. 351株とブラジル由来のP. 1株は中和抵抗性を獲得していたが、モノクローナル抗体9-105と10-121は両変異株を中和することができた。特に、モノクローナル抗体9-105は非常に高い中和活性を維持していた。変異株のRBD抗体に対する中和抵抗性は、RBD領域のK417N/T、E484K、N501Yの変異が大きく関わっていると考えられる。N501Yは中和抵抗性を示さなかったB. 1. 1. 7株も持っていることから、中和抵抗性への寄与は限定的であると考えられる。K417N、E484KはRBD抗体の中和逃避変異であることが報告されており、これらの変異を持つB. 1. 351株が中和抵抗性となった理由と推測さ

れる。P. 1株にはE484Kの変異を持つが、K417NではなくK417T変異である点が中和感受性維持に関与した可能性がある。

[0150] スクリーニングされた4つの中和抗体の内、強い中和活性を持つ2つの抗体（9-105と10-121）は、4つの変異株に対して有効な中和活性を示した。特にモノクローナル抗体9-105は、最も中和抵抗性を示す南アフリカ変異株（B. 1. 351）に対しても $IC_{50}$ 値が $0.021\mu\text{g}/\text{mL}$ と非常に強い中和活性を維持していた。

[0151] 図に示すように、強い中和活性を持つ2つの抗体（9-105と10-121）のSARS-CoV-2（wt）に対する中和活性（ $IC_{50}$ 値）は、それぞれ $0.0035\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.018\mu\text{g}/\text{mL}$ であったが、293F/ACE2/TMPRSS2細胞に変えて、ヒトの肺がん細胞（肺胞上皮細胞、Calu-3）および消化管粘膜上皮細胞（Caco-2）を用いて測定したところ、同様に、強い中和活性が確認できた。

[0152] [表3]

mAb	293F/ACE2 /TMPRSS2	Calu-3	Caco-2
9-105	$0.0035\mu\text{g}/\text{mL}$	$0.0019\mu\text{g}/\text{mL}$	$0.00092\mu\text{g}/\text{mL}$
10-121	$0.018\mu\text{g}/\text{mL}$	$0.12\mu\text{g}/\text{mL}$	$0.015\mu\text{g}/\text{mL}$

[0153] （実施例9）他のSARS-CoV-2ウイルス・ストックの作成

東京都健康安全研究センターで分離されたSARS-CoV-2変異株であるインド変異株（B. 1. 617. 1およびB. 1. 617. 2）をVero細胞に感染させ、3日後に細胞上清を回収してウイルス・ストックとして冷凍保存した。

[0154] （実施例10）中和活性の測定（2）

実施例9で作製したウイルス2種類（B. 1. 617. 1およびB. 1. 617. 2）を用い、インド変異株に対するモノクローナル抗体（10-121、および9-105）の中和活性をプラーク法によって測定した。デルタ株（1. 617. 2）を用いて測定された中和データ、および計算して求

めた  $IC_{50}$  ( $\mu g/ml$ ) の結果を図 14 に示す。モノクローナル抗体 10-121 および 9-105 はデルタ株 (1.617.2) を中和することができた

同様にして、インド変異株に対する中和活性を他の変異株に対する中和活性と比較した。測定された中和データ、および、計算して求めた  $IC_{50}$  の結果を図 15 および 16 に示す。モノクローナル抗体 9-105 は、いずれの変異株に対しても非常に高い中和活性をしめした。

[0155] 上記の詳細な記載は、本発明の目的および対象を単に説明するものであり、添付の特許請求の範囲を限定するものではない。添付の特許請求の範囲から離れることなしに、記載された実施態様に対しての、種々の変更および置換は、本明細書に記載された教示より当業者にとって明らかである。

#### 産業上の利用可能性

[0156] 本発明により、SARS-CoV-2 に対する抗体が提供された。本発明の抗体は、大量に作製が可能であり、コロナウイルス感染の治療薬として有用である。

## 請求の範囲

### [請求項1]

コロナウイルス（SARS-CoV-2）のスパイク蛋白に存在するリセプター結合ドメイン（Receptor Binding Domain（RBD））に結合し、かつSARS-CoV-2ウイルスを中和する能力がある、抗体またはその抗原結合断片であって、以下の重鎖CDR1～3および軽鎖CDR1～3：

（1）重鎖CDR1であって、配列番号9（GITVSSNY）の重鎖CDR1、配列番号12（GLTVSRNY）の重鎖CDR1、配列番号14（EITVSRNY）の重鎖CDR1、配列番号17（GFTVSSNY）の重鎖CDR1、配列番号9、12、14および17からなる群より選ばれる重鎖CDR1のいずれかにおいて1つまたは2つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる重鎖CDR1、ならびに、配列番号9、12、14および17からなる群より選ばれる重鎖CDR1のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ重鎖CDR1からなる群より選ばれる重鎖CDR1、

（2）重鎖CDR2であって、配列番号10（IYSGGST）の重鎖CDR2、配列番号15（IYSGGSR）の重鎖CDR2、配列番号10および15からなる群より選ばれる重鎖CDR2のいずれかにおいて1つまたは2つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる重鎖CDR2、ならびに、配列番号10および15からなる群より選ばれる重鎖CDR2のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ重鎖CDR2、からなる群より選ばれる重鎖CDR2、

（3）重鎖CDR3であって、配列番号11（ARDLEEAGMDV）の重鎖CDR3、配列番号13（ARPIVGARAGMDV）の重鎖CDR3、配列番号16（ARDKNEGAMDV）の重鎖CDR3、配列番号18（ARSYGDYFIDY）の重鎖CDR3、配列番号11、13、16および18からなる群より選ばれる重鎖CDR3のいずれかにおいて1つ、2つまたは3つのアミノ酸が欠失

・置換・付加された配列からなる重鎖CDR3、ならびに、配列番号11、13、16および18からなる群より選ばれる重鎖CDR3のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ重鎖CDR3、からなる群より選ばれる重鎖CDR3、

(4) 軽鎖CDR1であって、配列番号19 (QSVPSIY) の軽鎖CDR1、配列番号22 (QDISNY) の軽鎖CDR1、配列番号25 (QGISSY) の軽鎖CDR1、配列番号28 (QSVSSY) の軽鎖CDR1、配列番号19、22、25および28からなる群より選ばれる軽鎖CDR1のいずれかにおいて1つまたは2つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる軽鎖CDR1、ならびに、配列番号19、22、25および28からなる群より選ばれる軽鎖CDR1のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ軽鎖CDR1、からなる群より選ばれる軽鎖CDR1、

(5) 軽鎖CDR2であって、配列番号20 (GAS) の軽鎖CDR2、配列番号23 (DAS) の軽鎖CDR2、配列番号26 (AAS) の軽鎖CDR2、ならびに、配列番号20、23および26からなる群より選ばれる軽鎖CDR2のいずれかにおいて1つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる軽鎖CDR2、からなる群より選ばれる軽鎖CDR2、および

(6) 軽鎖CDR3であって、配列番号21 (QQYGSSPGT) の軽鎖CDR3、配列番号24 (QQYDNL PVT) の軽鎖CDR3、配列番号27 (QHLNSYSYT) の軽鎖CDR3、配列番号29 (QQYGSSPWWT) の軽鎖CDR3、配列番号21、24、27および29からなる群より選ばれる軽鎖CDR3のいずれかにおいて1つまたは2つのアミノ酸が欠失・置換・付加された配列からなる軽鎖CDR3、ならびに、配列番号21、24、27および29からなる群より選ばれる軽鎖CDR3のいずれかと90%以上の実質的同一性を持つ軽鎖CDR3、からなる群より選ばれる軽鎖CDR3

、  
を含む、抗体またはその抗原結合断片。

[請求項2] 前記重鎖CDR1が配列番号9、12、14および17からなる群より選ばれる重鎖CDR1のいずれかであり、前記重鎖CDR2が配列番号10および15からなる群より選ばれる重鎖CDR2のいずれかであり、前記重鎖CDR3が配列番号11、13、16および18からなる群より選ばれる重鎖CDR3のいずれかであり、前記軽鎖CDR1が配列番号19、22、25および28からなる群より選ばれる軽鎖CDR1のいずれかであり、前記軽鎖CDR2が配列番号20、23および26からなる群より選ばれる軽鎖CDR2のいずれかであり、前記軽鎖CDR3が配列番号21、24、27および29からなる群より選ばれる軽鎖CDR3のいずれかである、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項3] 前記重鎖CDR1が配列番号9の重鎖CDR1であり、前記重鎖CDR2が配列番号10の重鎖CDR2であり、前記重鎖CDR3が配列番号11の重鎖CDR3であり、前記軽鎖CDR1が配列番号19の軽鎖CDR1であり、前記軽鎖CDR2が配列番号20の軽鎖CDR2であり、前記軽鎖CDR3が配列番号21の軽鎖CDR3である、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項4] 前記重鎖CDR1が配列番号12の重鎖CDR1であり、前記重鎖CDR2が配列番号10の重鎖CDR2であり、前記重鎖CDR3が配列番号13の重鎖CDR3であり、前記軽鎖CDR1が配列番号22の軽鎖CDR1であり、前記軽鎖CDR2が配列番号23の軽鎖CDR2であり、前記軽鎖CDR3が配列番号24の軽鎖CDR3である、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項5] 前記重鎖CDR1が配列番号14の重鎖CDR1であり、前記重鎖CDR2が配列番号15の重鎖CDR2であり、前記重鎖CDR3が配列番号16の重鎖CDR3であり、前記軽鎖CDR1が配列番号2

5の軽鎖CDR1であり、前記軽鎖CDR2が配列番号26の軽鎖CDR2であり、前記軽鎖CDR3が配列番号27の軽鎖CDR3である、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項6] 前記重鎖CDR1が配列番号17の重鎖CDR1であり、前記重鎖CDR2が配列番号10の重鎖CDR2であり、前記重鎖CDR3が配列番号18の重鎖CDR3であり、前記軽鎖CDR1が配列番号28の軽鎖CDR1であり、前記軽鎖CDR2が配列番号20の軽鎖CDR2であり、前記軽鎖CDR3が配列番号29の軽鎖CDR3である、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項7] 配列番号1に記載の重鎖可変領域および配列番号5に記載の軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項8] 配列番号2に記載の重鎖可変領域および配列番号6に記載の軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項9] 配列番号3に記載の重鎖可変領域および配列番号7に記載の軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項10] 配列番号4に記載の重鎖可変領域および配列番号8に記載の軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項11] シュードウイルスを用いた中和アッセイにおいて、SARS-CoV-2ウイルスの中和における抗体活性が、約0.001 $\mu$ g/mL～約1 $\mu$ g/mL（の範囲の50%阻害濃度（IC<sub>50</sub> $\mu$ g/mL））として表される高い中和能力を有する、請求項1～10のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片。

[請求項12] B.1.1.7変異株、mink cluster 5変異株、B.1.351変異株、P.1変異株、P.3変異株、B.1.617変異株、R.1変異株、およびB.1.427/B.1.429変異株からなる群より選ばれるSARS-CoV-2変異株の少なくとも一つに対し中和活性を示す、請求項1～10のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片。

- [請求項13] K 4 1 7 T / N 変異、E 4 8 4 K 変異、N 5 0 1 Y 変異、および L 4 5 2 R 変異からなる群より選ばれる一つ以上の変異を有する S A R S - C o V - 2 変異株に対し中和活性を示す、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片。
- [請求項14] 免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、CDR-移植抗体、F a b、F a b'、F ( a b' ) 2、F d、F v、ジスルフィド結合 F v、s c F v、単ドメイン抗体、ナノボディ抗体、ダイアボディ抗体、二重特異性抗体 (bispecific antibody)、および多重特異性抗体 (multi-specific antibody) からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片。
- [請求項15] 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸。
- [請求項16] 請求項 1 5 に記載の核酸を含むベクター。
- [請求項17] 請求項 1 5 に記載の核酸または請求項 1 6 に記載のベクターを含む宿主細胞。
- [請求項18] 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片を製造するための方法であって、請求項 1 5 に記載の宿主細胞を、前記抗体またはその抗原結合断片の発現に適した条件下で培養する工程を含む、抗体またはその抗原結合断片を製造する方法。
- [請求項19] 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片、および薬理的に許容できる担体を含む医薬組成物。
- [請求項20] 請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片を含む、被験体におけるコロナウイルス感染の予防または治療のための医薬組成物。
- [請求項21] 被験体におけるコロナウイルス感染の予防または治療のための医薬組成物の製造における、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一つに記載の抗体またはその抗原結合断片の使用。

[請求項22] 　他の抗コロナウイルス薬と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項19または20に記載の医薬組成物。

[請求項23] 　前記抗コロナウイルス薬が、レムデシビル、ファビピラビル、デキサメタゾン、シクレニソニド、ナファモスタット、カモスタット、イベルメクチン、バミラニビマブ、エテセビマブ、カシリビマブ、イムデビマブ、およびHIVプロテアーゼ阻害剤から選ばれる少なくとも一つの抗コロナウイルス薬である、請求項22に記載の医薬組成物。



# SARS-CoV-2中和抗体のHeavy Chain Sequences

CTMA9-105 HC  
 <-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT-----><-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT----->  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRSLSCAASGITVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSLIYSGGSTYYA  
 -----FR3-IMGT-----<-----CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT----->  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLLEEAGGMDVWGQGTTVTVSS

CSSA10-121 HC  
 <-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT-----><-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT----->  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRSLSCAASGLTISRNYMSWVRQAPGKGLEWVSLIYSGGSTYYA  
 -----FR3-IMGT-----<-----CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT----->  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIVGARAGMDVWGQGTTVTVSS

CSSA8-92 HC  
 <-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT-----><-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT----->  
 EVQLVESGGGLIQPGGSLRSLSCAASEITISRNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSRYYA  
 -----FR3-IMGT-----<-----CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT----->  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKNEGAMDVWGQGTTVTVSS

CSSA3-5 HC  
 <-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT-----><-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT----->  
 EVQLLESVGGGLIQPGGSLRSLSCAASGFTVSSNYMNWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYA  
 -----FR3-IMGT-----<-----CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT----->  
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSYGDFIDYWGQGTTVTVSS

[2]

# SARS-CoV-2中和抗体のLight Chain Sequences

**CTMA9-105 LC**  
 <-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT--><-----FR2-IMGT-----><CDR2-IM><----->  
 DIVMTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVPSIY LAWYQQRPGQAPRLLIY GAS SRATGIP  
 -----FR3-IMGT-----<-----CDR3-IMGT--><-----FR4-IMGT----->  
 DRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSP GT FGQGTKVEIK

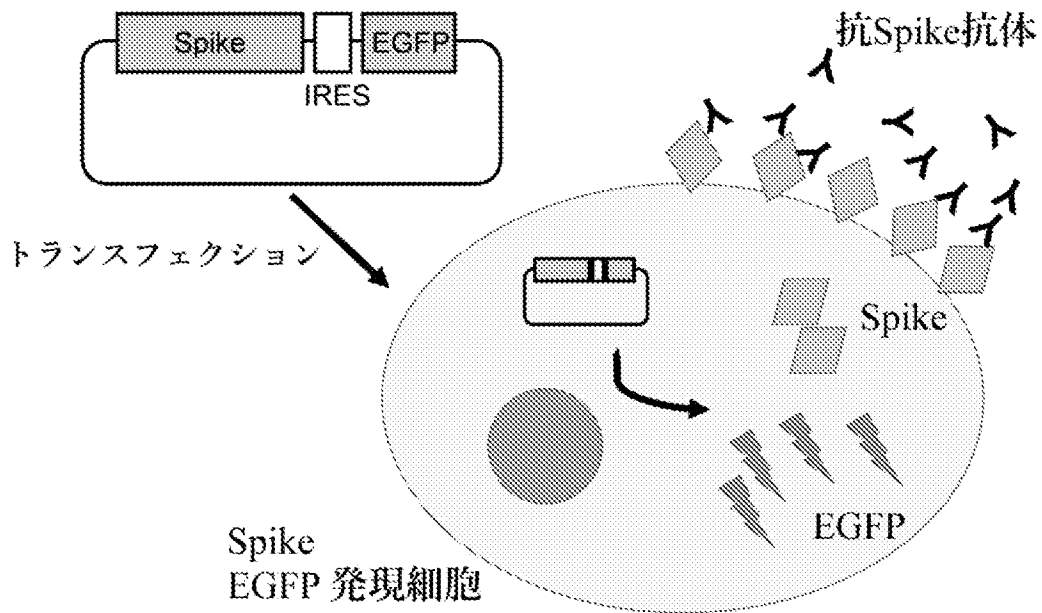
**CSSA10-121 LC**  
 <-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT--><-----FR2-IMGT-----><CDR2-IM><----->  
 DIRMTQSPSSLSASVGDRTITCQAS QDISNY LNWYQQKPKGKAPKLLIY DAS NLETGVPS  
 -----FR3-IMGT-----<-----CDR3-IMGT--><-----FR4-IMGT----->  
 RFSGSGGTDFTFTISSLPEDIATYYC QQYDNLPTV T FGQGTRLEIK

**CSSA8-92 LC**  
 <-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT--><-----FR2-IMGT-----><CDR2-IM><----->  
 DIVMTQSPSFLSASVGDRTITCQAS QGISSY LAWYQQKPKGKAPKLLIY AAS TLQSGVPS  
 -----FR3-IMGT-----<-----CDR3-IMGT--><-----FR4-IMGT----->  
 RFSGSGGTEFTLTISSLPEDFATYYC QHLNSYSY T FGQGTKLEIK

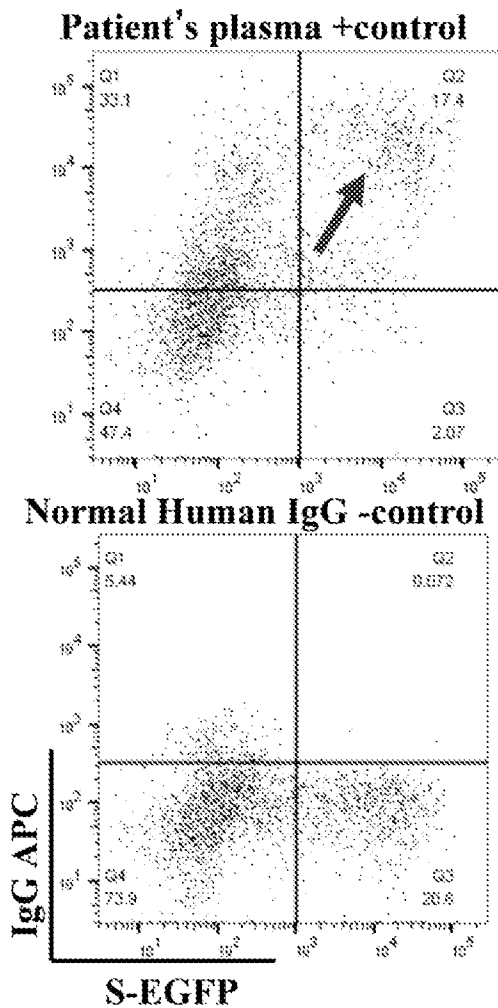
**CSSA3-5 LC**  
 <-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT--><-----FR2-IMGT-----><CDR2-IM><----->  
 DIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY GAS SRATGIP  
 -----FR3-IMGT-----<-----CDR3-IMGT--><-----FR4-IMGT----->  
 DRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSP WWT FGQGTKLEIK

[図3]

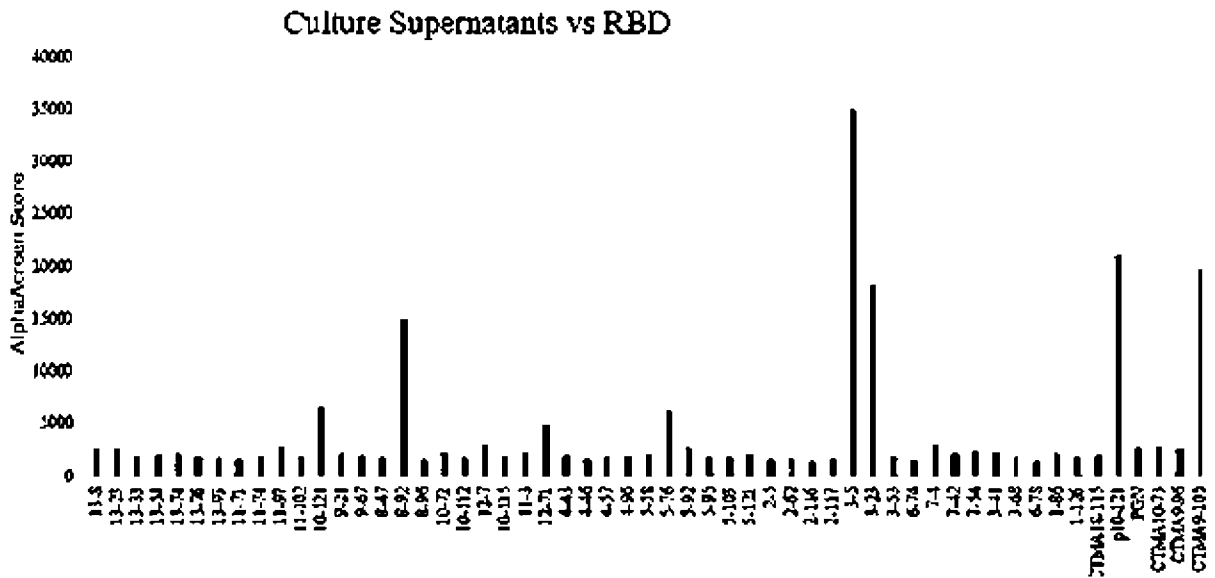
## SARS-CoV-2 Spike-IRES-EGFPプラスミド



[図4]

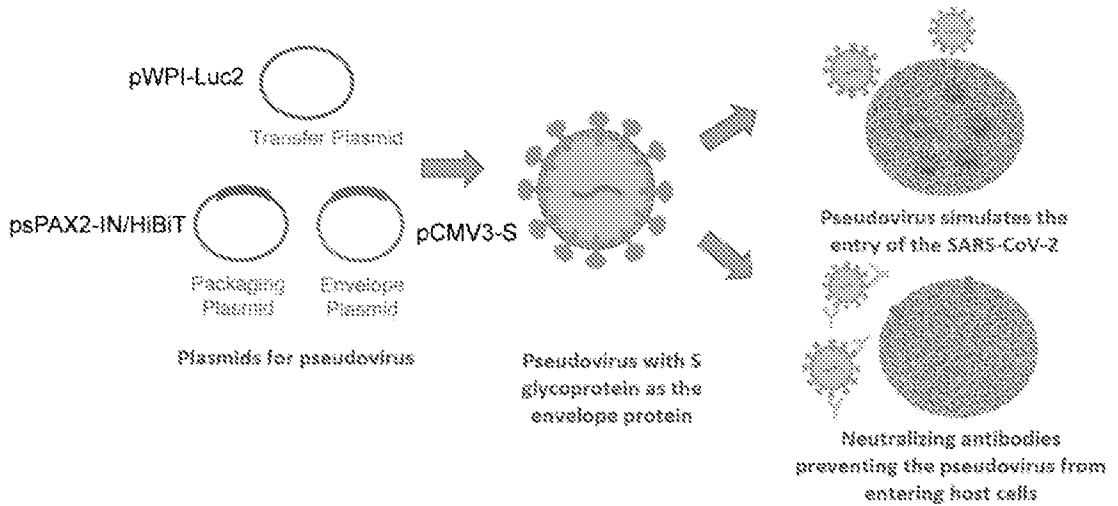


[Figure 5]



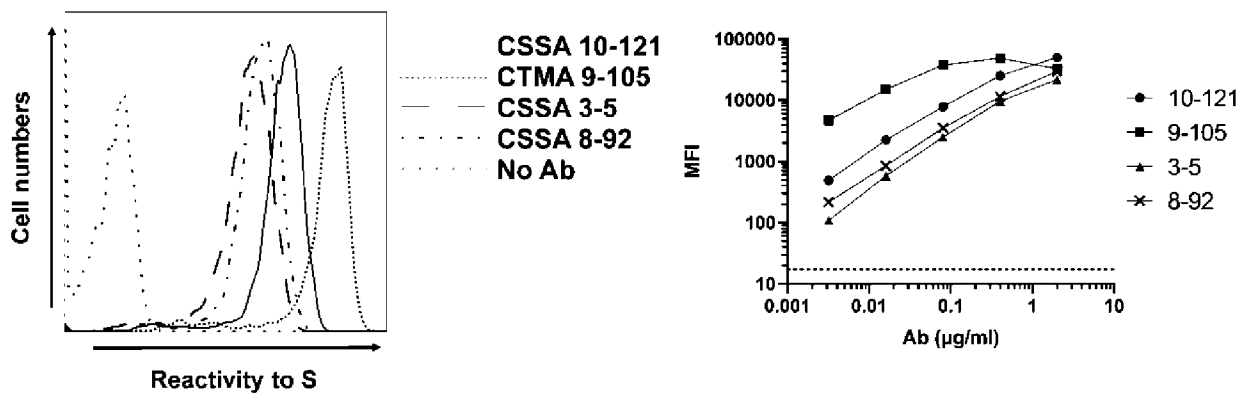
[Figure 6]

### Pseudovirus with SARS-CoV-2 S



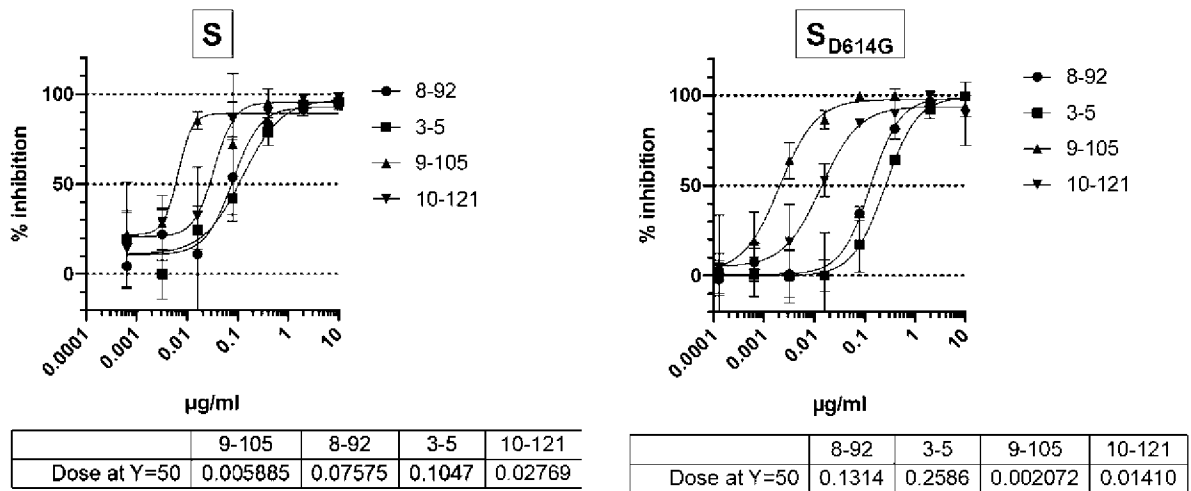
[Figure 7]

### Reactivity of mAbs to SARS-CoV-2 S protein



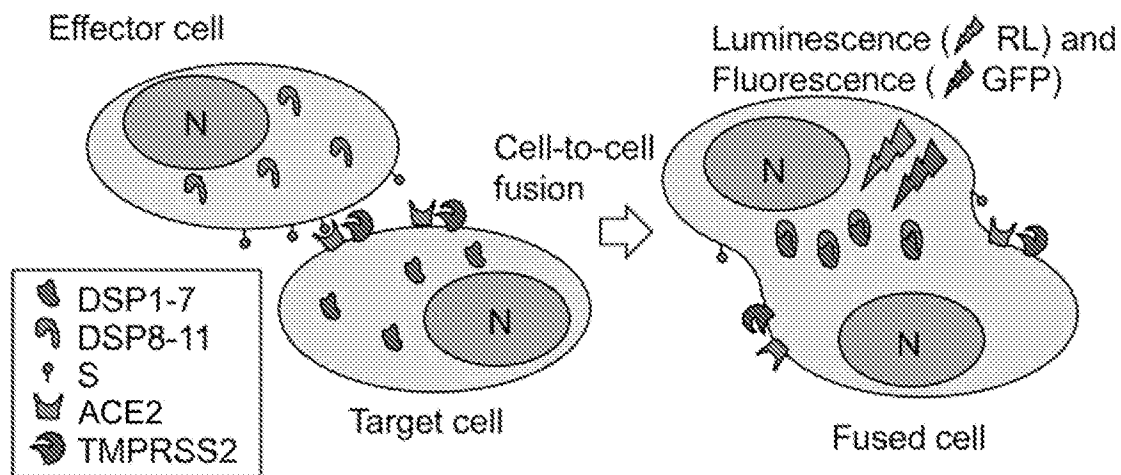
[図8]

SARS-CoV-2のSpike蛋白を表面に持つpseudovirusに対する中和活性



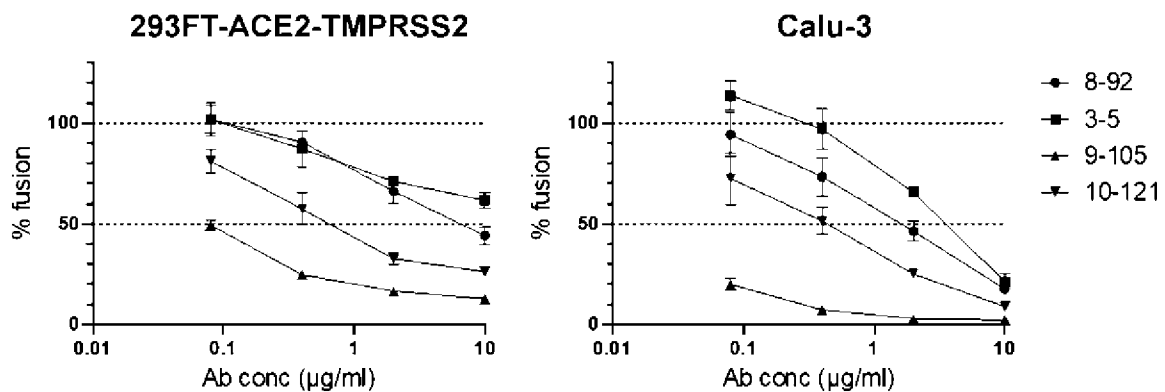
[図9]

細胞融合抑制活性の測定

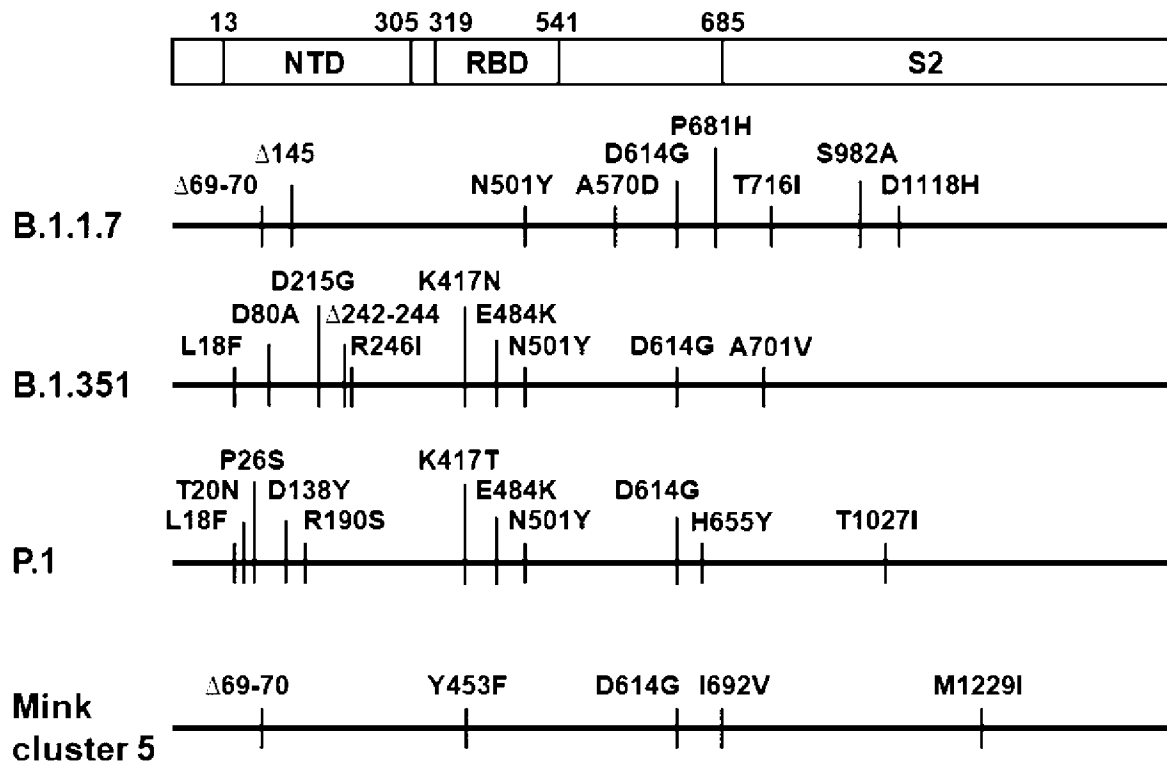


[図10]

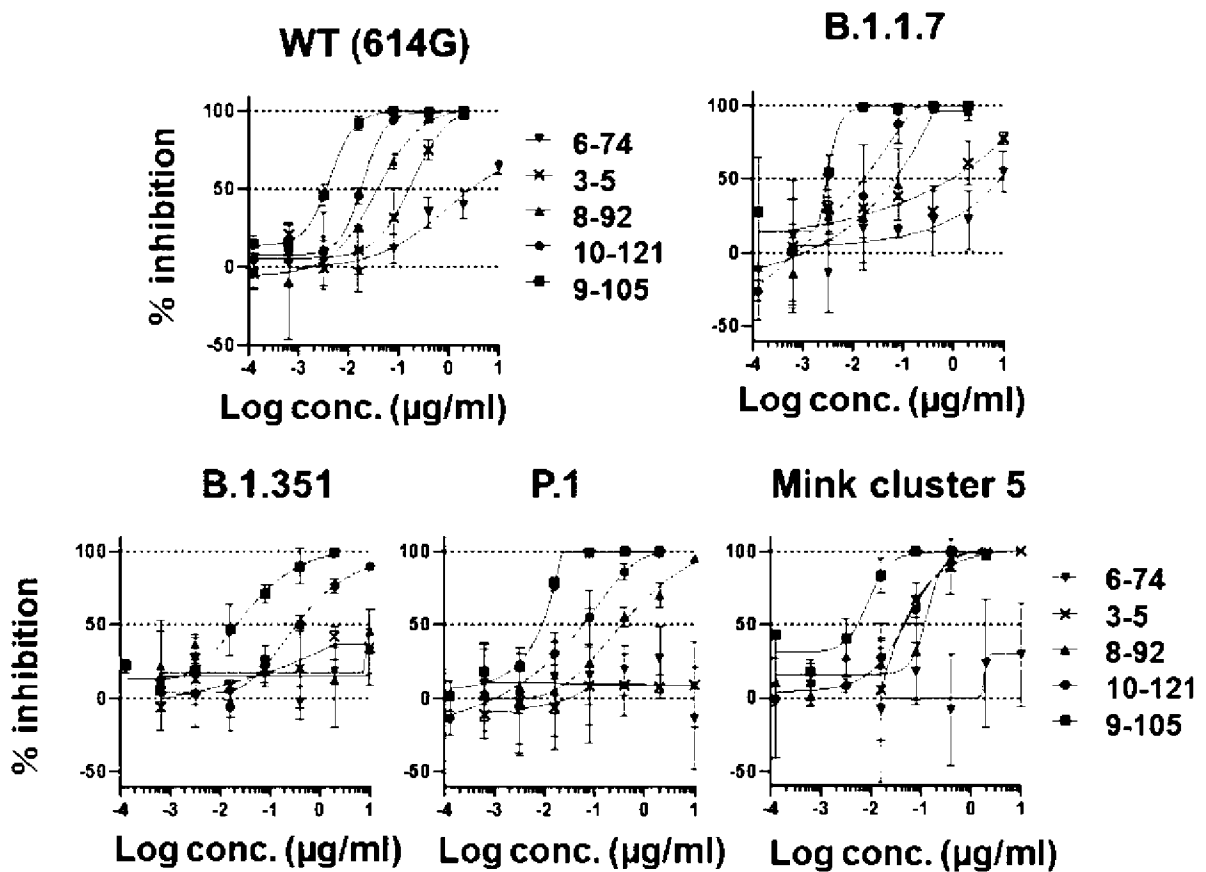
単クローン抗体によるSARS-CoV-2のSpike蛋白質を介した細胞融合の阻害



[図11]



[図12]

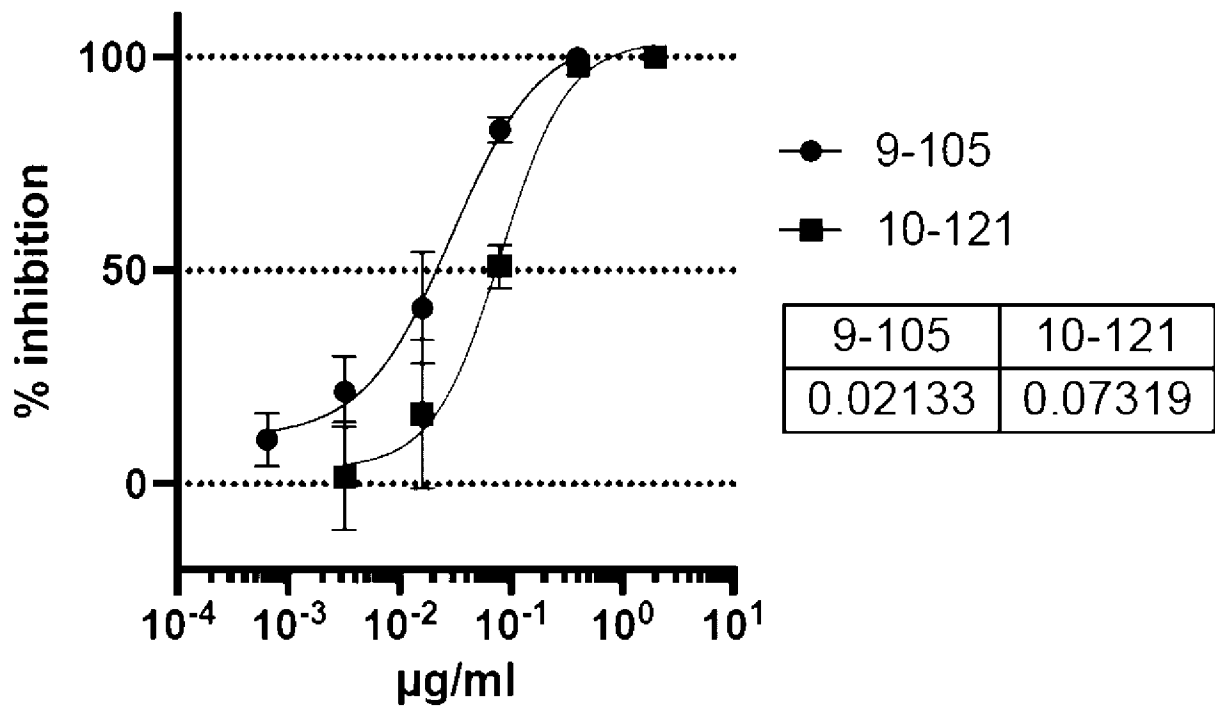


[圖13]

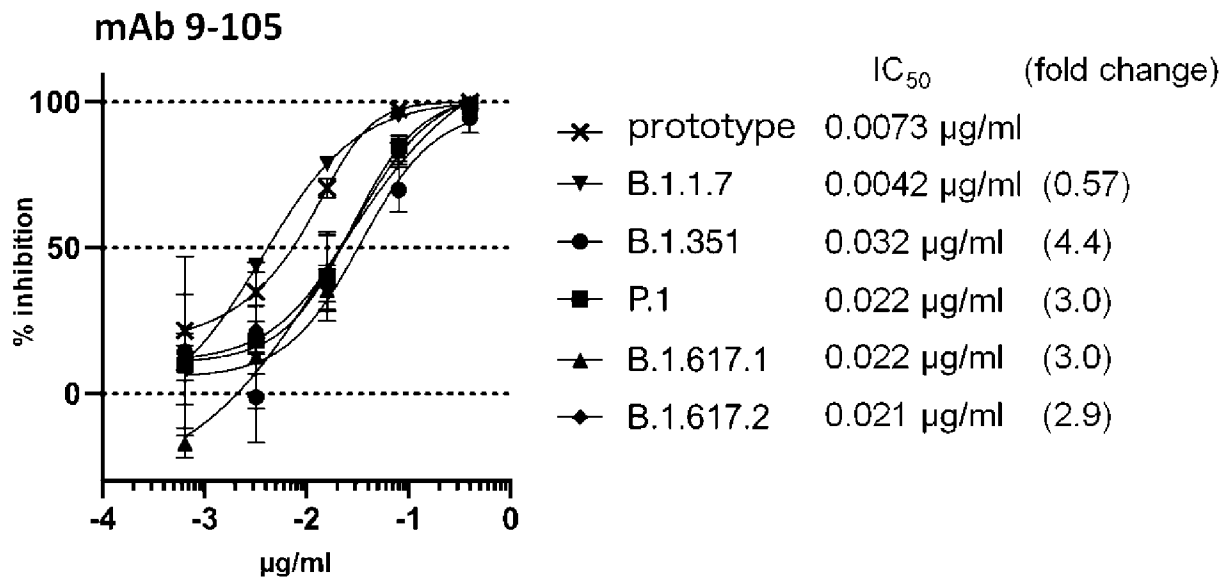
IC<sub>50</sub> (fold change) of mAbs

mAbs	patient	wt	B.1.1.7	B.1.351	P.1	cluster 5
6-74	B	2.6	8.7(3.3)	>10(>3.8)	>10(>3.8)	>10(3.7)
3-5		0.16	0.90(6.0)	>10(>63)	>10(>63)	0.044(0.28)
8-92		0.044	0.069(1.6)	>10(>230)	0.35(8.0)	0.12(2.7)
10-121		0.018	0.016(0.89)	0.34(19)	0.060(3.3)	0.047(2.6)
9-105	A	0.0035	0.0030(0.86)	0.021(6.0)	0.0090(2.6)	0.0054(1.5)

[圖14]

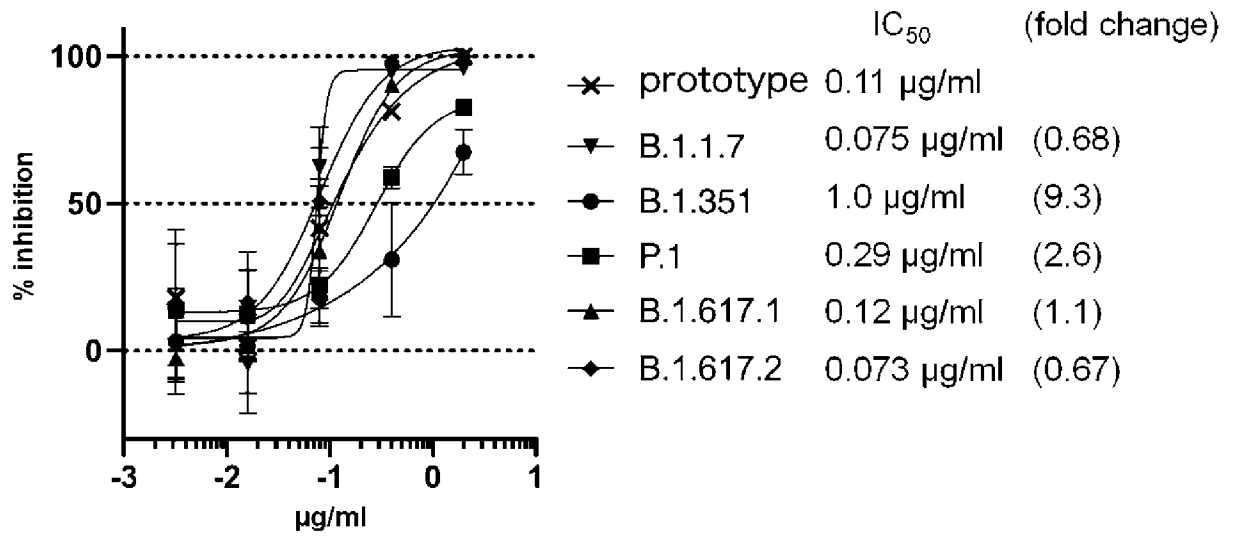


[圖15]



[圖16]

## mAb 10-121



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2021/026053

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                  Int. Cl. C07K16/10 (2006.01) i, A61K39/215 (2006.01) i, C12N15/13 (2006.01) i, C12P21/08 (2006.01) i                  FI: C07K16/10, C12N15/13, C12P21/08, A61K39/215                  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                  Int. Cl. C07K16/10, A61K39/215, C12N15/13, C12P21/08</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                  Published examined utility model applications of Japan 1922-1996                  Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021                  Registered utility model specifications of Japan 1996-2021                  Published registered utility model applications of Japan 1994-2021</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); SwissProt/GeneSeq</p>														
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">X</td> <td>LIU, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike, Nature, 20 August 2020, vol. 584, pp. 450-456 abstract, fig.2</td> <td align="center">1-23</td> </tr> <tr> <td align="center">X</td> <td>GAO, Y. et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells, Cell, 09 July 2020, vol. 182, pp. 73-84 summary, fig. 1, 5</td> <td align="center">1-23</td> </tr> <tr> <td align="center">X</td> <td>WAN, J. et al. Human-IgG-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block the SARS-CoV-2 Infection, Cell Reports, 21 July 2020, vol. 32, 107918, pp. 1-8 summary, p. 3, fig. 1, 3</td> <td align="center">1-23</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	LIU, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike, Nature, 20 August 2020, vol. 584, pp. 450-456 abstract, fig.2	1-23	X	GAO, Y. et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells, Cell, 09 July 2020, vol. 182, pp. 73-84 summary, fig. 1, 5	1-23	X	WAN, J. et al. Human-IgG-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block the SARS-CoV-2 Infection, Cell Reports, 21 July 2020, vol. 32, 107918, pp. 1-8 summary, p. 3, fig. 1, 3	1-23
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	LIU, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike, Nature, 20 August 2020, vol. 584, pp. 450-456 abstract, fig.2	1-23												
X	GAO, Y. et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells, Cell, 09 July 2020, vol. 182, pp. 73-84 summary, fig. 1, 5	1-23												
X	WAN, J. et al. Human-IgG-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block the SARS-CoV-2 Infection, Cell Reports, 21 July 2020, vol. 32, 107918, pp. 1-8 summary, p. 3, fig. 1, 3	1-23												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family												
Date of the actual completion of the international search 06.08.2021		Date of mailing of the international search report 24.08.2021												
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.												

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2021/026053

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHI, R. et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS - CoV-2, <i>Nature</i> , 06 August 2020, vol. 584, pp. 120-124 abstract, pp. 120, 121	1-23
X	JU, B. et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-Cov-2 infection, <i>Nature</i> , 06 August 2020, vol. 584, pp. 115-119, abstract, pp. 115-117, fig. 3	1-23
A	MI, T. and BURGESS, K. Striking Similarities between CDRs in Some mAbs That Neutralize COVID-19, <i>ACS Medicinal Chemistry Letters</i> , 10 August 2020, vol. 11, pp. 1663-1666, entire documents	1-23
A	WU, Y. et al. Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS - CoV-2, <i>Cell Host &amp; Microbe</i> , 10 June 2020, vol. 27, pp. 891-898, entire document	1-23
P, A	US 10787501 B1 (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.) 29 September 2020 (2020-09-29), entire text	1-23
P, A	CN 111647076 A (NANJING MEDICAL UNIVERSITY) 11 September 2020 (2020-09-11), entire text	1-23
P, A	US 10975139 B1 (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.) 13 April 2021 (2021-04-13), entire document	1-23
P, A	CN 111909261 A (CHONGQING MEDICAL UNIVERSITY) 10 November 2020 (2020-11-10), entire document	1-23
P, A	CN 112521494 A (WUHAN INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS CO., LTD.) 19 March 2021 (2021-03-19), entire document	1-23
P, A	CN 111718411 A (WUHAN INSTITUTE OF BIOLOGICAL PRODUCTS CO., LTD.) 29 September 2020 (2020-09-29), entire document	1-23

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2021/026053

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 10787501 B1	29.09.2020	WO 2021045836 A1 entire document	
		CA 3115553 A1 entire document	
CN 111647076 A	11.09.2020	(Family: none)	
US 10975139 B1	13.04.2021	CA 3115553 A1 entire document	
		WO 2021/045836 A1 entire document	
CN 111909261 A	10.11.2020	(Family: none)	
CN 112521494 A	19.03.2021	(Family: none)	
CN 111718411 A	29.09.2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 16/10(2006.01)i; A61K 39/215(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i FI: C07K16/10; C12N15/13; C12P21/08; A61K39/215		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K16/10; A61K39/215; C12N15/13; C12P21/08 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2021年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2021年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2021年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); SwissProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	LIU, L. et al., Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike, Nature, 2020.08.20, Vol.584, p.450-456 abstract, fig.2	1-23
X	CAO, Y. et al., Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells, Cell, 2020.07.09, Vol.182, p.73-84 Summary, Fig.1,5	1-23
X	WAN, J. et al., Human-IgG-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block the SARS-CoV-2 Infection, Cell Reports, 2020.07.21, Vol.32, 107918, p.1-8 SUMMARY, p.3, Fig.1, 3	1-23
X	SHI, R. et al., A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2, Nature, 2020.08.06, Vol.584, p.120-124 Abstract, p.120, 121	1-23
X	JU, B. et al., Human neutralizing antibodies elicited by SARS-Cov-2 infection, Nature, 2020.08.06, Vol.584, p.115-119 Abstract, p.115-117, Fig.3	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	06.08.2021	国際調査報告の発送日 24.08.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  中村 勇介 4B 4872  電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MI, T. and BURGESS, K., Striking Similarities between CDRs in Some mAbs That Neutralize COVID-19, ACS Medicinal Chemistry Letters, 2020.08.10, Vol.11, p.1663-1666 Whole documents	1-23
A	WU, Y. et al., Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS-CoV-2, Cell Host & Microbe, 2020.06.10, Vol.27, p.891-898 Whole document	1-23
P, A	US 10787501 B1 (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.,) 29.09.2020 (2020 - 09 - 29) 全文	1-23
P, A	CN 111647076 A (UNIV NANJING MEDICAL) 11.09.2020 (2020 - 09 - 11) 全文	1-23
P, A	US 10975139 B1 (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.,) 13.04.2021 (2021 - 04 - 13) Whole document	1-23
P, A	CN 111909261 A (UNIV CHONGQING MEDICAL) 10.11.2020 (2020 - 11 - 10) Whole document	1-23
P, A	CN 112521494 A (WUHAN INST OF BIOLOGICAL PRODUCTS CO LTD) 19.03.2021 (2021 - 03 - 19) Whole document	1-23
P, A	CN 111718411 A (WUHAN INST OF BIOLOGICAL PRODUCTS CO LTD) 29.09.2020 (2020 - 09 - 29) Whole document	1-23

## 第 I 欄          ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
 PCT/JP2021/026053

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 10787501 B1	29.09.2020	WO 2021045836 A1 Whole document	
		CA 3115553 A1 Whole document	
-----			
CN 111647076 A	11.09.2020	(ファミリーなし)	
-----			
US 10975139 B1	13.04.2021	CA 3115553 A1 Whole document	
		WO 2021/045836 A1 Whole document	
-----			
CN 111909261 A	10.11.2020	(ファミリーなし)	
-----			
CN 112521494 A	19.03.2021	(ファミリーなし)	
-----			
CN 111718411 A	29.09.2020	(ファミリーなし)	
-----			