

(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7月28日(28.07.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/158497 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/13 (2006.01) *C12N 7/02* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *G01N 33/531* (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/001859

(22) 国際出願日: 2022年1月19日(19.01.2022)

(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 2021-008355 2021年1月22日(22.01.2021) JP

(71) 出願人: 株式会社 m A b P r o t e i n
(MABPROTEIN CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒6938501
島根県出雲市塩冶町 8 9 - 1 Shimane (JP).

(72) 発明者: 浦野 健 (URANO Takeshi); 〒6938501
島根県出雲市塩冶町 8 9 - 1 株式会社 m A
b P r o t e i n 内 Shimane (JP). 成相 裕子
(NARIAI Yuko); 〒6938501 島根県出雲市塩冶
町 8 9 - 1 国立大学法人島根大学内 Shimane
(JP). 森田 公一 (MORITA Kouichi); 〒8528521
長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人
長崎大学知的財産室内 Nagasaki (JP).

(74) 代理人: 白形 由美子 (SHIRAKATA Yumiko);
〒1410031 東京都品川区西五反田 1 丁目
1 1 番 1 号 アイオス五反田駅前ビル
1 0 0 1 号 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,
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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

(54) Title: ANTIBODY AGAINST SPIKE PROTEIN OF SARS-CoV-2

(54) 発明の名称: SARS-CoV-2スパイクタンパク質に対する抗体

(57) Abstract: In this invention, a hybridoma is prepared using, as the antigen, a protein with its secretion signal added to the receptor-binding domain (RBD, positions 319-589) of SARS-CoV-2 spike protein and G196 tag sequence (DLVPR) with His₆ sequence (HHHHHH) fused to the C terminus, to obtain a plurality of monoclonal antibodies that recognizes the three-dimensional structure of the RBD. The obtained monoclonal antibodies have a high neutralization activity against the virus, and can be used for a pharmaceutical composition, a test reagent, and a virus removing material. Furthermore, since antibodies having different binding ability against various variants are obtained, the antibodies can also be used for identifying the variants.

(57) 要約: SARS-CoV-2スパイクタンパク質の受容体結合ドメイン (RBD、319-589位) に自身の分泌シグナルを付加し、C末端にG196タグ配列 (DLVPR) およびHis₆配列 (HHHHHH) を融合したタンパク質を抗原としてハイブリドーマを作製し、RBDの立体構造を認識する複数のモノクローナル抗体を得た。得られたモノクローナル抗体は、ウイルスに対して高い中和活性を備え、医薬組成物、検査試薬、ウイルス除去材に使用することができる。さらに、種々の変異株に対して結合能力の異なる抗体が得られていることから、変異株の特定にも使用することができる。

WO 2022/158497 A1

明 細 書

発明の名称：

SARS-CoV-2スパイクタンパク質に対する抗体

技術分野

[0001] SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合する抗体に関する。特に、スパイクタンパク質が、受容体であるアンジオテンシン変換酵素（angiotensin converting enzyme-2：ACE2）に結合する領域に結合し、中和活性を有する抗体及びその抗原結合断片に関する。さらに、抗体又はその抗原結合断片を用いてコロナウイルス感染を防止し、検査及び処置する方法に関する。

背景技術

[0002] 新しく同定されたウイルスによる新興感染症は、ウイルスや症状が十分に明らかにされていないことから診断および治療が困難であることが多い。新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）が引き起こす感染症COVID-19についても、中国武漢でのアウトブレイクから、瞬く間にパンデミックへと拡大した。WHOが2020年3月11日にパンデミックに至っているとの認識を示した際には、累積感染者数11万8381人、累積死者数4292人であったが、2020年12月末には、感染者数は約8510万人、死者は約184万人、2021年12月末には約2億7900万人、死者は約540万人に上っている。診断キット、治療薬、予防薬の開発と普及によるパンデミックの終息は、喫緊の課題である。

[0003] SARS-CoV-2は、ウイルス粒子表面のスパイクタンパク質がヒト細胞表面のACE2をウイルス受容体として結合し、細胞内に侵入し細胞を破壊することにより、発熱、空咳、倦怠感などの症状を引き起こし、重篤な場合には肺炎を引き起こし死亡する場合もある。また、回復した場合でも一定頻度で後遺症が生じ、その後の社会活動にも多くの制約が加わることが報告されている。

[0004] COVID-19に対しては、デキサメタゾン、ファビピラビル（商品名アビガン）、レムデシビル（商品名ベルクリー）など、いくつかの薬剤が使用されているが、いわゆる特効薬はない。すでに、数種類のワクチンが開発され、2021年1月現在、イギリスをはじめとする欧州、アメリカ、カナダ、中国、ロシアなどではワクチンの接種が開始されている。しかしながら、次々と感染力や症状の異なる変異株が生じており、変異株に対するワクチンの有効性が懸念されている。さらに、ワクチン接種が開始され、ワクチン接種率が上がったとしても、集団免疫を獲得するには時間がかかること、ワクチン接種後の時間経過に伴いワクチンの効果が低下することから、新型コロナウイルス感染症の終息までには数年かかると言われている。

[0005] SARS-CoV-2 感染症の拡大を防止し、いち早く終息に導くためには、早期診断を行うキット、さらに治療する医薬の開発が必須である。中和抗体は感染初期に投与することで、重症化を防止することが可能であるだけでなく、重症化した患者に対しても、抗サイトカイン抗体などと併用して投与することにより治療効果が期待されている。さらに、感染前に投与することでワクチンのように感染を予防する効果も期待することができる。有効な低分子医薬の開発までの間、感染者を治療するためには中和抗体が効果的であると考えられる。さらに、中和抗体は、ウイルスを検出するための検査薬、ウイルスを除去するための吸着材として利用することができる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：米国特許第10822379号明細書

特許文献2：米国特許第10787501号明細書

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Starr, T. N., et al., 2020, Cell, Vol.182, pp.1295-1310

非特許文献2：Oude Munnink, B.B., et al., 2021, Science, Vol.371, pp.172-177

非特許文献3：Mallapaty, S. 2020, Nature, Vol.587, pp.340-341

非特許文献4: Hayashi T. et al., bioRxiv preprint 2020.11.27.401893v1, full, <https://doi.org/10.1101/2020.11.27.401893>

非特許文献5: Arimori, T., et al., Structure, 2017, Vol.25, pp.1611-1622

非特許文献6: Hofmann, H., et al., PNAS, 2005, Vol.102(22), pp.7988-7993; <https://doi.org/10.1073/pnas.0409465102>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] SARS-CoV-2を中和する抗体の開発が進んでおり、すでに臨床試験が行われている抗体医薬も複数存在する（特許文献1、2）。一方でウイルスは変異が生じることが知られており、すでに多数の変異株が報告されている。その中には受容体であるACE2に対する親和性が高くなるものが存在することが知られている（非特許文献1-3）。さらに、変異体の中には、既存の中和抗体の親和性に対して影響を与え、抗体の効果を減少させる株があることも報告されている（非特許文献4）。本発明は、中和活性が高く、受容体に対する親和性の高い変異株に対しても高い結合能力を有する抗体を提供するとともに、それを用いた医薬組成物、検査薬、ウイルス吸着材を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は以下の抗体、医薬組成物、検出キット、吸着剤を含む。

(1) SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、中和活性を備えた抗体であって、重鎖可変ドメインがアミノ酸配列GFTFNTHA（配列番号44）からなるCDRH1領域、IRSKTYNYAR（配列番号45）からなるCDRH2領域、VRDLGSGYSYAMDY（配列番号46）からなるCDRH3領域を含み、軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列ESVDDFGISF（配列番号47）からなるCDRL1領域、AAS（配列番号48）からなるCDRL2領域、QQSKEVPFT（配列番号49）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイク

タンパク質抗体。

(2) SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、中和活性を備えた抗体であって、重鎖可変ドメインがアミノ酸配列GYAFSSSW（配列番号56）からなるCDRH1領域、IFPGDGD T（配列番号57）からなるCDRH2領域、ASYFDF（配列番号58）からなるCDRH3領域を含み、軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列SSVSY（配列番号59）からなるCDRL1領域、LTS（配列番号60）からなるCDRL2領域、QQWTTYPT（配列番号61）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

(3) SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、中和活性を備えた抗体であって、重鎖可変ドメインがアミノ酸配列GYSFTSYW（配列番号68）からなるCDRH1領域、IHPDSET（配列番号69）からなるCDRH2領域、ARAPAYDYTLDY（配列番号70）からなるCDRH3領域を含み、軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列ESVDDFGISF（配列番号71）からなるCDRL1領域、AAS（配列番号72）からなるCDRL2領域、QQSKEVPFT（配列番号73）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

(4) SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、中和活性を備えた抗体であって、重鎖可変ドメインがアミノ酸配列GYTFTSYW（配列番号80）からなるCDRH1領域、IDPFDDYT（配列番号81）からなるCDRH2領域、ARGGNYLTSYYYAMDY（配列番号82）からなるCDRH3領域を含み、軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列SSVSY（配列番号83）からなるCDRL1領域、DTS（配列番号84）からなるCDRL2領域、FQGS GYHMF T（配列番号85）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

(5) SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、中和活性を備えた

抗体であって、重鎖可変ドメインがアミノ酸配列GFDIKDTY（配列番号92）からなるCDRH1領域、IDPANFNT（配列番号93）からなるCDRH2領域、ADIAATAAYYSMDY（配列番号94）からなるCDRH3領域を含み、軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列QDINSY（配列番号95）からなるCDRL1領域、RAN（配列番号96）からなるCDRL2領域、LQYDELLT（配列番号97）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

（6）H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号24であり、L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号26であることを特徴とする（1）記載の抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

（7）H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号28であり、L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号30であることを特徴とする（2）記載の抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

（8）H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号32であり、L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号34であることを特徴とする（3）記載の抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

（9）H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号36であり、L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号38であることを特徴とする（4）記載の抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

（10）H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号40であり、L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号42であることを特徴とする（5）記載の抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

（11）（1）～（5）のいずれか1つ記載のCDR配列、又は（6）～（10）いずれか1つ記載の可変領域をコードする遺伝子をオープンリーディングフレームとして含む遺伝子。

（12）（1）～（10）いずれか1つ記載の抗体の抗原結合断片。

（13）前記抗体がヒト化抗体、又はヒト抗体であることを特徴とする（1

）～（５）いずれか１つ記載のＣＤＲ配列、又は（６）～（１０）いずれか１つ記載の可変領域を備えている抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質抗体。

（１４）（１３）記載の抗体、又は（１２）記載の抗体の抗原結合断片の少なくとも１つ以上を有効成分として含むことを特徴とする医薬組成物。

（１５）（１）～（１０）いずれか１つ記載の抗体、又は（１２）記載の抗体の抗原結合断片の少なくとも１つ以上を含むＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２を検出、及び／又は定量するためのキット。

（１６）前記キットがイムノクロマトグラフィー用テストストリップ又はＥＬＩＳＡであることを特徴とする（１５）記載のキット。

（１７）（１）～（１０）いずれか１つ記載の抗体、又は（１２）記載の抗体の抗原結合断片を少なくとも１つ以上を固相化したことを特徴とするＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２吸着剤。

（１８）（１）～（１０）いずれか１つ記載の抗体として、低分子化抗体を用いることを特徴とする（１７）記載の吸着剤。

（１９）（１７）又は（１８）記載の吸着剤を備えた衛生材、フィルター、又は担体。

（２０）対象がＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に感染しているか検査する方法であって、対象から試料を採取し、（１）～（１０）少なくとも１つ以上の抗体を用い、試料中のタンパク質に対する抗体の反応性を検出することを特徴とする検査方法。

（２１）ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に感染している対象の治療方法であって、（１４）記載の医薬組成物を投与することを特徴とする治療方法。

（２２）対象を（２０）の検査方法によって検査を行い、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染陽性の場合には、治療を行うことを特徴とする（２１）記載の治療方法。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]免疫沈降法による抗体の選別法の例を示す図。

[図2]ウエスタンブロット法により抗体を評価した結果を示す図。

[図3]免疫沈降法により抗体を評価した結果を示す図。得られたモノクローナル抗体が抗原であるSARS-CoV-2のスパイクタンパク質の立体構造を認識していることを示す。

[図4]免疫沈降法により抗体を評価した結果を示す図。得られたモノクローナル抗体が、スパイクタンパク質Y453F変異体を認識することを示す図。

[図5]免疫沈降法により種々の変異株に対する抗体の結合性を評価した図。左図は、各変異株においてスパイクタンパク質に変異が生じている箇所を模式的に示している。右は免疫沈降法による解析結果を示す図。

[図6]ELISAにより抗体を評価した結果を示す図。

[図7]ウイルス中和活性によるモノクローナル抗体の評価結果の一例を示す図。

[図8]競合ELISAアッセイによるモノクローナル抗体の評価を示す図。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明で抗体とは、以下に示すSARS-CoV-2のスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン (Receptor Binding Domain; RBD) に特異的に結合するモノクローナル抗体、又は誘導体をいう。また、元の抗体と実質的に同じ抗原特異性を示す当該抗体の抗原結合断片をも含むものとする。抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、単鎖抗体 (scFv)、ジスルフィド安定化V領域断片 (dsFv)、低分子化抗体 (Fv-clasp、非特許文献5) もしくはCDRを含むペプチドなど抗体がその機能を発揮するために必要な配列を備えた領域をいう。

[0012] また、以下の実施例で示すRBDに特異的に結合するモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を利用してヒト型キメラ抗体、ヒト化CDR移植抗体などとしたヒト化抗体、遺伝子改変マウスを用いたヒト抗体も本発明の抗体に含まれる。ヒト化抗体、ヒト抗体は、ヒトに投与した場合、ヒト以外の動物の抗体に比べ副作用が少なく、その治療効果が長時間持続する。また、医薬組成物として使用する場合には、抗体の半減期を調節する技術やADCC活

性を増強する技術などにより、抗体医薬の効果を高めた改変した抗体も含まれる。

[0013] また、以下に示すようにRBDに結合する複数の抗体がすでに得られている。これら抗体を組み合わせる使用することにより、その効果を補完することができる。SARS-CoV-2は多くの変異株がすでに存在することが知られている。上述のようにRBDに変異を生じているものも存在し、既存の抗体に対して影響を与える変異も報告されている。複数の抗体を組み合わせる使用することにより、医薬組成物、検出試薬としての効果を損なうリスクを最小にすることができる。

[0014] 「エピトープ」とは、抗体によって認識される抗原（ここでは、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質のRBDをいう。）の一部をいい、本明細書において開示される抗体可変領域を含むドメインが結合する抗原上の部位を意味する。通常、ポリペプチドを抗原とする場合には、抗体は直線的なアミノ酸配列を認識する場合も、3次元構造を認識する場合もあるから、エピトープは、アミノ酸配列や抗原の構造によって定義することができる。後述するように、ここでは中和活性を有する抗体を得る目的のため、主として3次元構造を認識する抗体を選択して得ている。

[0015] 本明細書において「キット」とは、以下の実施例で示すELISA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降に限らず、本明細書で開示する抗体を用いてSARS-CoV-2を検出、定量、あるいは、その感染性を評価する目的のために、必要な試薬、器具などを構成要素とするパッケージングされた組み合わせをいう。特に、本明細書で開示する抗体を固定化したイムノクロマトグラフィー用テストストリップと、唾液、鼻咽頭拭い液等の検体から抗原を抽出する抽出液等を含み、感染を迅速に検査することができる検査キットをいう。また、後述するように吸着材に固定して用いる場合には、フィルターなどの吸着材の交換に必要な器具等を構成要素とするパッケージングされた組み合わせをいう。

[0016] 本明細書で検査とは、対象の試料中のSARS-CoV-2の存在を検出

することをいう。特に、被験者試料中にSARS-CoV-2が存在するか検出することをいう。さらに、検出された変異株を推定することをいう。試料としては、唾液、鼻咽頭拭い液、喀痰などSARS-CoV-2感染検査に用いられている検体を好適に使用することができる。また、これに限らずSARS-CoV-2が含まれ得る試料であれば使用することができる。

[0017] 現在新型コロナウイルスの感染確認は、主としてPCR検査によって行われている。一般に、抗体による抗原検査は、核酸を増幅して検出するPCRに比べて感度は低いと言われているが、抗原に対する親和性の高い抗体を使用すれば、高い感度で検出することが可能である。さらに、PCR検査と比較して短時間で結果を出すことが可能であり、また、特別な検査機器を必要としないことから、クリニックにおいても検査を行うことが可能となる。クリニックで感度良く検査を行うことが可能となれば、感染確認を早期に行うことが可能となり、SARS-CoV-2感染患者の早期隔離につなげることが可能となる。

[0018] 医薬組成物は、投与経路に適合するように製剤化される。投与経路は、例えば、静脈内投与、皮下投与、あるいは鼻腔、咽喉の呼吸気道内に投与するスプレー剤のような非経口投与が一般的であるがこれに限定されることはない。医薬組成物には、剤形に適した担体、賦形剤、溶媒、希釈剤など一般に当該分野で用いることのできる化合物を含むことができる。静脈注射、あるいは皮下注射による投与の場合、症状などによっても異なるが、最大で0.1 g r / k g の容量で投与することが可能である。

[0019] また、抗体を吸着材として防疫に関わる器材、資材に使用することができる。例えば、マスクなどの衛生材、エアコン、空気清浄機などのフィルターにSARS-CoV-2の中和抗体を固定することにより、SARS-CoV-2を捕捉することが可能となる。また、体外式膜型人工肺（extra corporeal membrane oxygenation; ECMO）のラインに中和抗体を固定した担体を詰めたカラムを配置すれば、ウイルスは抗体に捕捉されるので、医療従事者が安全にECMOを取り扱うこと

ができる。抗体を吸着材として使用する場合には、低分子で安定していることから低分子化抗体（Fv-C l a s p）を好適に使用することができる。

[0020] マスク、ガーゼ、手袋、サージカルテープ、エプロン、ベッドパッド、布団カバー、シーツ、防護服などの衛生材、フィルター、カラムなどの担体への抗体の固定は通常この分野で用いられている方法を使用することができる。例えば、担体を γ -アミノプロピルトリエトキシシランなどを用いてシラン化した後、グルタルアルデヒドなどで担体表面にアルデヒド基を導入し、アルデヒド基と抗体とを共有結合させる方法、未処理の担体を抗体の水溶液中に浸漬してイオン結合により抗体を担体に固定する方法、特定の官能基を有する担体にアルデヒド基を導入し、アルデヒド基と抗体とを共有結合させる方法、特定の官能基を有する担体に抗体をイオン結合させる方法、特定の官能基を有するポリマーで担体をコーティングしたのちにアルデヒド基を導入し、アルデヒド基と抗体とを共有結合させる方法を挙げることができる。さらに、低分子化抗体を使用する場合には、C末端に活性エステルを有する担体との共有結合形成を可能とするリジン、アルギニンなどのアミノ酸や、マレイミド基を有する担体との共有結合形成を可能とするSH基を有するシステインを人工的に付加し、容易に担体へ結合するようにデザインすることができる。

実施例

[0021] [ハイブリドーマの樹立]

SARS-CoV-2スパイクタンパク質（UniProt P0DTC2）のRBD（319-589位、271アミノ酸、配列番号1）に自身の分泌シグナルを付加し、C末端にG196タグ配列（DLVPR、配列番号2）およびHis₆配列（HHHHHH、配列番号3）を融合した人工遺伝子を合成し、発現ベクターに組み込み（以下、この発現ベクターをスパイクタンパク質RBD発現ベクターという。）、動物細胞を用いて分泌タンパク質として発現させ、Ni-NTAアガロース（QIAGEN）を用いて精製した。精製したタンパク質（以下、精製タンパク質という。）を常法に従いマウ

スに免疫し、精製タンパク質を用いたE L I S A法により下記ハイブリドーマを選別樹立した。I s o S t r i pマウスモノクローナル抗体アイソタイプピングキット（S i g m a）を用いて、ハイブリドーマが産生する抗体のアイソタイプを確認した。なお、タンパク質発現のための遺伝子組換え実験、抗体の作製に関しては、島根大学及び文部科学大臣に申請し、必要な承認を受けて施行した。

[0022] [モノクローナル抗体の選別法]

上述のように、抗体の主な使用目的は、抗原であるウイルスの検出、S A R S - C o V - 2の細胞への感染阻害薬、吸着材の開発であるため、抗原の立体構造を認識し捕捉できる抗体を免疫沈降法により更に選別した。

[0023] 各抗体を用いて、常法に従って、精製タンパク質の免疫沈降を行った。免疫沈降産物はG 1 9 6 タグ配列を認識する自家製のウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法（W B）により検出した。陽性コントロールとして、免疫沈降に使用した1 0分の1量の精製タンパク質を用いた。解析結果の一例を図1に示す。I g Hはイムノグロブリン重鎖を、I g Lはイムノグロブリン軽鎖を示す。

[0024] 4 - 8 . 2、1 0 - 7 . 2、及び1 1 - 4 . 1抗体は精製タンパク質を効率よく免疫沈降した。一方、4 - 4 . 1抗体は免疫沈降できなかった。つまり、4 - 8 . 2、1 0 - 7 . 2、及び1 1 - 4 . 1抗体は精製タンパク質の立体構造を特異的に認識し捕捉し効率よく免疫沈降できるモノクローナル抗体であることが明らかとなった。免疫沈降法によるスクリーニングにより、下表のハイブリドーマ1 4種類を選別した（表1）。

[0025]

[表1]

ハイブリドーマ名	アイソタイピング	ハイブリドーマ名	アイソタイピング
1-9.2	IgG1	8-1.1	IgG2b
3-12.1	IgG1	9-4.3	IgG1
4-8.2	IgG1	10-2.1	IgG1
5-3.6	IgG1	10-5.1	IgG1
5-6.1	IgG1	10-7.2	IgG1
7-2.1	IgG1	10-8.1	IgG1
7-8.4	IgG1	11-4.1	IgG1

[0026] [ウエスタンブロッティング法によるモノクローナル抗体の評価]

ウエスタンブロッティング法により、変性したタンパク質を各抗体が認識できるかどうか評価を行った。スパイクタンパク質RBD発現ベクターを導入した動物細胞の夾雑物を含む培養上清を試料とし、1次抗体として各抗体産生細胞の培養上清を原液で使用した。上述のようにRBDタンパク質には分泌シグナルが付加されていることから、培養上清に抗原であるRBDタンパク質が分泌されている。陽性コントロール抗体として、G196タグ配列モノクローナル抗体 (mAb Protein、R-G-001) を2,000倍希釈で用いた。2次抗体などすべて同一条件下で行った。Cはコントロールとして発現ベクターのみ、Sは、スパイクタンパク質RBD発現ベクターを導入した細胞培養上清を示す (図2)。

[0027] ここでは全ての結果を示しているわけではないが、14種類の抗体のうち、9-4.3抗体以外はウエスタンブロット法ではシグナルを検出できなかった。9-4.3抗体以外の13種類の抗体はタンパク質の立体構造を認識する抗体であることが判明した。9-4.3抗体はウエスタンブロット法でもタンパク質を認識できることから、直鎖状のエピトープを認識している可能性が示唆された。ただし、G196抗体と比較すると弱い認識であった。

[0028] [免疫沈降法によるモノクローナル抗体の評価 (1)]

抗原検出及びSARS-CoV-2の細胞への感染阻害薬や吸着剤を開発するためには、抗原の立体構造を認識し捕捉することが必要となる。上記

で確認したように、選択した抗体のうち13種類は立体構造を認識する抗体である。そこで、精製抗体を用いて免疫沈降法により評価した。

[0029] まず、抗体産生細胞の高密度培養により培養・精製した9種類の各精製抗体を用いて、常法に従って、精製RBDタンパク質の免疫沈降を行った（図3）。免疫沈降産物は自家製のG196タグ配列を認識するウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。陽性コントロールとして、免疫沈降に使用した5分の1量の精製RBDタンパク質を用いた。また、免疫沈降の陽性コントロール抗体として、G196タグ配列を認識するモノクローナル抗体G196を用いた。免疫沈降の陰性コントロール抗体（control mAb）として、自家製の抗B-Raf精製モノクローナル抗体を使用した。

[0030] 免疫沈降を行なった9種類の精製抗体は精製RBDタンパク質を既存のG196抗体と同等、あるいはそれ以上に効率よく免疫沈降した。一方、抗B-Raf精製モノクローナル抗体（control mAb）は免疫沈降できなかった。つまり、免疫沈降を行なった9種類の精製抗体は精製RBDタンパク質を特異的に認識し効率よく免疫沈降できることが明らかとなった。

[0031] [免疫沈降法によるモノクローナル抗体の評価（2）]

2020年10月頃からデンマーク、オランダなどでイタチ科のミンクから変異した新型コロナウイルス（スパイクタンパク質Y453F変異体）が確認され、この変異株の人への感染が確認された（非特許文献2、3）。実験的には、この変異株はヒトの受容体ACE2との結合親和性が上がることが報告されている（非特許文献1）。また、従来型のスパイクタンパク質に対して作製されたモノクローナル抗体では、スパイクタンパク質に対する親和性が落ちるとの報告もある（非特許文献4）。抗体をSARS-CoV-2の細胞への感染阻害薬として利用するためには、変異株のスパイクタンパク質RBDに対する親和性を確認する必要がある。そこで、9種類の精製抗体がY453F変異体の立体構造を認識し捕捉できるかどうかどうかを評価した。

[0032] 抗体産生細胞の高密度培養法により培養・精製した9種類の各精製抗体を用いて、常法に従って、精製タンパク質（Y453F変異体）の免疫沈降を行った。免疫沈降産物は自家製のG196タグ配列を認識するウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。陽性コントロールとして、免疫沈降に使用した5分の1量の精製タンパク質を用いた（図4）。また、免疫沈降の陽性コントロール抗体として、G196タグ配列を認識するモノクローナル抗体G196を用いた。免疫沈降の陰性コントロール抗体（control mAb）として、抗B-Raf精製モノクローナル抗体を使用した。

[0033] 4-8.2および5-3.6抗体以外の7種類の精製抗体は精製タンパク質（Y453F変異体）を既存のG196抗体と同等、あるいはそれ以上に効率よく免疫沈降した。4-8.2および5-3.6抗体の2種類の精製抗体は精製タンパク質（Y453F変異体）に対する免疫沈降の効率が若干低下していた。一方、抗B-Raf精製モノクローナル抗体（control mAb）は免疫沈降できなかった。つまり、4-8.2及び5-3.6抗体以外の7種類の精製抗体は変異型精製タンパク質（Y453F変異体）であっても、野生型と同様に、特異的に認識し効率よく免疫沈降できることが明らかとなった。

[0034] RBDに変異が生じた変異体は複数報告されている。各抗体は変異体に対して結合親和性が低下する可能性があるが、複数のモノクローナル抗体を組み合わせる使用することにより、変異株を認識する抗体が含まれる可能性が高くなる。Y453F変異体だけではなく、他の変異体に対しても複数の抗体を使用することによって中和活性の低下を回避できる可能性が高い。

[0035] [免疫沈降法によるモノクローナル抗体の評価（3）]

感染拡大に伴い、多くの変異株が生じている。WHOが伝染性、病原性等に有害な変化が生じていることから懸念される変異株（Variants of Concern、VOC）と位置付けている株に、アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株、オミクロン株の5種類、及び注目すべき変異株

(Variants of Interest、VOI)と位置付けているラムダ株、ミュー株の2種類がある。これら計7種類の変異株、及びウイルス受容体ACE2との結合が知られておりヒトに日常的に感染し風邪の原因となるコロナウイルスNL63の合計8種類のスパイクタンパク質の立体構造を抗体が認識できるか免疫沈降により評価した。高いウイルス中和活性を有する5種類の精製抗体(7-2.1、10-2.1、5-6.1、11-4.1及び10-7.2)を用い、変異株のスパイクタンパク質を認識し捕捉できるかを各ウイルスの精製RBDタンパク質の免疫沈降を行った。

[0036] 各変異株のRBDは、上記と同様に人工遺伝子を作製し、発現ベクターに組み込んだ。具体的には、各スパイクタンパク質の319位～589位の配列に、自身の分泌シグナルを付加し、C末端にG196タグ配列、およびHis₆配列を融合した人工遺伝子を合成し、発現ベクターに組み込みタンパク質を発現させた。SARS-CoV-2は、オミクロン株(配列番号4、5、偶数はアミノ酸配列、奇数は遺伝子配列である。以下同じ。)、アルファ株(配列番号6、7)、ベータ株(配列番号8、9)、ガンマ株(配列番号10、11)、デルタ株(配列番号12、13)、ラムダ株(配列番号14、15)、ミュー株(配列番号16、17)の配列を用い、コロナウイルスNL63(UniProt Q6Q1S2、非特許文献6)は、481位～677位までのアミノ酸配列(配列番号18、19)を用いて、発現ベクターに組み込み、RBDタンパク質を精製した。

[0037] 免疫沈降産物は自家製のG196タグ配列を認識するウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により検出した。ウエスタンブロット法の陽性コントロールとして、免疫沈降に使用した10分の1量の精製タンパク質を用いた(図5)。

[0038] 評価した5つの抗体はいずれもNL63のRBDには結合せず、SARS-CoV-2配列に特異的に反応した。抗体7-2.1は、従来株の精製RBDタンパク質は免疫沈降できたが、NL63のスパイクタンパク質の精製RBDタンパク質を含めて他のすべての精製RBDタンパク質を免疫沈降で

きなかった。抗体10-2.1及び10-7.2は、オミクロン株の精製RBDタンパク質を含め、検討したすべての新型コロナウイルスの各種精製RBDタンパク質を免疫沈降することができた。しかし、NL63のスパイクタンパク質の精製RBDタンパク質は免疫沈降できなかった。つまり、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質を特異的に認識していることが明らかになった。抗体5-6.1は、オミクロン株、ミュー株及びNL63以外、新型コロナウイルスの各種精製RBDタンパク質を免疫沈降できた。抗体11-4.1は、オミクロン株及びNL63以外、新型コロナウイルスの各種精製RBDタンパク質を免疫沈降できた。抗体10.2.1又は10.7.2を用いることによって、VOC、あるいはVOIと位置づけられている変異株を全て検出することができる。

[0039] [酵素結合免疫吸着法によるモノクローナル抗体の評価]

酵素結合免疫吸着法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) により、各抗体の抗体価を評価した。抗原が固定化されているSARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体測定プレート (mAb Protein、E-S-002) に、各精製抗体 (6.7 μ Mの2,000倍希釈から3倍希釈で合計8段階希釈) を添加して抗原抗体反応を行なった。洗浄後に酵素標識した抗マウスIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を添加してプレートリーダーで吸光度 (波長450nm、バックグランド波長620nm) を測定し、ターニングポイント法により抗体価を決定した。陰性コントロール抗体として、抗B-Raf精製モノクローナル抗体 (IgG1) を使用した。発色時間は、遮光して25℃、15分とし、その他すべて同一条件下で行った (図6)。評価した9種類の精製抗体のうち、5-6.1抗体は 5.4×10^4 倍、7-2.1抗体は 1.8×10^4 倍と極めて高い抗体価を示した。

[0040] [ウイルス中和活性によるモノクローナル抗体の評価]

感染阻害実験によるウイルス中和活性を測定することにより、各精製抗体

の抗体価を評価した。SARS-CoV-2 (JPN/TY-WK-521株、国立感染症研究所より入手、GenBank:LC522975.1)のVero E6細胞への感染阻害実験を封じ込めレベルP3で行なった。各精製抗体(1mg/mL)を、10倍から10,240倍までの2倍段階希釈したサンプルを用いて、ウイルスのみの感染時のプラーク数から50%減少した希釈倍率により阻害活性を評価した。阻害活性は、50% Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT₅₀)で評価を行った(図7、表2)。7-2.1ではPRNT₅₀が2,560倍という極めて高い阻害活性を示した。

[0041] [表2]

	clone number	PRNT ₅₀
anti-SARS-CoV-2 spike mAb	7-2.1	2,560
	10-2.1	640
	5-6.1	320
	11-4.1	80
	10-7.2	80
	1-9.2	40
	4-8.2	20
	10-5.1	10
	5-3.6	<10
control mAb (anti-B-Raf mAb)	6-44.2	<10

[0042] [競合ELISAアッセイによるモノクローナル抗体の評価]

競合ELISAアッセイを用いて、各抗体の抗原認識部位のオーバーラップを評価した。評価した抗体は、明らかな中和活性を示した5種類(7-2.1、10-2.1、5-6.1、11-4.1、及び10-7.2抗体)である(図8)。

[0043] SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体測定プレートに、非標識の精製抗体を各1ウェルあたり0、100、1000ng添加して抗原抗体反応を行なった。洗浄後にPeroxidase Labeling Kit（同仁化学研究所）を用いて酵素標識した各精製抗体を添加してプレートリーダーで吸光度（波長450nm、バックグランド波長620nm）を測定した。発色時間は、遮光して25℃、15分とし、その他すべて同一条件下で行った。

[0044] 最初に加えた非標識抗体によって、抗原結合部位は既に占有されており、あとで添加した標識抗体の結合部位が同一であれば結合できない。このため、最初に加えた非標識抗体の量が多いほど、結合する標識抗体の量は少なくなる。実際、図8上段に示すように、最初に加えた非標識10-2.1抗体の量が多ければ多いほど、標識した10-2.1抗体がプレートに敷かれた抗原タンパク質に結合できないため、ODが低くなっている。

[0045] 最初に加えた非標識抗体10-2.1と標識した抗体11-4.1（図8、左から2つ目）、および逆に最初に加えた非標識抗体11-4.1と標識した抗体10-2.1（図8、左から4つ目）で、最初に加えた非標識抗体の量が多いほど、標識した抗体の抗原タンパク質への結合ができないためODが低くなっている。つまり、10-2.1抗体と11-4.1抗体は抗原結合部位が同一、オーバーラップしている、あるいは異なる場所に結合して分子構造に影響するアロステリックに作用している可能性が高い。また、他の抗体の抗原結合部位はこれら抗体とは異なる領域にあると考えられる。中和活性を有し、エピトープの異なる抗体が複数存在することは、抗体を組み合わせて使用する際に有用な情報である。

[0046] [遺伝子の解析]

次に、各抗体について遺伝子解析を行った。各ハイブリドーマからRNAを抽出後、oligo-dTプライマーを用いて逆転写しcDNAを作成した。合成したcDNAを、H鎖及びL鎖のプライマーセットを用いて、ダイレクトシーケンス法により超可変領域の抗体遺伝子の配列、及びアミノ酸

配列を決定した。用いたプライマー配列は以下のとおりである。なお、下線部は制限酵素の認識サイトを示す。

[0047] H鎖プライマー

V H 1 - 1 S : 5' -ggggatcc ag gts mar ctg cag sag tcw gg-3' (配列番号 20)

s=g+c, m=a+c, r=a+g, w=a+t

I g G 2 - 1 A S : 5' -gggaattc ctt gac cag gca tcc tag agt ca-3' (配列番号 21)

L鎖プライマー

V K - 1 S : 5' -ggggatcc gay att gtg mts acm car wct mca -3 (配列番号 22)

y=c+t, m=a+c, s=g+c, r=a+g, w=a+t

C K - 2 A S : 5' -gggaattc gaa gat gga tac agt tgg tgc-3' (配列番号 23)

[0048] ハイブリドーマ 7-2. 1 抗体の H 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 24)、塩基配列 (配列番号 25)、L 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 26)、塩基配列 (配列番号 27)、ハイブリドーマ 10-2. 1 抗体の H 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 28)、塩基配列 (配列番号 29)、L 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 30)、塩基配列 (配列番号 31)、ハイブリドーマ 5-6. 1 抗体の H 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 32)、塩基配列 (配列番号 33)、L 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 34)、塩基配列 (配列番号 35)、ハイブリドーマ 11-4. 1 抗体の H 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 36)、塩基配列 (配列番号 37)、L 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 38)、塩基配列 (配列番号 39)、ハイブリドーマ 10-7. 2 抗体の H 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 40)、塩基配列 (配列番号 41)、L 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 42)、塩基配列 (配列番号 43) を決定した。なお、配列表において塩基配列からは、プライマー部分の配列は削除している。7-2. 1 抗体の L 鎖のアミノ酸配列 (配列番号 26) と 5-6. 1 抗体の L 鎖のアミノ酸配列 (配列

番号 34) は同一であったが、塩基配列 (配列番号 27、35) は一塩基異なっていた。各抗体の相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸配列、塩基配列について以下にまとめる。

[0049] [表3]

7-2. 1 抗体 CDR のアミノ酸配列

	H 鎖	配列番号		L 鎖	配列番号
CDRH1	GFTFNTHA	44	CDRL1	ESVDDFGISF	47
CDRH2	IRSKTYNYAR	45	CDRL2	AAS	48
CDRH3	VRDLGSGYSYAMDY	46	CDRL3	QQSKEVPFT	49

[0050] [表4]

7-2. 1 抗体 CDR の塩基配列

	H 鎖	配列番号		L 鎖	配列番号
CDRH1	GGATTCACCTTC AATACCCATGCC	50	CDRL1	GAAAGTGTTGAT GATTTTGGCATT AGTTTT	53
CDRH2	ATAAGAAGTAAA ACTTACAATTATG CAAGA	51	CDRL2	GCTGCATCC	54
CDRH3	GTGAGAGATCTG GGCTCGGGCTAC TCCTATGCTATGG ACTAC	52	CDRL3	CAGCAAAGTAAG GAGGTTCCATTC ACG	55

[0051] [表5]

10-2. 1 抗体 CDR のアミノ酸配列

	H 鎖	配列番号		L 鎖	配列番号
CDRH1	GYAFSSSW	56	CDRL1	SSVSY	59
CDRH2	IFPGDGD	57	CDRL2	LTS	60
CDRH3	ASYFDF	58	CDRL3	QQWTTYPYT	61

[0052]

[表6]

10-2. 1抗体CDRの塩基配列

	H鎖	配列番号		L鎖	配列番号
CDRH1	GGCTACGCATTC AGTAGTTCCTGG	62	CDRL1	TCAAGTGTAAGT TAC	65
CDRH2	ATTTTTCCTGGA GATGGTGATACT	63	CDRL2	CTCACATCC	66
CDRH3	GCAAGTTACTTC GATTC	64	CDRL3	CAGCAGTGGACT ACTTACCCGTACA CG	67

[0053] [表7]

5-6. 1抗体CDRのアミノ酸配列

	H鎖	配列番号		L鎖	配列番号
CDRH1	GYSFTSYW	68	CDRL1	ESVDDFGISF	71
CDRH2	IHPDSET	69	CDRL2	AAS	72
CDRH3	ARAPAYDYTLDY	70	CDRL3	QQSKEVPFT	73

[0054] [表8]

5-6. 1抗体CDRの塩基配列

	H鎖	配列番号		L鎖	配列番号
CDRH1	GGCTACTCCTTC ACCAGCTACTGG	74	CDRL1	GAAAGTGTTGAT GATTTTGGCATT GTTTT	77
CDRH2	ATTCATCCTTCCG ATAGTGAACT	75	CDRL2	GCTGCATCC	78
CDRH3	GCAAGAGCCCCG GCCTACGACTATA CTTTGGACTAC	76	CDRL3	AGCAAAGTAAGG AGGTTCCATT CACG	79

[0055] [表9]

11-4. 1抗体CDRのアミノ酸配列

	H鎖	配列番号		L鎖	配列番号
CDRH1	GYTFTSYW	80	CDRL1	SSVSY	83
CDRH2	IDPFDDYT	81	CDRL2	DTS	84
CDRH3	ARGGNYLTSYY YAMDY	82	CDRL3	FQSGGYHMFT	85

[0056]

[表10]

11-4. 1抗体CDRの塩基配列

	H鎖	配列番号		L鎖	配列番号
CDRH1	GGCTACACCTTC ACCAGCTACTGG	86	CDRL1	TCAAGTGTAAGT TAC	89
CDRH2	ATTGATCCTTTTG ATGACTATACA	87	CDRL2	GACACATCC	90
CDRH3	GCAAGAGGGGGT AACTACCTTACGT CATATTACTATGCT ATGGACTAT	88	CDRL3	TTTCAGGGGAGT GGGTACCACATG TTCACG	91

[0057] [表11]

10-7. 2抗体CDRのアミノ酸配列

	H鎖	配列番号		L鎖	配列番号
CDRH1	GFDIKDTY	92	CDRL1	QDINSY	95
CDRH2	IDPANFNT	93	CDRL2	RAN	96
CDRH3	ADIATAAYYYSDY	94	CDRL3	LQYDELLT	97

[0058] [表12]

10-7. 2抗体CDRの塩基配列

	H鎖	配列番号		L鎖	配列番号
CDRH1	GGCTTCGACATT AAAGACACCTAT	98	CDRL1	CAGGACATTAAT AGTTAT	101
CDRH2	ATTGATCCTGCG AATTTTAATACT	99	CDRL2	CGTGCAAAC	102
CDRH3	GCTGATATTGCT ACGGCTGCCTAT TACTATTCTATGG ACTAC	100	CDRL3	CTACAGTATGAT GAGTTGCTCAC G	103

[0059] 実施例で示したように、上記CDRを有する抗体は、感度、特異度良く SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に結合し、中和活性を有する抗体である。さらに、受容体であるヒトACE2に対する強い結合性を示すY453変異体をはじめ、WHOがVOC、VOIに分類し注意喚起を行っている変異体スパイクタンパク質に対しても、強い結合性を維持している。また、図8に示したようにエピトープが異なると考えられる抗体が得られていること

から、他の変異株に対しても対応できる可能性が高い。したがって、医薬組成物、検査薬、ウイルス吸着材として、治療、検査、予防の局面で広く使用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、
中和活性を備えた抗体であって、
重鎖可変ドメインがアミノ酸配列G F T F N T H A（配列番号44）
からなるCDRH1領域、
I R S K T Y N Y A R（配列番号45）からなるCDRH2領域、
V R D L G S G Y S Y A M D Y（配列番号46）からなるCDRH3領域を含み、
軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列E S V D D F G I S F（配列番号47）
からなるCDRL1領域、
A A S（配列番号48）からなるCDRL2領域、
Q Q S K E V P F T（配列番号49）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。
- [請求項2] SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、
中和活性を備えた抗体であって、
重鎖可変ドメインがアミノ酸配列G Y A F S S S W（配列番号56）
からなるCDRH1領域、
I F P G D G D T（配列番号57）からなるCDRH2領域、
A S Y F D F（配列番号58）からなるCDRH3領域を含み、
軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列S S V S Y（配列番号59）
からなるCDRL1領域、
L T S（配列番号60）からなるCDRL2領域、
Q Q W T T Y P Y T（配列番号61）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。
- [請求項3] SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、
中和活性を備えた抗体であって、
重鎖可変ドメインがアミノ酸配列G Y S F T S Y W（配列番号68）
からなるCDRH1領域、

I H P S D S E T（配列番号69）からなるCDRH2領域、
A R A P A Y D Y T L D Y（配列番号70）からなるCDRH3領域を含み、

軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列E S V D D F G I S F（配列番号71）からなるCDRL1領域、

A A S（配列番号72）からなるCDRL2領域、

Q Q S K E V P F T（配列番号73）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

[請求項4]

SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、

中和活性を備えた抗体であって、

重鎖可変ドメインがアミノ酸配列G Y T F T S Y W（配列番号80）からなるCDRH1領域、

I D P F D D Y T（配列番号81）からなるCDRH2領域、

A R G G N Y L T S Y Y Y A M D Y（配列番号82）からなるCDRH3領域を含み、

軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列S S V S Y（配列番号83）からなるCDRL1領域、

D T S（配列番号84）からなるCDRL2領域、

F Q G S G Y H M F T（配列番号85）からなるCDRL3領域を含むことを特徴とする抗SARS-CoV-2スパイクタンパク質抗体。

[請求項5]

SARS-CoV-2スパイクタンパク質に結合し、

中和活性を備えた抗体であって、

重鎖可変ドメインがアミノ酸配列G F D I K D T Y（配列番号92）からなるCDRH1領域、

I D P A N F N T（配列番号93）からなるCDRH2領域、

A D I A T A A Y Y Y S M D Y（配列番号94）からなるCDRH3領域を含み、

軽鎖可変ドメインがアミノ酸配列 Q D I N S Y（配列番号 95）からなる C D R L 1 領域、

R A N（配列番号 96）からなる C D R L 2 領域、

L Q Y D E L L T（配列番号 97）からなる C D R L 3 領域を含むことを特徴とする抗 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗体。

[請求項6] H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 24 であり、

L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 26 であることを特徴とする請求項 1 記載の抗 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗体。

[請求項7] H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 28 であり、

L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 30 であることを特徴とする請求項 2 記載の抗 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗体。

[請求項8] H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 32 であり、

L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 34 であることを特徴とする請求項 3 記載の抗 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗体。

[請求項9] H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 36 であり、

L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 38 であることを特徴とする請求項 4 記載の抗 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗体。

[請求項10] H鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 40 であり、

L鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 42 であることを特徴とする請求項 5 記載の抗 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗体。

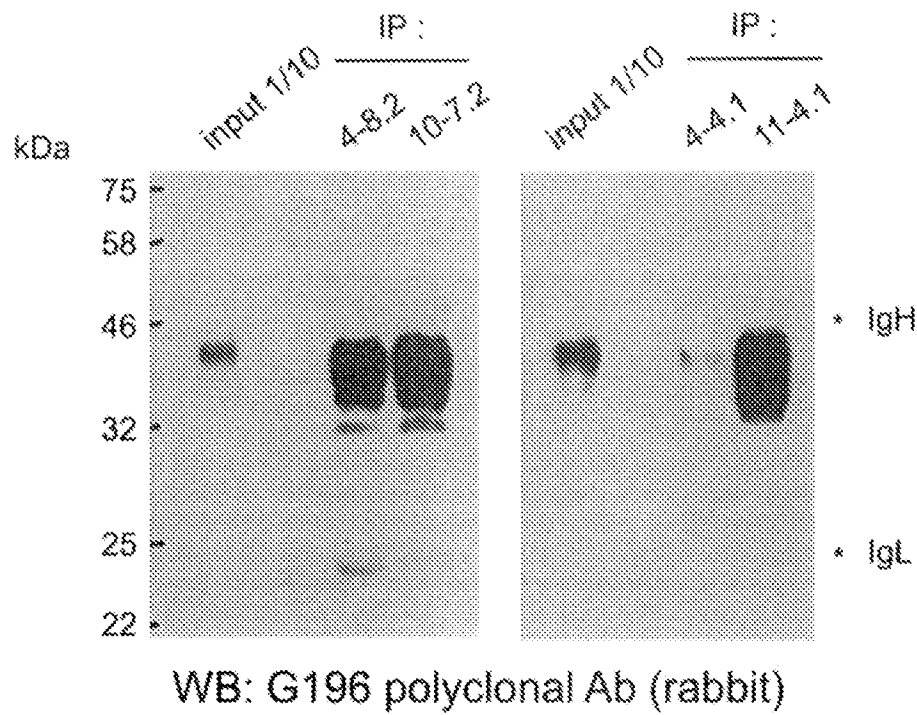
[請求項11] 請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の C D R 配列、又は請求項 6～10 のいずれか 1 項記載の可変領域をコードする遺伝子をオープンリーディングフレームとして含む遺伝子。

[請求項12] 請求項 1～10 のいずれか 1 項記載の抗体の抗原結合断片。

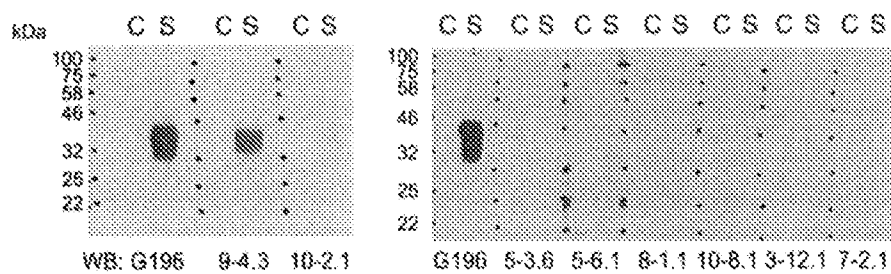
[請求項13] 前記抗体がヒト化抗体、又はヒト抗体であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の C D R 配列、又は請求項 6～10 のいずれか 1 項記載の可変領域を備えている抗 S A R S-C o V-2 スパイクタンパク質抗体。

- [請求項14] 請求項13記載の抗体、又は請求項12記載の抗体の抗原結合断片の少なくとも1つ以上を有効成分として含むことを特徴とする医薬組成物。
- [請求項15] 請求項1～10いずれか1項記載の抗体、又は請求項12記載の抗体の抗原結合断片の少なくとも1つ以上を含むSARS-CoV-2を検出、及び／又は定量するためのキット。
- [請求項16] 前記キットがイムノクロマトグラフィー用テストストリップ又はELISAであることを特徴とする請求項15記載のキット。
- [請求項17] 請求項1～10いずれか1項記載の抗体、又は請求項12記載の抗体の抗原結合断片を少なくとも1つ以上を固相化したことを特徴とするSARS-CoV-2吸着剤。
- [請求項18] 請求項1～10いずれか1項記載の抗体として、
低分子化抗体を用いることを特徴とする請求項17記載の吸着剤。
- [請求項19] 請求項17又は18記載の吸着剤を備えた衛生材、フィルター、又は担体。

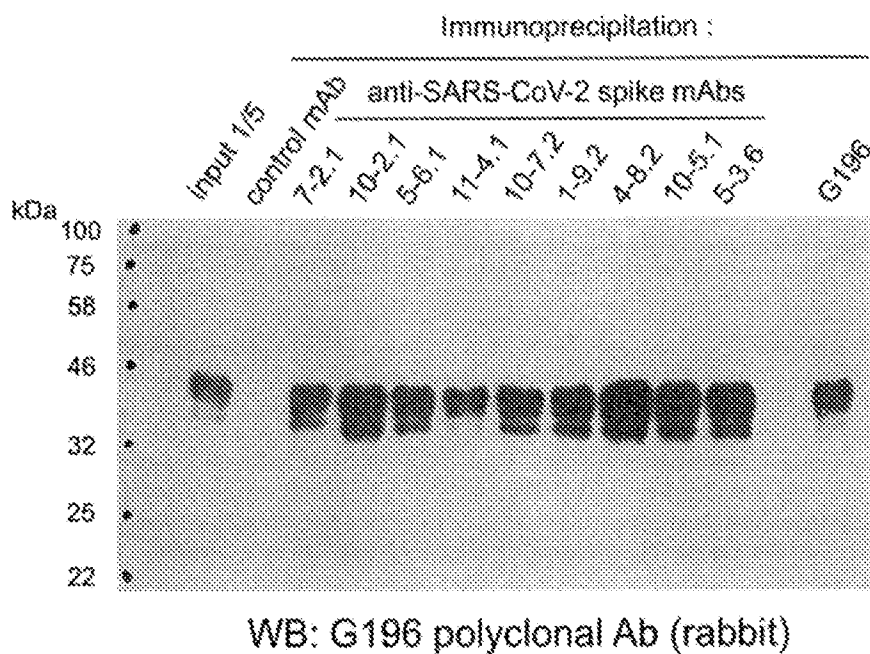
[図1]



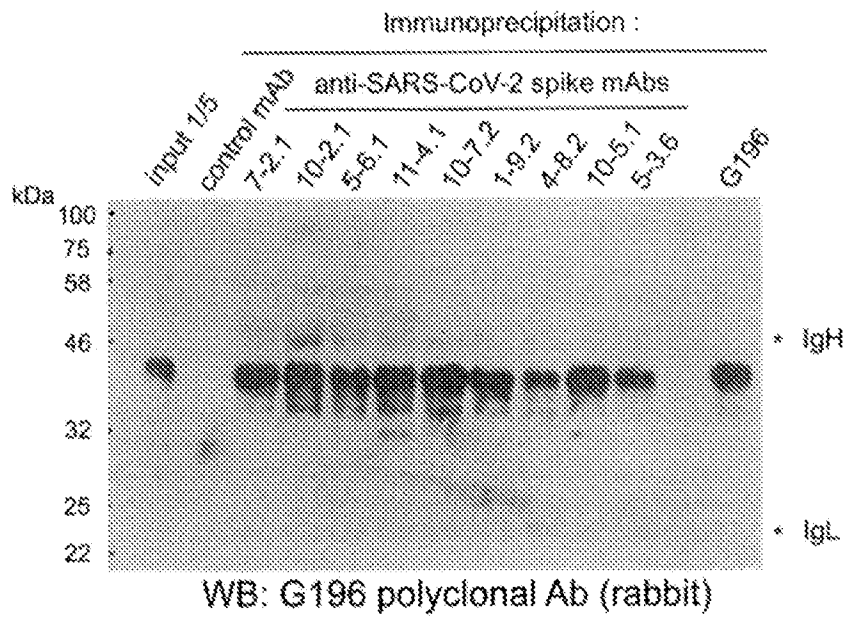
[図2]



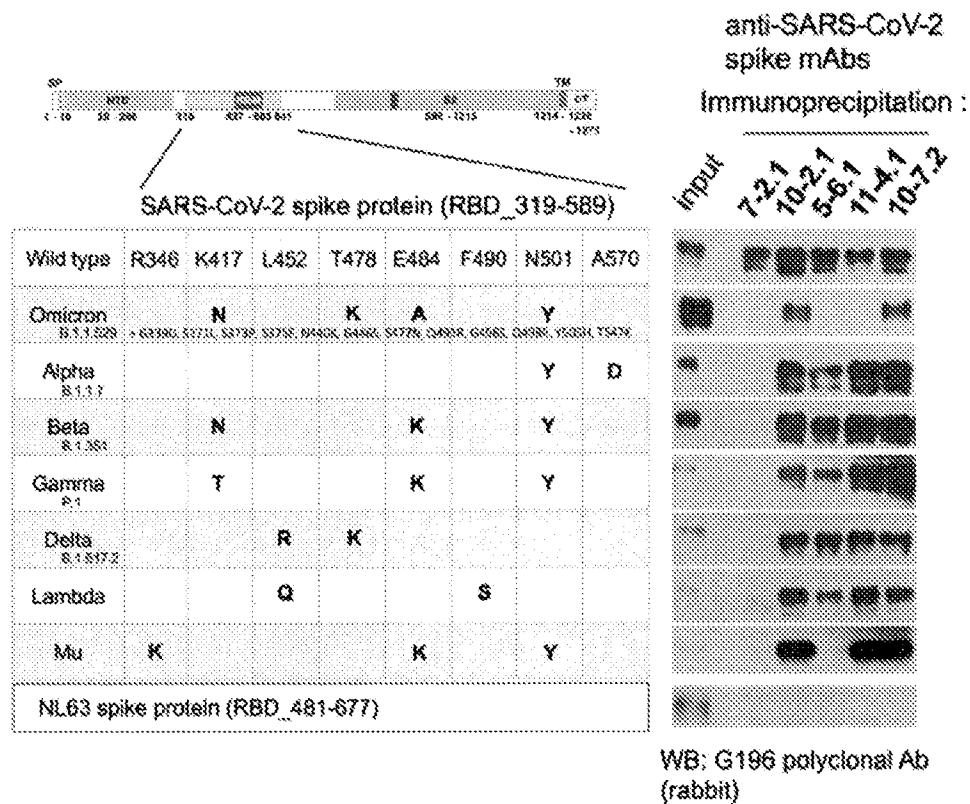
[図3]



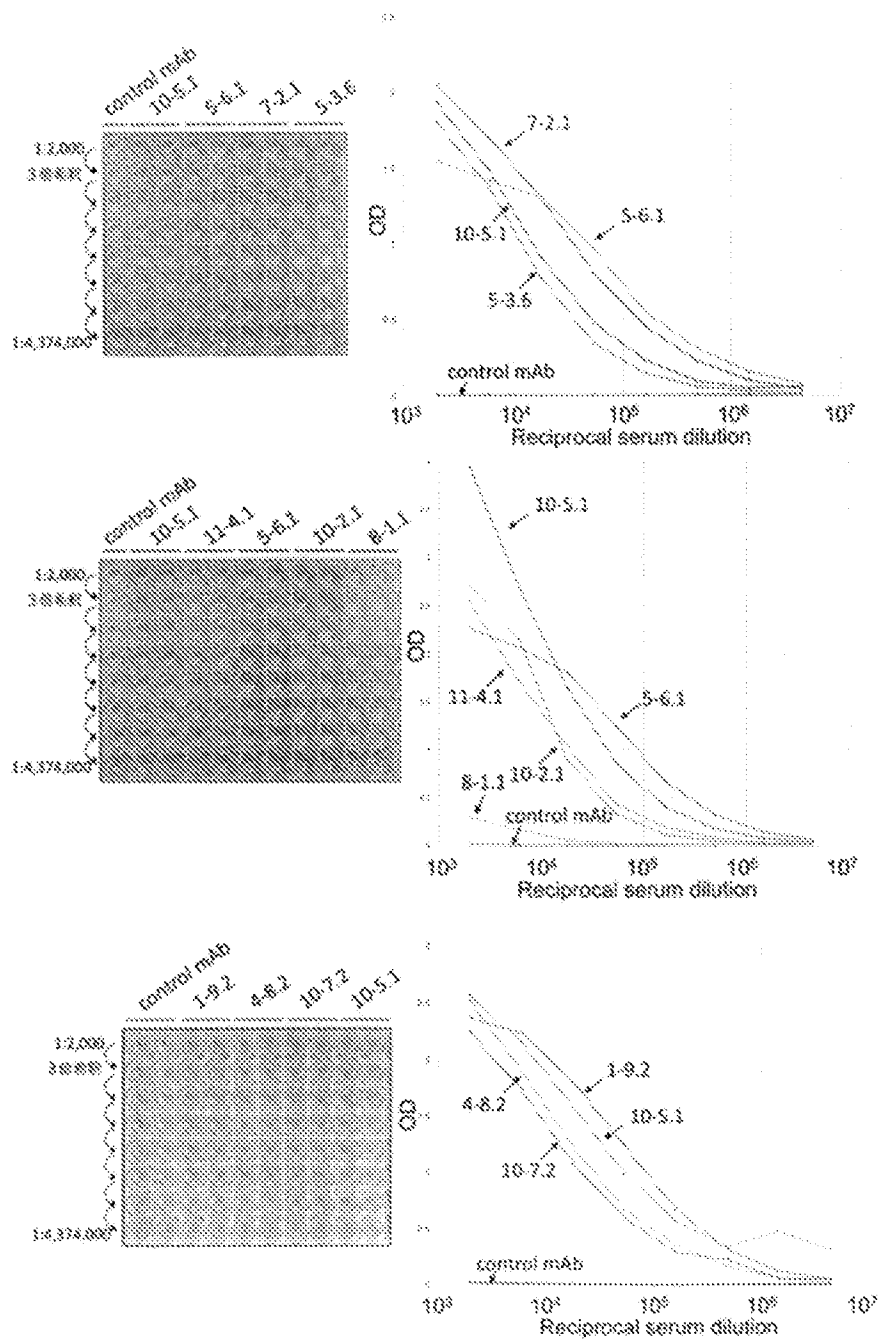
[図4]



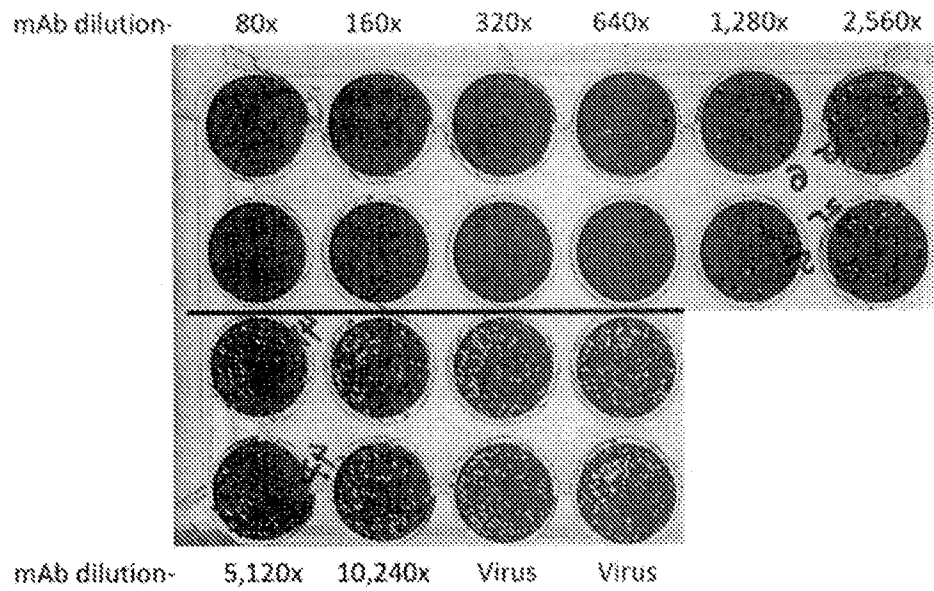
[図5]



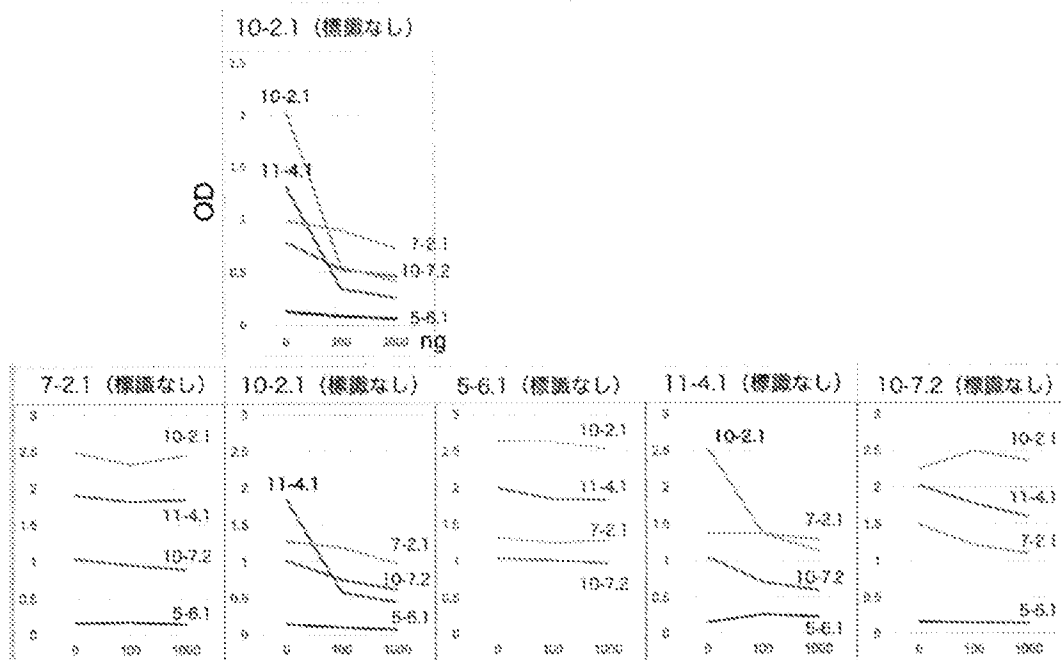
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/001859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/13(2006.01)i; **A61K 39/395**(2006.01)i; **A61P 31/14**(2006.01)i; **C07K 16/10**(2006.01)i; **C07K 17/00**(2006.01)i;
C12N 7/02(2006.01)i; **C12P 21/08**(2006.01)i; **G01N 33/531**(2006.01)i; **G01N 33/569**(2006.01)i
 FI: C12N15/13; C07K17/00; A61K39/395 S; A61P31/14; G01N33/569 L; G01N33/531 A; C12P21/08; C12N7/02;
 C07K16/10 ZNA

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90; C07K1/00-19/00

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 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 10787501 B1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 29 September 2020 (2020-09-29) examples, table 31	1-19
Y	KR 10-2205028 B1 (CELLTRION, INC.) 20 January 2021 (2021-01-20) examples, table 10	1-19
Y	HUANG, Y. et al. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2: current understanding, challenge and perspective, Antib. Ther., 2020, 3(4), pp. 285-299 particularly, abstract, table 1	1-19
Y	LIU, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike, Nature, 2020, 584(7821), pp. 450-456 particularly, abstract, fig. 2, 3, pp. 454-454, Epitope mapping	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 March 2022

Date of mailing of the international search report

22 March 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/001859

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/001859

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	10787501	B1	29 September 2020	US	10954289	B1	
				US	10975139	B1	
				EP	3889177	A1	
				WO	2021/045836	A1	
				KR	10-2021-0134300	A	
				CN	113766928	A	
				CA	3115553	A	
				SG	11202103404P	A	
KR	10-2205028	B1	20 January 2021	WO	2021/194188	A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; C07K 16/10(2006.01)i; C07K 17/00(2006.01)i; C12N 7/02(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; G01N 33/531(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i FI: C12N15/13; C07K17/00; A61K39/395 S; A61P31/14; G01N33/569 L; G01N33/531 A; C12P21/08; C12N7/02; C07K16/10 ZNA																	
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）） C12N15/00-15/90; C07K1/00-19/00 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> 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 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 10787501 B1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 29.09.2020 (2020-09-29) 実施例、TABLE 31</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2205028 B1 (CELLTRION, INC.) 20.01.2021 (2021-01-20) 実施例、表10</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>HUANG Y et al., Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2: current understanding, challenge and perspective, Antib. Ther., 2020, 3(4), pp.285-299 特に、要約、Table 1</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>LIU L et al., Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike, Nature, 2020, 584(7821), pp.450-456 特に、要約、Figs. 2-3、454-454頁 Epitope mappingの項</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table>			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	Y	US 10787501 B1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 29.09.2020 (2020-09-29) 実施例、TABLE 31	1-19	Y	KR 10-2205028 B1 (CELLTRION, INC.) 20.01.2021 (2021-01-20) 実施例、表10	1-19	Y	HUANG Y et al., Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2: current understanding, challenge and perspective, Antib. Ther., 2020, 3(4), pp.285-299 特に、要約、Table 1	1-19	Y	LIU L et al., Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike, Nature, 2020, 584(7821), pp.450-456 特に、要約、Figs. 2-3、454-454頁 Epitope mappingの項	1-19
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															
Y	US 10787501 B1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 29.09.2020 (2020-09-29) 実施例、TABLE 31	1-19															
Y	KR 10-2205028 B1 (CELLTRION, INC.) 20.01.2021 (2021-01-20) 実施例、表10	1-19															
Y	HUANG Y et al., Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2: current understanding, challenge and perspective, Antib. Ther., 2020, 3(4), pp.285-299 特に、要約、Table 1	1-19															
Y	LIU L et al., Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike, Nature, 2020, 584(7821), pp.450-456 特に、要約、Figs. 2-3、454-454頁 Epitope mappingの項	1-19															
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ 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、一般的な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 10.03.2022		国際調査報告の発送日 22.03.2022															
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） 竹内 祐樹 4B 5082 電話番号 03-3581-1101 内線 3448															

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/JP2022/001859

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	US	10954289	B1	
				US	10975139	B1	
				EP	3889177	A1	
				WO	2021/045836	A1	
				KR	10-2021-0134300	A	
				CN	113766928	A	
				CA	3115553	A	
				SG	11202103404P	A	
KR	10-2205028	B1	20.01.2021	WO	2021/194188	A1	